

## B型肝炎ウイルスの細胞内侵入に関する数理モデリング

久留主 達也<sup>1</sup>, 渡士 幸一<sup>2</sup>, 岩見 真吾<sup>3</sup>

九州大学理学部生物学科<sup>1</sup>

国立感染症研究所ウイルス第二部<sup>2</sup>

九州大学理学研究院生物科学部門, 科学技術振興機構さきがけ<sup>3</sup>

Tatsuya Kurusu<sup>1</sup>, Koichi Watashi<sup>2</sup>, Shingo Iwami<sup>3</sup>

*Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University<sup>1</sup>*

*Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases<sup>2</sup>*

*Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, and PRESTO, JST<sup>3</sup>*

### 1. はじめに

B型肝炎ウイルス(HBV)はヒトの肝細胞を標的とするウイルスで、感染後に慢性化すると肝炎や肝がんを引き起こす。このHBV感染は乳児期のワクチン接種によって90%の確率で予防することはできても、発症後にウイルスを体内から排除するための有効な薬剤は少ない。たとえば現在一般的に使用されているB型肝炎の治療薬はインターフェロンだが、これによる細胞内のウイルス排除率は40%未満である[1]。なぜこのように細胞内のHBVを排除することが困難であるのかは、HBVのライフサイクルに原因があると考えられる。

HBVは標的細胞表面への接着、内在化を経て核内に侵入する。HBVのDNAは一本鎖の部分と二本鎖の部分を持つ不完全環状二重鎖で、核内に移行した後に標的細胞のDNAポリメラーゼによって完全な二重鎖DNAであるcovalently closed circular DNA(cccDNA)に変わる[2]。このcccDNAが複製の起点となり新たなウイルス粒子が作られるが、複製は逆転写阻害剤によって一時的に止めることはできるものの、その間もcccDNAは長期間核内に留まり続け、薬剤投与を止めると再び複製が始まってしまふ[3]。すなわち、一度HBVが細胞内に侵入するとそれらを完全に排除することは既存の薬剤では非常に困難である。したがってHBV感染の治療においては、ウイルスをいかに細胞内に侵入させないかが重要であり、新しい侵入阻害剤の開発が求められている。しかしHBVの細胞内への侵入に着目した定量的なモデルは確立されておらず、これを構築して侵入阻害剤の効果を推定することが新たな侵入阻害剤の開発には必要である。

本研究では、まずHBVの細胞内侵入における各ステップのウイルスDNA量を定量した実験データを解析し、HBVの細胞内侵入に関する数理モデルを構築すること

を目的としている。そして次に開発したモデルにおいて、様々な割合で HBV の侵入阻害を仮定した場合、どれくらいの確率で感染阻害が達成されるのかを、確率シミュレーションを用いて計算する。この研究によって効果的に感染を阻止するために必要な侵入阻害の条件が明らかになれば、今後の新しい侵入阻害剤の開発に大いに役立つと期待できる。

## 2. 数理モデルを用いた HBV 感染実験データ解析

### 2.1. 数理モデルの構築

本研究では 3 種類の HBV 感染実験データを解析する数理モデルの構築及びパラメーター推定を行った。感染実験では、細胞表面に接着するウイルス量、内在化したウイルス量、cccDNA 量について計測した。また本感染実験では HepG2-hNTCP-C4 細胞を well 内に 35000 個用意し、5 種類のウイルス量(以下、接種量と略す)500、1000、2000、4000、8000 copies/cell を接種した。簡単な実験プロトコルと計測した実験データを図 1 に示す。この実験で注意すべき点は、最初にウイルスを投与するときは 4°C で細胞が不活性化しているためウイルスの内在化が起こらないことである。

今回この感染実験データを解析するにあたって、1 細胞あたりのウイルス粒子の挙動を表す、以下の数理モデル(1)を開発した。変数  $V_{free}$ 、 $V_{att}$ 、 $V_{int}$ 、 $V_{ccc}$  はそれぞれ細胞から解離しているウイルス量、細胞表面に接着しているウイルス量、内在化したウイルス量、核内の cccDNA 量と定義する：

$$\begin{aligned} \frac{dV_{free}(t)}{dt} &= k_{det}V_{att}(t) - k_{att}V_{free}(t), \\ \frac{dV_{att}(t)}{dt} &= k_{att}V_{free}(t) - k_{det}V_{att}(t) - k_{int}V_{att}(t), \\ \frac{dV_{int}(t)}{dt} &= k_{int}V_{att}(t) - k_{ccc}\left(1 - \frac{V_{ccc}(t)}{K}\right)V_{int}(t), \\ \frac{dV_{ccc}(t)}{dt} &= k_{ccc}\left(1 - \frac{V_{ccc}(t)}{K}\right)V_{int}(t) - k_dV_{ccc}(t). \end{aligned} \quad (1)$$

ここで、ウイルスはそれぞれ速度  $k_{att}$ 、 $k_{det}$  で細胞表面への接着と解離を繰り返し、接着した一部が速度  $k_{int}$  で内在化した後速度  $k_{ccc}$  で cccDNA を生成し、この cccDNA は速度  $k_d$  で分解される。なお各パラメーターの単位は  $day^{-1}$  とする。また実験データでは接種量が増えても 1 感染実験あたりの cccDNA 量は大きく変化していないことより、cccDNA 量には制限があると考えられるため、数理モデル(1)では  $V_{ccc}$  に上限  $K$  を設けている。

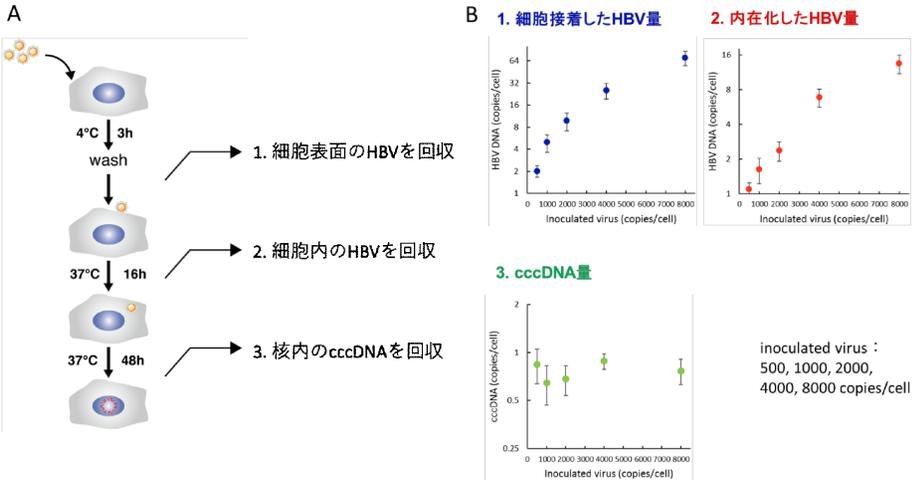


図 1: 感染実験方法と結果 | (A) HBV 感染実験のプロトコル。最初に細胞を 4°C で不活性化させ、ウイルスの内在化が起こらない状態で well にウイルスを接種する。3 時間後に細胞を wash することで細胞表面に付着しているウイルスのみを残し、その後温度を 37°C に変えることで内在化を開始させている。(B) 感染実験の結果。3. の cccDNA 量は 1 感染細胞あたりの量を表している。なお各実験値のエラーバーは標準誤差を示し、縦軸は対数スケールで表している。

## 2.2. 数理モデルのパラメーター推定

まず細胞接着した HBV の定量実験より  $k_{att}$ ,  $k_{det}$  を非線形最小二乗法によって推定する。このとき 4°C の条件下で内在化は起こらないため、ウイルス粒子の挙動を表す式は以下ようになる：

$$\begin{aligned}\frac{dV_{free}(t)}{dt} &= k_{det}V_{att}(t) - k_{att}V_{free}(t) \\ \frac{dV_{att}(t)}{dt} &= k_{att}V_{free}(t) - k_{det}V_{att}(t)\end{aligned}\quad (2)$$

この式においてウイルスを投与した時刻を  $t = -3(\text{hours})$  とし、 $V_{free}(0)$ ,  $V_{att}(0)$  の値と実験データをフィッティングさせる。ここで以下の関数を定義する：

$$\begin{aligned}SSR &= \sum_i \{ (\log[D_{att}(i)] - \log[V_{att}(0)])^2 \\ &\quad + (\log[D_{free}(i)] - \log[V_{free}(0)])^2 \}.\end{aligned}\quad (3)$$

式(3)における  $D_{att}(i)$ ,  $D_{free}(i)$  はそれぞれ、2.1. の実験における細胞表面に接着しているウイルス量と細胞表面から解離しているウイルス量と定義し、 $i$  は接種量 (500, 1000, 2000, 4000, 8000 copies/cell) を表す。そして、残差平方和 SSR が最小になるようにフィッティングを行うと  $k_{att} = 3.65 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1}$ ,  $k_{det} = 1.1 \text{ day}^{-1}$  という値が得ら

れた。

続いて、求めた $k_{att}$ と $k_{det}$ の値を用いて、非線形最小二乗法によって $k_{int}$ 、 $k_{ccc}$ 、 $k_d$ 、 $K$ の推定を行う。ここで以下の関数を定義する：

$$SSR = \{(\log[D_{int}(i)] - \log[V_{int}(16h)])^2 + (\log[D_{ccc}(i)] - \log[V_{ccc}(64h)])^2\}. \quad (4)$$

$D_{int}(i)$ 、 $D_{ccc}(i)$ はそれぞれ内在化したHBV量とcccDNA量の実験値と定義し、 $i$ は接種量(500、1000、2000、4000、8000 copies/cell)を表す。このSSRを最小にするようにフィッティングさせた結果、 $k_{int} = 1.41 \text{ day}^{-1}$ 、 $k_{ccc} = 0.787 \text{ day}^{-1}$ 、 $k_d = 8.36 \times 10^{-14} \text{ day}^{-1}$ 、 $K = 0.777$ という値が得られた。これらのパラメーターを用いたシミュレーション結果と実験値との比較を図2に示す。

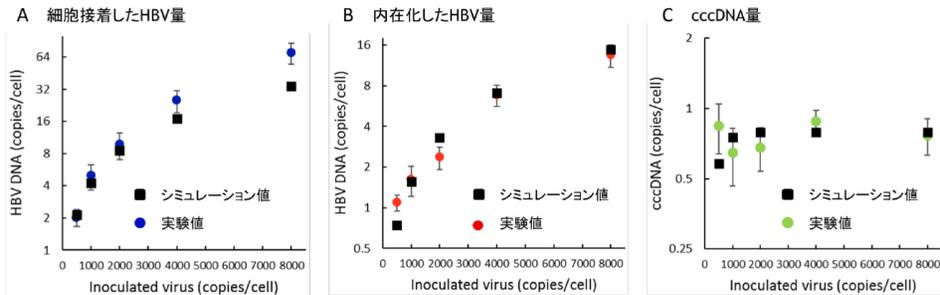


図 2: 実験値とモデルのフィッティング結果 | (A)細胞接着したHBV量と式(2)における $V_{att}(0)$ 、(B)内在化したHBV量と式(1)における $V_{int}(16h)$ 、(C)cccDNA量と式(1)における $V_{ccc}(64h)$ をフィッティングさせた結果。

### 3. 確率シミュレーションを用いた侵入阻害の効果推定

3.でHBVの細胞内侵入に着目した数理モデルの構築とそのパラメーター推定を行ったが、このモデルのままではHBVの挙動を正確に表すには適さない。なぜならば、常微分方程式では細胞表面に付着した細胞は全て侵入し、cccDNAの生成まで反応が進む。しかし実際には各ステップは確率的に起こっていると考えられるからである。そこで、構築したモデルを用いた確率シミュレーションを行うことでHBVの挙動をより現実的に表し、侵入阻害の効果を加えたときにどのような結果が得られるのかを計算する。

#### 3.1. ギレスピーのアルゴリズムを用いた確率シミュレーションの構築

本研究で行う確率シミュレーションにはギレスピーのアルゴリズムを用いた[4]。このアルゴリズムでは複数個の反応を含む系を用意し、まず次のイベントが発生するまでの時間ステップを決定し、次にどの反応が起こるかを確率的に決定し、最後に選択

された反応によって系の状態を更新するという3つのステップから成り立つ。今、確率シミュレーションによって数が更新される変数は $V_{free}(t)$ 、 $V_{att}(t)$ 、 $V_{int}(t)$ 、 $V_{ccc}(t)$ の4つであり、(1)の右辺各項をイベントとして設定する。具体的には $k_{det}V_{att}(t)$ 、 $k_{att}V_{free}(t)$ 、 $k_{int}V_{att}(t)$ 、 $k_{ccc}V_{int}(t)$ 、 $k_{ccc}\frac{V_{ccc}(t)}{K}V_{int}(t)$ 、 $k_dV_{ccc}(t)$ の6つであり、これをそれぞれ $E_1(t)$ 、 $E_2(t)$ 、 $E_3(t)$ 、 $E_4(t)$ 、 $E_5(t)$ 、 $E_6(t)$ とする。なお $k_{ccc}\frac{V_{ccc}(t)}{K}V_{int}(t)$ 、 $k_dV_{ccc}(t)$ は $k_{ccc}(1 - \frac{V_{ccc}(t)}{K})V_{int}(t)$ を展開して得られる。そして推定したパラメーターの値を用い、時刻 $t + \tau$ で各イベントが起こる確率を

$$\frac{E_x(t)}{E_1(t)+E_2(t)+E_3(t)+E_4(t)+E_5(t)+E_6(t)} \quad (7)$$

と設定する( $x = 1, 2, \dots, 6$ )。また次のイベントが起こるまでの時間ステップを

$$\frac{\log[1/Random]}{E_1(t)+E_2(t)+E_3(t)+E_4(t)+E_5(t)+E_6(t)} \quad (8)$$

と定義する。ここで $Random$ は0から1の実数乱数とする。すなわち次のイベント発生までの微小な時間ステップは、 $V_{free}(t)$ 、 $V_{att}(t)$ 、 $V_{int}(t)$ 、 $V_{ccc}(t)$ 全てを足したウイルス量が少なければ長くなり、多ければ短くなる。

以上の条件をもとに、まず次のイベントまでの時間ステップを決め、確率的にイベントを選択し、変数の値をそれぞれ1ずつ更新する。たとえば $k_{det}V_{att}(t)$ は細胞表面に接着しているウイルスが解離するイベントであるため、これが選択された場合 $V_{free}(t)$ は1増え、 $V_{att}(t)$ は1減る。これを感染実験と同じように、4°Cで式(2)の挙動を示す場合で3時間、37°Cで式(1)の挙動を表す場合で12日間というタイムスケールで繰り返す。

### 3.2. 侵入阻害と感染阻害確率の関係

3.1.で式(1)、(2)の確率シミュレーションを行う方法を示したが、次はこれに侵入阻害の効果を仮定したときの感染阻害確率を計算する。侵入阻害についてはHBVの細胞接着阻害、内在化阻害、cccDNA生成阻害の作用機序がある。本研究では式(1)、(2)を用いた確率シミュレーションにおいて $k_{att}$ 、 $k_{int}$ 、 $k_{ccc}$ を段階的に減少させていき、それぞれの場合で感染阻害確率、すなわちcccDNAの形成阻害率を算出した。なお、確率シミュレーション上で内在化を開始させた後12日の間に $V_{ccc}(t)$ が現れなかった、もしくは消滅したものを感染阻害がされたとみなし、シミュレーションの試行回数に占める感染阻害の割合を感染阻害確率と定義した。また、接種量は2000、4000、8000 copies/cellの3種類を用いた。

図3はこれらのシミュレーション結果を示している。左のグラフは接着阻害、中央

のグラフは内在化阻害、右のグラフは cccDNA 生成阻害をしたときの感染阻害確率を表している。3 つとも感染阻害確率は接種量に依存し、接種量が少ないほど感染阻害確率は高い。また侵入阻害割合と感染阻害確率の関係は比例関係ではなく、ある割合までの侵入阻害では感染阻害が成立せずにその後急速に感染阻害確率が上昇する傾向が見られる。しかし感染阻害確率の値を比較すると、接着阻害をしたときに最も高い確率で感染阻害が成功している。

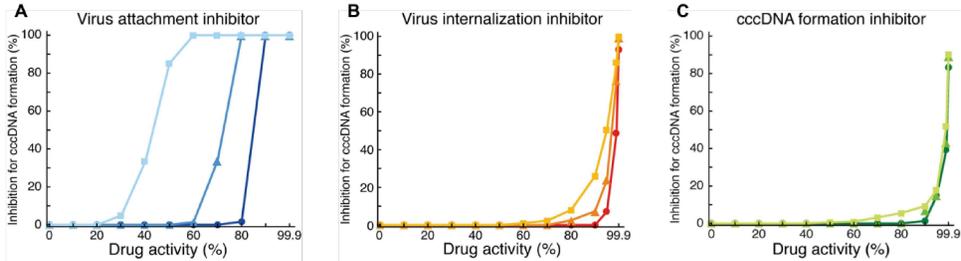


図 1: 侵入阻害効果を仮定したときの感染阻害確率 | 式(1)、(2)における HBV の細胞内侵入に関わるパラメーターを減少させたときの感染阻害、すなわち cccDNA の生成阻害の成功確率。3 つのグラフはそれぞれ(A)ウイルスが細胞表面へ接着する速度 $k_{att}$ 、(B)ウイルスが内在化する速度 $k_{endo}$ 、(C)cccDNA が形成される速度 $k_{ccc}$ を 0%から 99.9%まで 10%ずつ減少させている。縦軸、横軸はそれぞれ感染阻害確率、パラメーターの減少割合を表す。それぞれのパラメーターの減少割合において、12 時間後までに cccDNA が現れなかった、もしくは消滅した回数、全試行回数に対する割合を感染阻害確率としている。なおそれぞれのグラフにおいて、線の色が濃いほど接種量が多く、薄い方から順に 2000、4000、8000 copies/cell である。

#### 4. 考察

本研究では、HBV が標的細胞内への侵入し複製起点となる cccDNA を生成するまでの挙動を表す新しい数理モデルを構築し、各ステップにおけるウイルスゲノム量を定量した実験値とフィッティングさせることでパラメーター推定を行った。その結果、構築した数理モデルによって実験結果の再現ができ、このモデルは HBV の挙動を表すのに適していると考えられる。ただしこの数理モデルは、核内に存在できる cccDNA の量には制限があるということ仮定している。この仮定が正しいかどうかは現在実験、解析を進めている途中である。

推定したパラメーター値について考察する。まず $k_{att} = 3.65 \times 10^{-2} \text{ day}^{-1}$ 、 $k_{det} = 1.1 \text{ day}^{-1}$ という値は、HBV は細胞表面に接着する速度が解離する速度の約 30 分の 1 であり、あまり細胞表面に接着しないということを表している。また $k_d = 8.36 \times 10^{-14} \text{ day}^{-1}$ という値は、核内の cccDNA は本感染実験のタイムスケールにおいてほ

とんど減少しないことを示唆しており、生物学的に不自然ではない。

また侵入阻害の確率シミュレーションでは、 $k_{int}$ 、 $k_{ccc}$ より $k_{att}$ を減少させたときの方がより高い確率で感染阻害が起きるという結果が得られた。これらのシミュレーションより、HBV 感染を防ぐためにはウイルスの内在化や核への移行及び cccDNA 生成の過程よりも細胞接着を阻害する薬剤の開発が望ましいと考えられる。

## 5. 今後の展望

現在新たな HBV の侵入阻害剤の開発が進められているが、そもそも侵入機構や複製機構など、まだ不明な点が多い。HBV 生活環を実験的に解明していくことに加え、数理生物学の分野ではシンプルかつ定量的にそれらの挙動を表すモデルを構築し、抗 HBV 治療薬の開発を支援するためのアプローチを開発し、広めていく必要がある。本研究では培養細胞を用いた実験結果を再現できているが、これらの実験結果と数理モデルが生体内ではどれだけ一般化されるものであるか等、不透明な箇所も多い。

今後はまず cccDNA の生成量に制限があるかどうかを実験的に明らかにし、構築した数理モデルの見直しを行う。そして確率シミュレーションにおける $k_{att}$ 、 $k_{int}$ 、 $k_{ccc}$ の減少割合をより細分化し、侵入阻害割合と感染阻害確率の関係を数理的に解析できるかどうかを検討していく予定である。

## 6. 参考文献

1. Watashi K, Urban S, Li W, Wakita T: **NTCP and beyond: opening the door to unveil hepatitis B virus entry.** *Int J Mol Sci* 2014, **15**:2892-2905.
2. Kim DH, Kang HS, Kim KH: **Roles of hepatocyte nuclear factors in hepatitis B virus infection.** *World J Gastroenterol* 2016, **22**:7017-7029.
3. Seeger C, Locarnini S: **The Hepatitis B and Delta Viruses.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015.
4. Gillespie DT: **Stochastic simulation of chemical kinetics.** *Annu Rev Phys Chem* 2007, **58**:35-55.