

pastoris を形質転換し、抗ヒスチジンタグ抗体を使った Western blot で IFN α の生産を確認した。培養上清から、コバルト固定カラム、ゲル濾過カラムで精製した（図 3A）。

精製した IFN α の N 末アミノ酸配列は、分泌シグナルが切断された「EAEFMCD」であった。

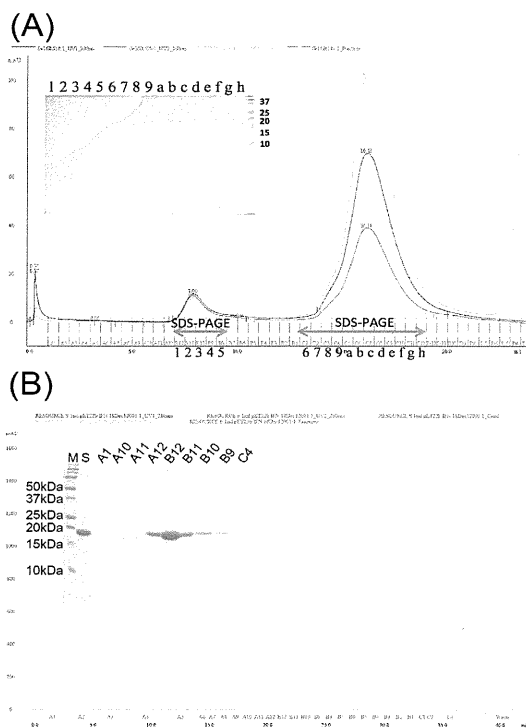


図3 IFN α の精製。(A)*P. pastoris* で生産した IFN α のゲル濾過。(B)大腸菌で生産した IFN α の陽イオン交換カラムの溶出。

大腸菌

pET22b プラスミドに含まれるペリプラズム分泌シグナルの 3' に、ヒトライノウイルスの C3 プロテアーゼ認識配列、IFN α （成熟タンパク質のアミノ酸配列の 1 番から 165 番目）を配置した。形質転換した大腸菌 BL21(DE3) を培養し、浸透圧ショックでペリプラズム画分を集めた。ペリプラズム画分を、60%飽和硫酸アンモニウム沈殿、陰イオン交換カラム、

陽イオン交換カラム、ゲル濾過カラムで精製した（図 3B）。ゲル濾過カラムによる分析では、IFN α は見かけの分子量が 34kDa の単分散の分子であった。

発現した IFN α の N 末のアミノ酸配列は、ペリプラズム分泌シグナルが切断された「MGLEVLFTGP」であった。

IFN α を 5.5mg/ml に濃縮し、結晶化条件スクリーニングを行った。幾つかの条件で、針状結晶が成長した。図 4 の結晶化条件は、20%(v/v) PEG-MME 550, 0.1M Bicine (pH9.0), 0.1M NaCl であった。

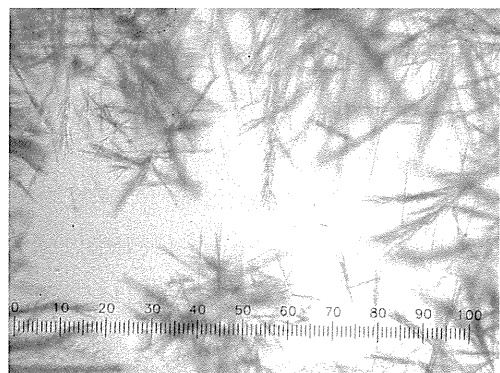


図4 大腸菌で生産した IFN α の微結晶。

IFNAR2-ECD と IFN α の結合試験

P. pastoris で生産した IFNAR2-ECD と IFN α の混合液をゲル濾過カラムで分析した（図 5）。溶出位置は、分子量が最も小さい IFN α はフラクション 11 である（図 5A）。IFN α に対し大過剰の IFNAR2-ECD を混合した。IFNAR2-ECD と混合した IFN α の溶出位置は、フラクション 6 から 7（図 5B）、EndoH で糖鎖を除去した IFNAR2-ECD と混合した IFN α の溶出位置はフラクション 9 から 10 であった（図 5C）。共存する IFNAR2-ECD の分子量が大きい程、ゲル濾過カラムからの溶出が速

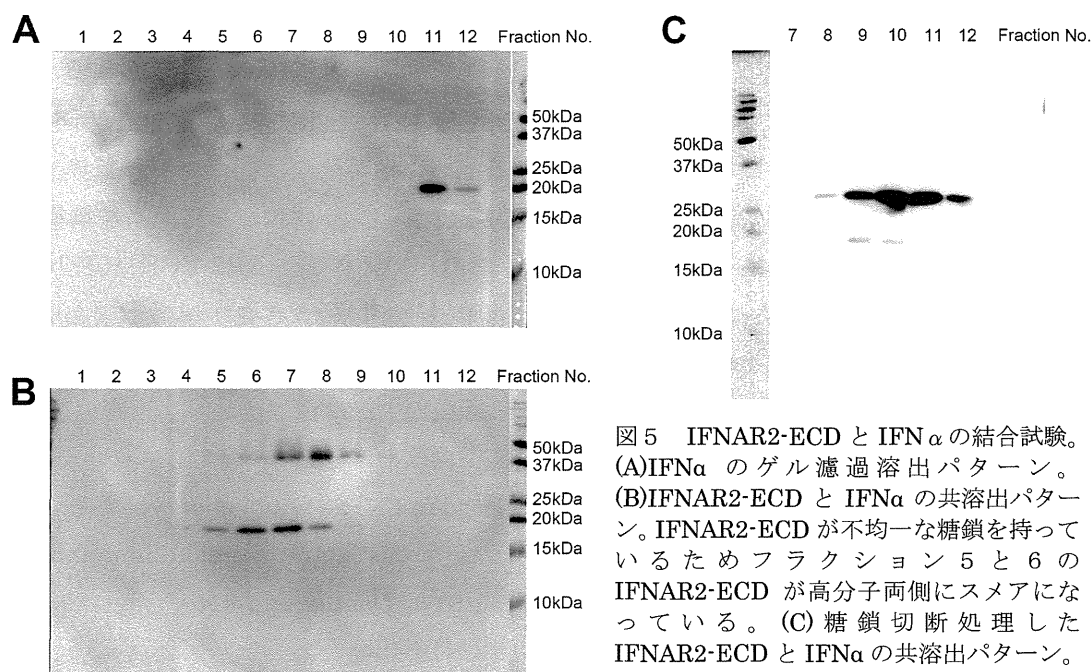


図5 IFNAR2-ECD と IFN α の結合試験。
(A)IFN α のゲル濾過溶出パターン。
(B)IFNAR2-ECD と IFN α の共溶出パターン。IFNAR2-ECD が不均一な糖鎖を持っているためフラクション 5 と 6 の IFNAR2-ECD が高分子両側にスミアになっている。(C)糖鎖切断処理した IFNAR2-ECD と IFN α の共溶出パターン。

くなることから、IFN α と IFNAR2-ECD は溶液中で複合体を形成していることが判る。

D. 考察

Type I IFN と同等な生物活性を持つ経口投与可能な薬剤は、慢性 B 型肝炎、慢性 C 型肝炎、ある種のガン等の治療において患者の生活の質を高めることに寄与できる。Type I IFN 受容体は、IFN の結合依存的に IFNAR1 と IFNAR2 の 2 つの受容体タンパク質がヘテロダイマーを形成して Type I IFN の生物活性発現に関わる細胞内シグナル伝達経路を活性化する。2 つの受容体タンパク質のうち IFNAR2 は、人為的にホモ二量体をつくと細胞内シグナル伝達経路を活性化する⁶⁾。Konishi らは、IFNAR2-ECD に結合し、IFNAR1 非依存的に細胞外シグナル伝達経路を活性化する低分子化合物 RO8191 について報告した⁵⁾。

IFNAR2-ECD 上での R08191 の結合部位と結合様式、また R08191 を結合したときに IFNAR2-ECD に起こる構造変化の情報は、Type I IFN と同等な生物活性を持つ経口投与可能な薬剤を開発する上での重要な情報源となる。

本研究で発現した組換え IFNAR2-ECD と IFN α は、結晶構造解析等の物理化学測定に供しうる「質」を持つと考えられた。*P. pastoris* と *B. choshinensis* で生産した IFNAR2-ECD は、可溶性タンパク質として培養液中に発現した。分析ゲル濾過カラムによる分析では、*B. choshinensis* で生産した IFNAR2-ECD は、見かけの分子量で 36kDa を中心とする単分散の粒子であった。*P. pastoris* で生産した IFNAR2-EDC は、糖鎖修飾に多様性があった。この糖鎖は、少なくとも SDS ゲル電気泳動で均一な分子量に見える程度まで、糖鎖切断酵素 EndoH で除去可能であった。糖鎖切断処理後の見かけの分

子量は 55kDa を中心とする単分散であった。*P. pastoris* で生産した IFN α は、可溶性タンパク質として培養液中に発現した。大腸菌で生産した IFN α は、可溶性タンパク質としてペリプラズムに分泌された。*P. pastoris* と大腸菌で生産した IFN α は、ゲル濾過カラムで分析した溶液中の見かけの分子量が 36kDa と 34kDa を中心とする単分散の粒子であった。大腸菌で生産した IFN α の微結晶を得た。結晶は、同一物が周期性を持って並んだ固体である。溶液中で単分散である事は、その粒子が結晶となる為の必要条件でもある⁸⁾。

P. pastoris で生産した IFNAR2-ECD と IFN α が溶液中で複合体を形成することは、本研究で発現した組換えタンパク質が、機能する活性のあるタンパク質であることを示している。IFNAR2-ECD と IFN α の複合体形成は、IFNAR2-ECD にある糖鎖を除去しても維持される。この結果は、糖鎖の複合体形成に対する影響は小さいことを表している。*B. choshinensis* で発現させた糖鎖の無い IFNAR2-ECD も IFN α と複合体を形成する能力を有していることが推定される。

これ迄に構築した活性型 IFNAR2-ECD の発現系の培養条件等の検討を行うことが必要である。結晶構造解析等の物理化学測定では、一回の実験でミリグラム単位のタンパク質試料が必要なことが多い。現在の発現系の発現量は、培養 1 リットルあたり 1.2 ミリグラム程度である。効率よく実験を行うために培養 1 リットルあたり数ミリグラム程度の発現量を得る必要がある。現時点で最低限の発現量を確保したと言える。

E. 結論

X 線結晶構造解析等の物理化学測定で、IFNAR2-ECD と R08919 の相互作用を解析するために不可欠な、活性を持つ組換え体 IFNAR2-ECD と IFN α の発現系を構築した。この組換え体 IFNAR2-ECD と IFN α が溶液中の見かけの大きさが単分散であること、また複合体を形成することを確認した。

F. 参考文献

1. Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2000; 12: 419-424.
2. Garcia-Sastre A. and Biron C. A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: A lesson in detente. *Science*. 2006; 312: 879-882.
3. Horton H. M., Hernandez P., Parker S. E. and Barnhart K. M. Antitumor effects of interferon-omega: In vivo therapy of human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Research*. 1999; 59: 4064-4068.
4. Pestka S., Krause C. D. and Walter M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*. 2004; 202: 8-32.
5. Konishi H., Okamoto K., Ohmori Y., Yoshino H., Ohmori H., Ashihara M., Hirata Y., Ohta A., Sakamoto H., Hada N., Katsume A., Kohara M., Morikawa K., Tsukuda T., Shimma N., Foster G. R.,

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

Alazawi W., Aoki Y., Arisawa M. and Sudoh M. An orally available, small-molecule interferon inhibits viral replication. <i>Scientific Reports</i> . 2012; 2:	2. 実用新案登録 該当なし 3. その他 該当なし
---	-------------------------------------

6. Pattyn E., Van Ostade X., Schauvliege L.,
Verhee A., Kalai M., Vandekerckhove J.
and Tavernier J. Dimerization of the
interferon type I receptor IFNAR2-2 is
sufficient for induction of interferon
effector genes but not for full antiviral
activity. *Journal of Biological Chemistry*.
1999; 274: 34838-34845.

7. Lennon G., Auffray C., Polymeropoulos
M. and Soares M. B. The IMAGE
consortium: An integrated molecular
analysis of genomes and their expression.
Genomics. 1996; 33: 151-152.

8. Kawate T. and Gouaux E.
Fluorescence-detection size-exclusion
chromatography for precrystallization
screening of integral membrane proteins.
Structure. 2006; 14: 673-681.

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 臨床標的に関する研究

独創的新規標的の同定
-新規スクリーニング用 HBs 蛋白、HBV 発現細胞の樹立と
オミックスによる新規標的の同定をめざして-

研究分担者 松浦知和 東京慈恵会医科大学 臨床検査医学 准教授

研究協力者

池田 均（東京大学医学部 臨床病態検査医学 准教授）

坪田昭人（東京慈恵会医科大学 臨床医学研究所 副所長・教授）

鈴木哲朗（浜松医科大学 感染症学講座 教授）

【研究要旨】

本研究では、抗 B 型肝炎ウイルス（HBV）薬開発のための新規スクリーニング系を構築し、スクリーニングの結果から HBV の感染・増殖機構中の新規分子ターゲットを検索する。研究体制を構築し、新規スクリーニング系としての genotype Ae と C の発現系の検討、新規標的の検索のためのオミックス研究、治療薬候補化合物の効果判定に用いる新規肝障害・線維化バイオマーカー探索の研究を開始した。

A. 研究目的

本研究では、1) 抗 HBV 薬開発のための新規スクリーニング系を構築し、2) スクリーニングの結果から HBV の感染・増殖機構中の新規分子ターゲットを検索する。

具体的には、埼玉医科大学総合医療センター（名越班）に集められ、臨床検体（特徴ある病態の B 型肝炎患者血清）から、「HBV ゲノムクローニング」と創薬スクリーニングのための「HBV 産生細胞株作製」をめざす。ウイルスを含む血清から、ウイルス DNA 抽出→HBV ゲノムクローニング→各種細胞での発現実験→HBs 蛋白質・HBV 産生細胞の作製を行う（浜松医大との共同研究）。

新規標的の同定は、トランスクリプトーム解析を行う横浜理化学研究所（鈴木班）、メ

ソ（堂前班）、膜プロテオーム解析担当大阪大学（金井班）のオミックス 3 班と協力して研究を進める。HBV 感染（または発現）細胞と非感染（非発現）細胞間の比較オミックス（松浦とオミックス班）、感染動物と非感染動物の比較オミックス（坪田とオミックス班）を行って、新規標的の検討を開始する。HBV 感染と非感染の細胞および動物での肝障害バイオマーカーとして、従来の生化学的マーカー以外に、新規バイオマーカー候補の探索も行う（池田）。先行研究で開発した、血漿または培養液中の TGF- β LAP-D を測定し、肝臓線維化活性を評価する（和光理化学研究所・小嶋班）。（図 1. 研究協力体制）

B. 研究方法

1) HBs 蛋白・HBV 産生細胞株の樹立

高機能肝癌細胞 FLCs は、FLC-4, 5, 7 で遺伝子発現は異なり、さらに 3 次元培養では膜トランスポーターが蛋白レベルで発現が増加する。今回は、HBV 発現細胞作製の前段階として、FLC に genotype Ae と C の HBs 遺伝子または HBVgenome をトランスフェクションし、3つの S 蛋白の発現を検討した（詳細な方法と Huh7 細胞での発現実験結果は鈴木哲朗研究協力者報告参照）。

2) HBV 産生細胞を用いた新規ターゲットの検索

HBV 産生細胞、非産生細胞（母細胞）での比較オミックス（トランスクリプトーム、モディフィコーム、膜プロテオーム）を行い、HBV 産生細胞特有の宿主因子の変化を検証し、新規ターゲット候補を検索する。今年度は、従来の HBV 産生細胞である Hep2. 2. 15 とその母細胞の HepG2 で比較オミックスを行う。3種類の核酸アナログ製剤（ラミブジン、アデフォビル、テノフォビル）添加、非添加で比較し、核酸アナログ製剤の宿主因子への影響に関して検討中である（詳細は鈴木治和分担研究者報告書参照）。

3) 抗 HBV 薬の治療効果判定のための新規バイオマーカーの探索

先行研究の肝障害患者の肝臓線維化活性を反映する血漿 TGF- β LAP-D 濃度測定データから、B型肝炎症例を抽出し、核酸アナログ製剤加療例での経過を検討した。

（倫理面への配慮）

臨床サンプル収集に関しては、各研究施設の倫理委員会の承認を得たうえで、対象患者のインフォームドコンセントを書面で得て、行っている。

C. 研究結果

1) HBs 蛋白・HBV 産生細胞株の樹立

今回は、HBV 発現細胞作製の前段階として、FLC に genotype Ae と C の HBs 遺伝子または HBVgenome をトランスフェクションし、3つの S 蛋白の発現を比較した。Genotype Ae では C に比較して、SS と MS が増加し、LS が低下した（図 2）。

2) HBV 産生細胞を用いた新規ターゲットの検索

核酸アナログ体の宿主細胞への影響を網羅的に解析するため、HBV (genotype D) 産生細胞である Hep2. 2. 15 を、3種の核酸アナログ体（ラミブジン、アデフォビル、テノフォビル）を添加した培養液で培養した。臨床でのそれぞれの C_{max} の 10 倍濃度で 4 日間培養後、HBVDNA は未処理細胞に比較して 1/10～1/5 に減少した。細胞の増殖性には、変化はなかった。核酸アナログ体処理細胞と未処理細胞を、RNAlater 処理しトランスクリプトーム解析へ、10%SDS で処理しモディフィコーム解析へ回した。

3) 抗 HBV 薬の治療効果判定のための新規バイオマーカーの探索

TGF- β LAP-D 濃度は核酸アナログ製剤服用症例では、低値を示している。しかし、経過中、血中 HBVDNA が低値で、トランスアミナーゼ活性も低いにも関わらず、TGF- β LAP-D 濃度が増減する症例を認めた（図 3）。

D. 考察

抗 HBV 薬を開発するための新規化合物スクリーニング系の開発をめざし、特徴ある臨床例からの HBVDNA の精製→ゲノム解析→宿主細胞（FLC 細胞）への導入・発現の

検討→新規 HBs 蛋白質・HBV 発現細胞の樹立、という系を構築した。また、新規標的の同定をめざし、新規化合物が抽出される前に、従来の核酸アナログ体を用いて、宿主細胞への影響をトランスクリプトーム解析、モディフィコーム解析、膜プロテオーム解析で網羅的に解析する系を、オミックス研究グループと立ち上げた。また、新規治療薬候補化合物の *in vivo*, *in vitro* での効果、特に肝障害や肝線維化を評価するバイオマーカーとして、TGF- β LAP-D が有用化検討を継続する。

E. 結論

新規スクリーニング系としての genotype Ae と C の HBV 産生細胞の樹立をめざして、各 HBV 由来 HBs 遺伝子と全長遺伝子の発現実験を行い、genotype A と C の間で 3 種の S 抗原の発現に違いを認めた。

新規治療標的の解明をめざし、既存 HBV 産生細胞で核酸アナログ体処理時のオミックス解析を開始した。

次年度は、より緊密に研究分担者、主任研究者、そして他の研究班との連携と情報交換に務め、「新規標的の同定」をめざす。

図 1 研究体制

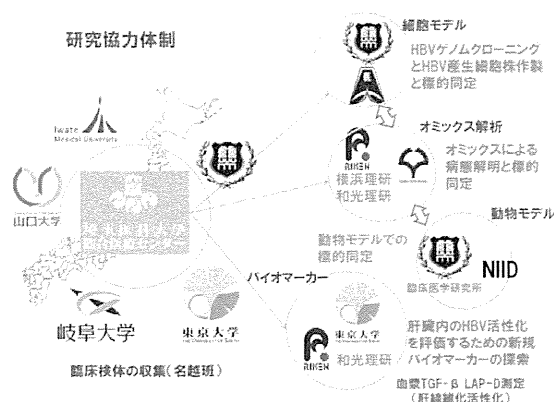
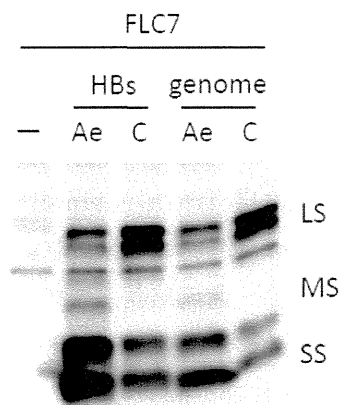
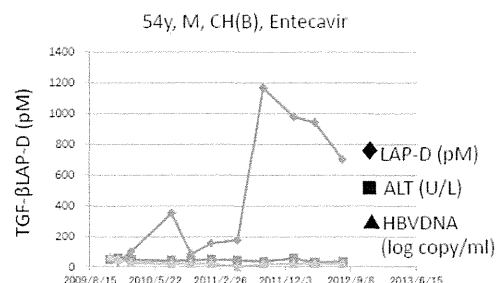


図 2 HBs 蛋白発現実験



FLC7 細胞での発現実験でも genotype C では Ae に比較して、LS の発現が多く MS、SS は低かった。

図 3 エンテカビル投与症例の LAP-D 推移



エンテカビル投与症例で、血中 HBV-DNA が低値・ALT 低値を推移していても、LAP-D が増加し、肝線維化活性の持続高値を示す症例を認めた。

F. 参考文献 なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 松浦知和, 池脇克則, 前橋はるか, 大川清, 松本喜弘, 田中 賢, 永妻啓介, 高木一郎. 肝臓星細胞に発現するビタミンA貯蔵酵素 lecithin:retinol acyltransferase による血中レチノール濃度の調節—還流培養系での代謝シミュレーション—. Vitamins (Japan)2012;86:432-40.
2. Laurent T, Murase D, Tsukioka S, Matsuura T et al.. A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the 3-dimensional cell shape. J Cell Physiol 2012;227:2898-906.
3. Matsuura T, Aizawa M. Bioceramics for development of bioartificial liver. Polymeric Biomaterial (Third Eds):Medicinal and Pharmaceutical Applications, Volume2 Popa and Dumitriu edt, CRC Press, P691-713, 2013.

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究

協力研究者：鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授

【研究要旨】

本研究では、現行とは異なる機序の HBV 感染症治療法の開発に資する創薬標的の探索また阻害剤評価系の構築を行う。本年度は、既にクローン化された HBV 遺伝子型 A-D 株を用いて種々のヒト肝がん細胞株で一過性のゲノム複製系を構築した。抗原産生等を解析したところ、HBs 抗原産生について遺伝子型間で異なる特徴を見出した。すなわち、middle HBs 抗原及び small HBs 抗原の産生効率は遺伝子型 A が最も高く、large HBs 抗原は遺伝子型 C が他に比べ高産生であった。遺伝子型 A ゲノムを HuH-7 細胞へ導入し、薬剤選択と HBs 抗原発現スクリーニングによって HBV 持続複製細胞株を樹立した。

A. 研究目的

現在、HBV 感染症の対する治療薬として核酸アナログ製剤、インターフェロンなどが使われているが、ウイルス DNA の完全排除は困難なこと、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題があり、根治療法は確立されていない。現行の治療薬とは作用機序の異なる新規治療薬の開発が待望されている。そのために、新たな創薬標的の探索また阻害剤評価系の構築が重要である。

本年度は、HBV 遺伝子型 A-D 株の一過性ゲノム複製系を構築し、また A 型株について持続産生細胞を作製した。

B. 研究方法

HBV 遺伝子型 A, B, C, D 株 (HBV-Aeus, -Bj56, -CAT, -Dind) のゲノム 1.24 倍長を含む各プラスミドは 国立国際医療センター 溝上センター長から供与された。これらから large S (LS)/middle S (MS)/small S (SS) 遺伝子およびその上流の転写調節領域遺伝子を pUC19 にサブクローン化し、pUCHBS-A、pUCHBS-B、pUCHBS-C、pUCHBS-D を作製した。

細胞はヒト肝がん細胞株 HuH-7、ORL8c、FLC4、FLC5、FLC7 を用いた。HBV 発現プラスミドは、Lipofectamine LTX を利用して各細胞へ導入した。ウイルス抗原の発現はウエスタンブロット法および ELISA 法で検出した。

(倫理面への配慮)

株化細胞および既にクローン化された遺伝子を用いた研究であり該当しない。

C. 研究結果

HuH-7 細胞による HBV 遺伝子型 A, B, C, D の一過性ゲノム複製系で HBs 抗原 (LS, MS, SS) の発現を培養上清の ELISA、ウエスタンブロットで解析した。HBs 抗原レベルは遺伝子型 A が最も高かった。また、LS/MS/SS 比が HBV クローン間で異なることが示された。例えば、遺伝子型 A 株は遺伝子型 C 株に比べ MS 及 SS の発現は高いものの、LS の発現は遺伝子型 C 株より低レベルであった (図 1)。FLC-7 細胞においても HuH-7 細胞と同等の発現レベルが得られ、遺伝子型間の特徴も同様であった。ORL8c、FLC-4、FLC-5 はこれらの 2 種類に比べ低発現であった。

LS/MS/SS 比を、PreS1/PreS2/S 遺伝子のみ
の発現系で比較したところ、ゲノム複製系と
同様の傾向が認められた。

HBV 遺伝子型 A ゲノムを HuH-7 細胞へ導入
し、薬剤選択と HBs 抗原発現スクリーニング
によって HBV 持続複製細胞株を樹立した。樹
立株中の HBs 抗原レベルは～30 ng/mL であ
った。

D. 考察

我が国の HBV 感染は、従来遺伝子型 C が中
心であったが、近年、ヨーロッパ型で持続感
染傾向の強い遺伝子型 A が性交感染症とし
て日本国内、特に大都市部に侵入、拡大して
いることが疫学的に示され、本邦の厚生労働
行政上、重大な課題となってきた。本年度、
HBV 遺伝子型 A-D 株についてゲノム複製、
HBs 抗原産生を解析したところ、HBs 抗原産
生について遺伝子型間で異なる特徴を見出
した。すなわち、MS 及び SS の産生効率は A
型が最も高いものの、LS は C 型が他の遺伝
子型に比べ高産生であった。LS/MS/SS 比が
遺伝子型で特徴づけられる可能性について
は未だ明らかでないが、免疫応答、感染の持
続化に関与する可能性も考えられる。今後、
臨床検体について HBs 抗原発現と臨床経過
との関連解析も重要になるものと思われる。

E. 結論

HBV 遺伝子型 A-D 株の一過性ゲノム複製系
を構築し、A 型株の持続産生細胞株を樹立し
た。

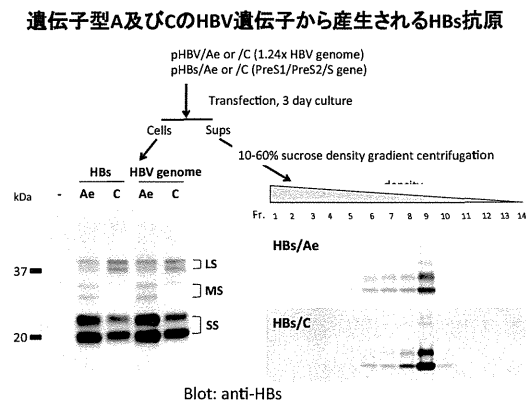
F. 研究発表

- 1. 論文発表
なし
- 2. 学会発表
なし

G. 知的所得権の出願・登録状況

なし

図 1



B型肝炎制圧のための創薬研究に向けた臨床データ・バンキング

研究報告者 名越澄子 埼玉医科大学総合医療センター 消化器・肝臓内科 教授

共同研究者

滝川康裕（岩手医科大学 消化器・肝臓内科）

寺井崇二（山口大学大学院 医学系研究科 消化器病態内科学）

清水雅仁（岐阜大学大学院医学系研究科腫瘍制御学講座 消化器病態学分野）

【研究要旨】

B型肝炎ウイルス（HBV）を完全に排除または中和抗体を獲得させるための創薬に向けた解析に使用する目的で、特徴あるHBV感染者の血液検体と肝臓の収集体制を構築した。

登録患者への説明文書、同意文書、調査用紙を作成し、6大学7施設において、夫々倫理委員会の承認を得た。患者の登録システム、血液検体と肝臓の輸送および保存方法を確立し、該当症例の登録および血液検体の採取を開始した。

A. 研究目的

C型慢性肝炎は、線維化が着実に進行し、どの患者もほぼ同様の経過を辿る。これに対し、B型慢性肝炎は患者により臨床経過が大きく異なり、夫々の経過の中でも時期により多彩な病態を呈する。自然経過で肝炎が沈静化する症例もあれば、肝硬変・肝発癌に進展する症例、あるいは突発的な肝炎重症化・劇症化症例、肝炎沈静化状態からの肝炎重症化・劇症化や肝発癌する症例など臨床像が急激に大きく変化し、その経過も多様である。

また、DNAウイルスであるB型肝炎ウイルス（hepatitis B virus, HBV）は、RNAウイルスであるC型肝炎ウイルスとは異なり、現存する薬物では完全に排除することはできない。

そこで、HBVを完全に排除、あるいは中和抗体（HBs抗体）を獲得するための創薬に向け、トランスクリプトーム解析を行う横浜理化学研究所（鈴木班）、モディフィコーム解

析を行う和光理化学研究所（堂前班）、膜プロテオーム解析担当大阪大学（金井班）のオミックス3班と松浦班による解析に使用する目的で、特徴あるB型肝炎患者（HBVキャリア）の血液検体と肝臓の収集体制を構築した。

B. 研究方法

（1）参加施設

埼玉医科大学総合医療センター（名越）、東京慈恵会医科大学（本院：松浦、柏病院：坪田）、岩手医科大学（滝川）、山口大学（寺井）、岐阜大学（清水）、東京大学（池田）

（2）倫理委員会申請

本研究は、上記6大学7施設による多施設臨床研究（代表：松浦知和）「B型肝炎創薬へ向けてのトランスクリプトーム解析による病態解明と標的同定」の一環として、臨床検体を収集し、データ管理と検体保存を行うものである。従って、東京慈恵会医科大学を研究代表施設として、同大学の倫理委員会に

申請を行い、承認を得た後に、各大学で倫理委員会申請を行った。また、本研究には遺伝子解析が含まれるため、各大学の規定に従い、遺伝子解析に関して別途に倫理委員会に申請した。

（３）検体収集・保存とデータ管理システムの構築（図１）

血液検体または肝臓を採取する症例の選択基準を検討した。６大学７施設で採取した血液検体の処理・輸送体制を各施設の状況に応じて検討した。埼玉医科大学総合医療センターにおける血液検体または肝臓の保存、およびデータ管理体制を個人情報の保護に配慮し検討した。

（４）症例登録・検体採取

選択基準に従い患者を登録し、血液検体の採取を開始する。



図１ 検体収集・保存とデータ管理体制

（倫理面への配慮）

血液検体および肝臓の採取にあたっては、登録患者に対して不利益、危険性およびその対処について十分に説明し、インフォームドコンセントを書面で得て行う。

C. 研究結果

（１）倫理委員会の承認

６大学７施設において、遺伝子解析を含め、倫理委員会の承認を得た。

（２）症例の選択基準

１）インターフェロン、核酸アナログ製剤による抗ウイルス療法を行っていない HBV キャリア

２）抗ウイルス療法をすでに開始しているが、特徴ある臨床所見を有する HBV キャリア（家族内発生でありながら臨床経過が異なる症例、若齢で肝硬変あるいは肝細胞癌を発症した症例など）

（３）検体収集・保存・データ管理

登録患者への説明文書、同意文書、同意撤回文書、登録票を作成した。

血清・血漿分離用試験管および血球 RNA 抽出用試験管を作成し、６大学７施設で、登録患者から採血した血液検体を処理する体制を整えた。

血清・血漿等を各施設で連結可能匿名化し、HBV genotype、HBs 抗原量、HBcr 抗原量、HBV DNA 量、IL28B/SNPs 等の測定に提出後、残余検体および DNA・RNA を埼玉医科大学総合医療センターに輸送する体制を構築した。

埼玉医科大学総合医療センターで、HBV 感染検体を隔離して保存するため、専用のデュープフリーザーを用意した。

調査用紙を作成し、各施設から臨床データを収集する準備を整えた。

肝臓については、肝切除時の切除検体を用いることとした。

（４）症例登録・検体採取

２施設において、特徴ある２症例が登録された。

1) B型肝炎慢性姉妹症例

Genotype C のHBV 感染・慢性肝炎姉妹で、7-8 年前に急性増悪を機に核酸アナログ製剤が開始された姉と、核酸アナログ製剤を投与せずに経過観察している妹で、HBV-DNA 量とともに 4 Log copies/ml と同等であるが、HBs 抗原は、姉が 754 IU/ml に対して、妹は 16,500 IU/ml と高値である。

表 1 B型肝炎慢性姉妹症例

	姉（49歳）	妹（45歳）
HBeAg	陰性	陰性
HBeAb	陽性	陽性
HBcAb (s/co)	13.6	11.5
HBsAb	陰性	陰性
HBsAg (IU/ml)	754	16,500
Lamivudine	投与	非投与
HBV DNA (log copy/ml)	4.2	3.9
ALT	14	42

2) HBV 再活性化症例

兄が B 型肝炎慢性であり、2 年前には HBs 抗原陰性であったが、全身性エリテマトーデスを発症し、プレドニンとシクロスポリン投与が開始された。プレドニンは継続投与されていたが、自己中止して 2 ヶ月目に ALT 上昇を認め、HBV-DNA 2.4 LogIU/ml と判明した。血液検体採取後、エンテカビル内服を開始した。

表 2 HBV 再活性化症例

HBsAg (IU/ml)	<0.05
HBcrAg (log U/ml)	6
subgenotype	C
HBV DNA (log copy/ml)	2.4

D. 考察

次年度は、全施設で登録を開始し、血液検体の収集を進める。臨床データおよび HBV genotype、HBs 抗原量、HBcr 抗原量、HBV DNA 量、IL28B/SNPs 等の測定結果を埼玉医科大学総合医療センターで管理する。

オミックス班と松浦班による新規治療標的の同定を目的とした HBV 感染（または発現）細胞と非感染（非発現）細胞間の比較オミックス（松浦とオミックス班）および感染動物と非感染動物の比較オミックス（坪田とオミックス班）の解析結果をもとに、オミックス解析に用いる血液検体を選定する。

E. 結論

患者の登録システム、血液検体と肝臓の輸送および保存方法を確立し、該当症例の登録および血液検体の採取を開始した。

次年度は、本格的に 6 大学 7 施設で登録を開始し、血液検体の収集・保存および臨床データ管理を進める。

F. 参考文献 なし

G. 研究発表

- 1. 論文発表 なし
- 2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許取得 なし
- 2. 実用新案登録 なし
- 3. その他 なし

**B型肝炎創薬へ向けてのトランスクリプトーム解析による
病態解明と標的同定に関する研究**

研究報告者 鈴木治和 独立行政法人理化学研究所 オミックス基盤研究領域
LSA 要素技術開発グループ プロジェクトディレクター

共同研究者

松浦 知和（東京慈恵会医科大学附属病院 消化器・肝臓内科 臨床検査医学）、坪田 昭人
東京慈恵会医科大学附属柏病院 消化器・肝臓内科 総合医科学研究センター 臨床医学研
究所）

【研究要旨】

HBV の多様な病態の分子レベルでの解明と、疾患治療のための新たな標的同定を目指すべく、次世代シーケンサーを駆使した大規模トランスクリプトーム解析に着手した。ヒト肝ガン細胞である HepG2 細胞、その HBV 産生株である Hep2. 2. 15 細胞から、無処置サンプルおよび核酸アナログ体であるラミブジン、アデフォビル、テノフォビル処置してウイルスの産生を抑えたサンプルを独立に各 3 サンプル調製した。高純度なトータル RNA を調製し、マイクロアレイ解析、deepCAGE 解析、小分子 RNA 解析をスタートさせた。

A. 研究目的

B 型慢性肝疾患に対する治療は、核酸アナログ体の出現により格段の進歩を遂げた。しかしながら、DNA ウイルスである B 型肝炎ウイルス（hepatitis B virus, HBV）は、核酸アナログ体による HBV の増殖を効果的に直接抑制することはできるが、完全駆除は困難である。これは、不完全環状二重鎖 DNA である HBV が super coil 状に核内に潜んでいることや、宿主ゲノムに HBV DNA 遺伝子が組み込まれるためである。よって、B 型慢性肝疾患を完治させるためには、再感染サイクルを完全に断ち切り、非感染肝細胞との置き換わりを待つことにより完全排除するか、核内や宿主ゲノム上の HBV DNA 遺伝子を恒久的に不活性化する必要がある、核酸アナログ体に加えて新たな薬剤の開発

が望まれる。また、B 型慢性肝炎は患者間あるいは個人内での臨床経過に幅広い多様性がある。自然経過での肝炎沈静化から進行性の肝硬変・肝発癌への進展、あるいは突発的/肝炎沈静化状態からの肝炎重症化・劇症化や肝発癌など臨床像が突然激しく変化し、その経過も多様である。

そこで本研究では、近年、発展を遂げてきた次世代シーケンサーを駆使した大規模トランスクリプトーム解析法を武器として、上記した HBV の多様な病態の分子レベルでの解明と、疾患治療のための新たな標的同定を目指す。

B. 研究方法

研究の初年度は、HBV 感染培養細胞、およびその核酸アナログ体処置サンプルにおけ

る大規模トランスクリプトーム解析を開始する。

ヒト肝ガン細胞である HepG2 細胞、その HBV 産生株である Hep2. 2. 15 細胞¹（各 2×10^7 細胞からスタート）を、5%FBS 添加 ASF10 培地を用いて培養し、無処置サンプルおよび核酸アナログ体であるラミブジン、アデフォビル、テノフォビル処置してウイルスの産生を抑えたサンプルを独立に各 3 サンプル調製する。処置後、細胞は培地を除き、PBS で十分に洗った後に、Qiazol 溶液を加えて均一に溶解して回収する。次に、小分子 RNA も含めて全 RNA が抽出可能な miRNAeasy キットを用いてトータル RNA を高純度に精製し、ナノドロップおよびバイオアナライザーで収量と RNA の品質をチェックする。RNA は、我々が持つ独創的な解析技術である deepCAGE 法を用いて行う。deepCAGE 法は、キャップがついている mRNA を次世代シーケンサーにより、プロモーターレベルで大規模解析する技術である²。また、miRNA 等の小分子 RNA を解析するために、小分子 RNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーでの解析に供する。さらに、Illumina beads array（マイクロアレイ）を用いた遺伝子レベルでの発現解析も並行して行う。

（倫理面への配慮）

今年度のは培養細胞モデルを用いた研究であり、倫理面での配慮は必要としない。

C. 研究結果

HepG2 細胞と Hep2. 2. 15 細胞を用いて、無処置、3 種類の核酸アナログ体処置サンプルを各 3 サンプル (triplicates) 調製した。Qiazol 溶解した細胞溶液の 3 分の 1 量

を用いて RNA 抽出を行ったところ、40-170ug 範囲でのトータル RNA を回収することができた。処置による収量の差は特に観察されなかった。OD260/280 比は全てのサンプルにおいて 2.0 前後で良好だった。OD260/230 比では通常 1.8-2.0 程度の値を取るが、4つのサンプルについては 1.5-1.7 の値を示したため、再精製を行った。また、バイオアナライザーでも良好な RIN 値 (10.0) を示し、以上から高純度高品質な RNA を回収することができた。

次にこの RNA を各 0.5ug 用いて Illumina Beads Array（マイクロアレイ）による遺伝子発現プロファイルを作成した。アレイの測定結果は標準化し、各サンプル間の遺伝子レベルでの発現差解析に着手した。詳細には統計的な解析が必要であるが、無処置と比較して 2 倍以上の発現増加、減少を示すプローブは多い場合でも 1 % 程度と非常に少なく、また、変化率も 2-3 倍程度がほとんどであり、劇的な発現変動を示す遺伝子プローブは検出されなかった。Hep2. 2. 15 細胞にアデフォビル及びテノフォビルを投与したサンプルでは、共通に発現変動する遺伝子プローブが相当数観察されている反面、ラミブジン投与サンプルでは発現変動するプローブは非常にわずかししか検出されていない。

deepCAGE 法による mRNA の解析と小分子の解析については、各々についてライブラリーの作成が終了し、次世代シーケンサーによるデータの生産を開始した。

D. 考察

培養細胞を用いた本トランスクリプトーム解析については、ようやく研究のスタートにたどり着いた感があり、今後、詳細な

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書

解析が必要である。次世代シーケンサーを用いた deepCAGE データ、小分子 RNA データについても順次解析を行ってゆき、HBV 感染と核酸アナログ体「治療」による宿主トランスクリプトームの実態を明らかにしてゆく。なお、培養細胞系は、十分量のサンプル確保が可能という利点がある反面、in vivo を反映するのかなど系には制限がある。HBV の感染初期に起きるイベントを捉えることも難しいことから、ヒト肝細胞を移植したマウス個体や、そこからとりだしたキメラマウス肝細胞を用いた感染実験によるサンプルでの解析が必要となってくると思われる。また、グループ全体では臨床サンプルの準備も始まっており、どのような切り口で解析をするかについても考えてゆく必要がある。

E. 結論

ヒト肝ガン培養細胞を用いた HBV 感染細胞、その核酸アナログ体による処置サンプルを作成し、大規模トランスクリプトーム解析を開始した。

F. 参考文献

1. Sureau C. et al. Cell 47, 37-47, 1986.
2. Kanamori-Katayama M. et al. Genome Res. 21, 1150-1159, 2011.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Schroder K, Irvine KM, Taylor MS, Bokil NJ, Le Cao KA, Masterman KA, Labzin LI, Semple CA, Kapetanovic R, Fairbairn L, Akalin A, Faulkner GJ, Baillie JK, Gongora M, Daub CO, Kawaji H, McLachlan GJ,

Goldman N, Grimmond SM, Carninci P, Suzuki H, Hayashizaki Y, Lenhard B, Hume DA, Sweet MJ. Conservation and divergence in Toll-like receptor 4-regulated gene expression in primary human versus mouse macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 109, E944-53 (2012)

2)Suzuki T, Nakano-Ikegaya M, Yabukami-Okuda H, de Hoon M, Severin J, Saga-Hatano S, Shin J, Kubosaki A, Simon C, Hasegawa Y, Hayashizaki Y, Suzuki H. Reconstruction of Monocyte Transcriptional Regulatory Network Accompanies Monocytic Functions in Human Fibroblasts. PLoS One.7 , e33474 (2012)

3)Shin JW, Suzuki T, Ninomiya N, Kishima M, Hasegawa Y, Kubosaki A, Yabukami H, Hayashizaki Y, Suzuki H. Establishment of single-cell screening system for the rapid identification of transcriptional modulators involved in direct cell reprogramming. Nucleic Acids Res. 40, e165 (2012)

2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究

網羅的比較定量プロテオミクスを用いた新規標的分子の探索

研究報告者 金井好克 国立大学法人大阪大学 教授

共同研究者

永森收志（大阪大学大学院医学系研究科 助教）

【研究要旨】

本研究は、抗 B 型肝炎ウイルス（HBV）薬開発のために HBV の感染・増殖機構における新規標的分子の探索を網羅的比較定量プロテオミクス技術によって行うことを目的とする。定量型質量分析計によるタンパク質の同定定量を行い、感染許容細胞・非許容細胞、感染細胞・非感染細胞あるいは感染動物・非感染動物などを比較し、これらの試料において発現量が異なるタンパク質を特定することで、新規標的分子候補を絞り込む。そのための網羅的比較定量プロテオミクス解析系を構築し、本年度は培養細胞およびマウス肝臓を用いた解析を行った。また、大規模スクリーニングによりヒットした化合物の作用機序を明らかにするためにシグナルの網羅的解析を可能とする比較定量プロテオミクス技術を確立した。

A. 研究目的

抗 B 型肝炎ウイルス（HBV）薬開発のために、HBV の感染・増殖機構における新規標的分子の探索を網羅的比較定量プロテオミクス技術によって行うことを目的とした。さらに大規模スクリーニング研究によって見いだされるヒット化合物の作用機序を明らかにするために、シグナルの網羅的解析を可能とする比較定量プロテオミクス解析系の構築を進めた。新規標的分子の探索のためには、他の研究グループと協力し、感染許容細胞・非許容細胞、感染細胞・非感染細胞および感染動物・非感染動物などを用いる。ヒット化合物の作用機序解明についてもスクリーニング班とだけでは無く、他の研究グループと密に連絡を取り、オミクス解析による情報を統合し、作用機序の全貌解明を目指して

いる。

B. 研究方法

感染許容細胞・非許容細胞、感染細胞・非感染細胞あるいは感染動物・非感染動物を比較した網羅的比較定量プロテオミクス技術の確立のため、ヒト肝由来 FLC4 細胞(Laurent *et al*)を用いて検討した。膜タンパク質の網羅的プロテオミクス法(金井、永森他 特願 2012-37919)に従い、単層培養した FLC4 細胞と三次元培養装置ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)で培養した FLC4 細胞から、細胞質膜に富んだ膜画分を密度勾配遠心法により調整し、さらにペプチド化した。得られたペプチドに対して、質量分析計 Thermo Q Exactive (ベンチップ型四重極 Orbitrap) に ナノ LC Michrom Bioresources Advance UHPLC を接続した

nano LC-MS/MS システムを用いてショットガンプロテオーム解析を行った。タンパク質配列解析は、解析ソフトウェア Thermo ProteomeDiscoverer をプラットフォームとした 2 種の解析アルゴリズム Matrix Science Mascot および University of Washington SEQUEST により、UniProt データベースを用いて行った。比較定量には、網羅性に優れるペプチドのプレカーサーイオンを利用した non-label semi quantitate method を使用した。同定、比較定量したタンパク質については、Ingenuity Pathway Analysis を用いてネットワーク解析を行った。

また、非感染動物-感染動物サンプルや臨床サンプルを用いた解析を行うため、マウスより摘出した肝臓から粗膜画分を調整し、これを用いて肝プロテオミクス解析系を確立した。さらに、HeLa 細胞を用いてシグナルの網羅的解析を可能とする比較定量プロテオミクス技術を確立した。

（倫理面への配慮）

実験動物を使用する実験計画は、動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、動物の愛護及び管理に関する法律（昭和 48 年法律第 105 号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成 18 年環境省告示第 88 号）、動物の殺処分方法に関する指針（平成 19 年環境省告示第 105 号）、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年文部科学省告示第 71 号）等に基づいて実施した。またすべての動物実験は大阪大学動物実験委員会による承認を経て、「大阪大学動物実験規程」にしたがって行った。ヒト臨床サンプルを使用する実験は、本年度は含まれ

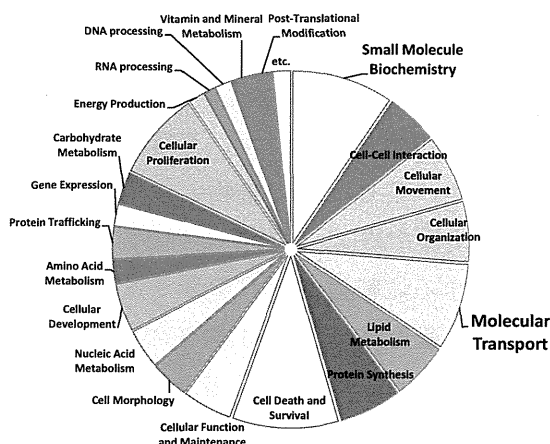
ていない。

C. 研究結果

単層培養 FLC4 細胞（mono）と三次元培養 FLC4 細胞（RFB）の膜画分に同定されたタンパク質分子は、合計 2440 種類であった。そのうち、単層培養時と三次元培養における量の変動値（RFB/mono）が 0.5 から 1.5 の間で有り、変動が少なかったタンパク質は 1022 種類であった。2 倍以上 RFB で増加したタンパク質は 462 種類有り、そのうち mono で検出できなかったが RFB で検出されたタンパク質は 186 種類であった。2 倍以上 RFB で減少したタンパク質は 956 種類で、mono で検出されたが、RFB で検出できなかったタンパク質分子は 697 種類であった。

三次元培養した細胞で増加したタンパク質を機能で分類した結果を図 1 に示す。

図 1 三次元培養時（RFB）で増加した 462 タンパク質の分類



マウス肝臓から調整した膜画分のプロテオミクス解析の結果、959 種類のタンパク質が定量可能な分子として同定された。データ

ベースによる局在解析によると、このうち 622 種類が membrane、65 種類が extracellular に局在していると分類された。membrane に局在すると分類された分子の中には B 型肝炎ウイルス(HBV)の感染受容体であると報告された SLC10A1/NTCP (Yan H et al. eLife: e00049, 2012) が含まれており、質量分析計を用いた網羅的プロテオミクスによる SLC10A1/NTCP 検出に成功している。

また、スクリーニング班が計画している大規模スクリーニングによりヒットした化合物の作用機序を明らかにするため、シグナルの網羅的解析を可能とする比較定量プロテオミクス技術を確認した。

D. 考察

単層培養 FLC4 細胞 (mono) と比較して、三次元培養 FLC4 細胞 (RFB) の膜画分において多数のタンパク質の発現変動が検出された。FLC4 細胞は、三次元培養を行うことによりウイルス感染性を獲得することが、複数の研究グループから報告されていることから、これら変動の見られたタンパク質のなかに感染性の獲得において重要な役割を担っている分子が存在する可能性が示唆される。

E. 結論

抗 B 型肝炎ウイルス (HBV) 薬開発のために、HBV の感染・増殖機構における新規標的分子の探索、および大規模スクリーニングによりヒットした化合物の作用機序の解明に用いる、培養細胞を用いた網羅的発現変動プロテオミクス技術を確認した。

また、非感染動物-感染動物サンプルや臨床サンプルを用いた網羅的発現変動プロテオミクスを行うため、基盤技術としての肝

プロテオミクス解析系を確認した。

F. 参考文献

1. Laurent T, Kataoka Y, Kobayashi S, Ando M, Nagamori S, Oda H. Spherical cell shape of FLC-4 cell, a human hepatoma cell, enhances hepatocyte-specific function and suppresses tumor phenotype through the integration of mRNA-microRNA interaction. *Biol Open*. 2012;1(10):958-64.
2. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Elife. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 2012;1:e00049.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka H, Takafuji K, Taguchi A, Wiriyasermkul P, Ohgaki R, Nagamori S, Suh PG, Kanai Y. Linkage of N-cadherin to multiple cytoskeletal elements revealed by a proteomic approach in hippocampal neurons. *Neurochem Int*. 2012; 61: 240-250.
2. Mpamhanga CP, Sharman JL, Harmar AJ; NC-IUPHAR; Alexander SP, Bonner TI, Catterall WA, Christopoulos A, Davenport AP, Dollery CT, Enna S, Harmar AJ, Kaibuchi K, Kanai Y, Laudet V, Neubig RR, Ohlstein EH, Peters J, Pin JP, Ruegg U, du Souich P, Spedding M, Wright MW. How to use the IUPHAR receptor database to navigate pharmacological data. *Methods Mol Biol*. 2012; 897: 15-29.
3. Wiriyasermkul P, Nagamori S, Tominaga H, Oriuchi N, Kaira K, Nakao H, Kitashoji T, Ohgaki R, Tanaka H, Endou H, Endo K, Sakurai H, Kanai Y. Transport of 3-fluoro-L- α -methyl-tyrosine by tumor-upregulated L-type amino acid transporter 1: a cause of the tumor uptake in PET. *J Nucl Med*. 2012; 53: 1253-1261.
4. Kaira K, Sunose Y, Arakawa K, Ogawa T, Sunaga N, Shimizu K, Tominaga H, Oriuchi N, Itoh H, Nagamori S, Kanai Y, Segawa A, Furuya M, Mori M, Oyama T, Takeyoshi I. Prognostic significance of L-type amino-acid transporter 1 expression in surgically resected pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2012; 107: 632-638.