

集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)

29) DENG Lin, 金子 昌裕, 河本 真理, 姜 大鵬, 勝二 郁夫, 堀田 博. C型肝炎ウイルス感染による転写因子FoxO1 脱リン酸化の分子機序の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪

30) 陳 明, 甘 翔, DENG Lin, 勝二 郁夫, 堀田 博. C型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質の新規結合因子ヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の同定と機能解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪

31) 松井 千絵子, 勝二 郁夫, DENG Lin, 堀田 博. C型肝炎ウイルスによる GLUT2 遺伝子発現抑制の分子機構. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪

32) 姜 大鵬, Ratnoglik Lulut Suratno, 青木 千恵, Deng Lin, 勝二 郁夫, 堀田 博. C型肝炎ウイルスに対する予防および治療ワクチン開発に関する研究. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪

33) 内海 孝子, 堀田 博. 神戸大学インドネシア拠点の紹介. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012. 大阪 (シンポジウム)

34) 中島 謙治, 竹内 健司, 千原 一泰, 堀口 朋子, 孫 雪東, Deng Lin, 勝二 郁夫, 堀田 博, 定 清直. C型肝炎ウイルス NS5A 蛋白質の Src homology 2/3 ドメイン結合能と B 細胞での発現による Src ファミリーキナーゼ Fyn の活性化. 第35回日本分子生物学会年会, 2012. 福岡.

35) 勝二 郁夫, 松井 千絵子, 兼田 崇作, Imelda Rosalyn Sianipar, Deng Lin, 堀田 博. C型肝炎ウイルス感染は HNF-1  $\alpha$  の発現を負に制御し GLUT2 遺伝子発現を抑制する. 第35回日本分子生物学会年会, 2012. 福岡.

36) 西瀬 雄子, 斎藤 貴史, 富田 恭子, 佐藤 智佳子, 石井 里佳, 芳賀 弘明, 奥本 和夫, 渡辺 久剛, 今井 康陽, 堀田 博, 上野 義之, 河田 純男. C型肝炎ウイルス 1b の NS3 領域蛋白質 2 次構造を基にしたサブグループ分類と肝細胞癌発生の関連性に関する前向き研究(第 2 報). 第48回日本肝臓学会総会, ワークショップ, 2012. 金沢.

37) 金 守良, 井本 勉, 堀田 博, 金 啓二, 谷口 美幸, 小牧 孝充, 井出 良浩, 勝二 郁夫. 2 者併用療法における relapse 例と NVR 例の 3 者併用療法時 SVR 予測の試み. 第48回日本肝臓学会総会, ワークショップ, 2012. 金沢.

38) 金 守良, 井本 勉, 金 啓二, 谷口 美幸, 小牧 孝充, 井出 良浩, 勝二 郁夫, 堀田 博. PEG-IFN/RBV(2 者併用療法)の SVR 予測における IRRDR 変異数の検討. 第48回

日本肝臓学会総会, 2012. 金沢.

39) 金 守良, 井本 勉, 堀田 博, 金 啓二, 谷口 美幸, 小牧 孝充, 井出 良浩, 勝二 郁夫. PEG-IFN/RBV(2 者併用療法)の治療効果に関するウイルス因子とウイルス排除機序の検討. 第48回日本肝臓学会総会, 2012. 金沢.

40) 瀬尾 靖, 矢野 嘉彦, 斎藤 雅也, 三木 章, 勝二 郁夫, 堀田 博, 東 健. プロテアーゼ阻害薬併用時代での PEG-IFN $\alpha$ -2a /Ribavirin療法的位置付け. 第16回日本肝臓学会大会, 2012. 神戸.

41) 金 守良, El-Shamy A, 堀田 博. 2型C型慢性肝炎に対するPEG-IFN/RBV併用療法(併用療法)の治療効果に与えるウイルス因子, 宿主因子の検討. 第16回日本肝臓学会大会, 2012. 神戸.

42) 飯島沙幸, 渡邊綱正, 松浦健太郎, 飯尾悦子, 新海登, 村上周子, 田中靖人. 末梢血単核球を用いたC型慢性肝炎患者PEG-IFN/RBV投与直後のISG挙動 第20回日本消化器関連学会週間(第16回日本肝臓学会大会), 2012, 神戸.

43) 飯島沙幸, 渡邊綱正, 田中靖人. C型慢性肝炎患者インターフェロン投与直後の遺伝子発現変動 第60回日本ウイルス学会, 2012, 大阪

44) 森園翔一郎, 岡本実佳, 濱崎隆之, 張 旭, 隅田泰生, 馬場昌範. コンドロイチン硫酸の抗HIV-1効果について. 第49回日本ウイルス学会九州支部総会, 2012年8月24日, 那覇.

45) 馬場昌範, Mohammed TA Salim, 濱崎隆之, 岡本実佳, 渡士幸一, 浦田泰生, 青山 洋, 杉田和幸, 橋本祐一. 新規フェナンスリジノン誘導体の抗HCV効果について. 第49回日本ウイルス学会九州支部総会, 2012年8月25日, 那覇.

46) 蝶野英人, 岡本実佳, 井上晃一, 百々克行, 津田大嗣, 川野泰広, 濱崎隆之, 馬場昌範, 峰野純一. RNA分解酵素MazFを用いたHIV-1感染症遺伝子治療法の開発. 第26回日本エイズ学会学術集会, 2012年11月25日, 横浜.

47) 濱崎隆之, 岡本実佳, 馬場昌範. Tat依存性のHIV-1産生を抑制する新規低分子化合物の同定. 第26回日本エイズ学会学術集会, 2012年11月25日, 横浜.

48) 森川賢一. 第48回日本肝臓学会総会ワークショップ 18「C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略」C型肝炎

炎ウイルス非構造蛋白3-4Aプロテアーゼにより切断される新規宿主蛋白の探索.金沢、2012年6月7-8日.

49) 池田敦之、丸澤宏之、千葉 勉. 次世代シーケンサーの肝疾患診療への応用. 第 54 回日本消化器病学会. 2012/10/10-13. 神戸国際展示場、ポートピアホテル、神戸国際会議場. 兵庫.

50) 那須章洋、丸澤宏之、千葉 勉. 本邦における薬剤耐性 HCV クローンの潜在頻度の次世代シーケンサー解析. 第 48 回日本肝臓学会総会. 2012/6/7-8. 石川県立音楽堂、ホテル日航金沢、ANA クラウンプラザホテル金沢. 石川.

51) 金秀基、上田佳秀、丸澤宏之、羽賀博典、上本伸二、千葉 勉. 肝移植後 C 型肝炎治療の重大な有害事象. 第 48 回日本肝臓学会総会. 2012/6/7-8. 石川県立音楽堂、ホテル日航金沢、ANA クラウンプラザホテル金沢. 石川.

G知的所有権の出願・登録状況

なし

## II. 分担研究報告

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（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究分担者：国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

分担研究課題：B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明の総括

研究要旨： B型肝炎は逆転写酵素阻害剤が臨床に導入されて抗ウイルス療法が可能となった。しかし、逆転写酵素阻害剤単剤の治療ではウイルス排除に向けた根治は困難で、ウイルス量の制御のために抗ウイルス薬を中止することも難しい。さらに薬剤耐性ウイルス出現のリスクがある。従って、多くのB型肝炎ウイルスキャリアの治療法開発、改善のために新たな抗B型肝炎ウイルス治療薬の開発が望まれている。しかし、B型肝炎の基礎研究は必ずしも進んでいない。

そこで本研究ではB型肝炎の新規治療薬開発に向けて、ウイルスの感染複製増殖機構の解明を目指す。B型肝炎ウイルスは標的細胞の表面に吸着した後、細胞内へ侵入し、そのヌcleoキャプシドが核へ運ばれる。核内でヌcleoキャプシド内の不完全二重鎖 DNA が完全二重鎖となり、いわゆるcccDNAとなる。cccDNAからは複数のウイルス RNA が転写され、転写された RNA から翻訳されるコアタンパクが形成するキャプシドに pregenomic RNA が逆転写酵素と共にパッケージングされ、ヌcleoキャプシドを形成する。pregenomic RNA はキャプシド内でマイナス鎖 DNA に逆転写され、さらにプラス鎖 DNA が合成され不完全二重鎖 DNA となる。ヌcleoキャプシドはHBs 抗原を表面に持つエンベロープを被り、ウイルス粒子が完成して細胞外へ分泌される。このウイルスの生活環の各過程を詳細に検討し、関与する宿主因子の同定などを通じてそのメカニズムを解明する。さらに、各過程の解析から新たな抗ウイルス薬標的を同定する。本研究班はB型肝炎研究の基盤を支える若手研究者を育成し、他のB型肝炎創薬研究班との連携を進める。

A. 研究目的

HBV に対する新規治療薬開発に向けて、HBV 感染複製増殖機構の解明を目指す。ウイルスの生活環の各過程を網羅的かつ詳細に検討し、関与する宿主因子の同定などを通じてそのメカニズムを解明する。さらに、各過程の解析から新たな抗ウイルス薬標的を同定する。下記の研究項目について研究を進める。

1. ウイルス生活環各ステップを制御する因子の同定とその分子メカニズム解析、
2. 初期感染過程（ウイルス吸着から侵入、核への輸送）の解析、
3. cccDNA 転写機構、ウイルスゲノムインテグレーション機構、ウイルスゲノム複製機構の解析、
4. ウイルス構造蛋白質、逆転写酵素の発現、酵素活性、構造の解析、
5. ウイルス粒子

形成および分泌機構の解析、6. PreS 抗原、HBc 抗原、HBx 抗原の発現、機能、構造の解析、の研究を実施する。また、各分担研究者の研究を支援し、班内および他の班との共同研究を実施する。

B. 研究方法

ヒト肝細胞移植キメラマウスへのHBV感染モデルの樹立

NOG マウスは、重度複合免疫不全マウスで、NOD/ShiJic-*scid*マウスと IL2 レセプターガンマ鎖ノックアウトマウス（X 染色体の IL2 レセプターガンマ鎖遺伝子の第 7,8 エクソンを破壊）を戻し交配したものである。実中研で樹立された（Ito et al, Blood 2002 100(9): 3175-3182)。一方、マウス

アルブミンプロモーターによりウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベーターを発現するトランスジェニックマウス (AL-uPA マウス) は NOD マウスをもとに作製され、生後肝不全を発症する。AL-uPA マウスを NOG マウスと戻し交配し、ホモ化したものが uPA-NOG マウスである (Suemizu et al, BBRC 2008 377:248-252)。uPA-NOG マウスは実中研で樹立され、実中研より供給される。しかし、実中研から供給される AL-uPA マウスはトランスジーンがホモ接合体とヘミ接合体の混合の場合があり、その際は血清トランスアミナーゼを測定して肝障害が認められるマウスがホモ接合体であり、移植肝細胞が効率よく定着する。凍結ヒト肝細胞を uPA-NOG マウスに経脾臓的に移植する。uPA 発現による肝移植の効果を確認するため SCID マウスに対する肝移植も実施する。ヒト肝細胞移植 uPA-NOG マウスに B 型肝炎ウイルスを接種し、肝臓内でのウイルス増殖と組織像、さらに接種後部分採血した血液中のウイルスを解析する。

(倫理面への配慮) 各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株あるいは市販されている肝細胞であり倫理面での問題は無いと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報を厳格に管理保存する。

#### C. 研究結果

ヒト肝細胞移植キメラマウスへの HBV 感染モデルの樹立

市販の初代ヒト肝細胞を経脾臓的に AL-uPA マウスへ移植した。移植後は経時的に血中のヒトアルブミン濃度を測定した。実験開始当初はアルブミン値は 30-150ug/ml 程度とあまり上昇しなかったが、脾

臓への肝細胞の移植手技や移植に用いる肝細胞のロットにより移植効率変動することがわかった。その後は 1000-4000ug/ml 程度のアルブミン値が得られた。1800ug/ml 以上のアルブミン値を示したマウス 5 匹に遺伝子型 D の HBV を接種した。2 匹に  $10^6$  copy, 3 匹に  $10^7$  copy の HBV DNA を静脈内に接種した。 $10^7$  copy 接種のマウス 3 匹中 2 匹は接種後 1-2 週間で血液中 HBV DNA の上昇を確認し、7-8 週間には  $10^9$  copy/ml に到達した。 $10^6$  copy 接種マウスも 1 匹も 4 週間から血液中の HBV DNA が上昇を開始し、1 2 週間には  $10^9$  copy/ml に到達した。残りの 2 匹は 5-8 週間目から HBV DNA が上昇し始めたが、 $10^6$  から  $10^8$  copy/ml にしか到達しなかった。

#### D. 考察

これまでの肝炎対策研究により HCV の基礎研究は飛躍的に進み、HCV キャリアに対する抗ウイルス療法は改善されてきた。しかし、HBV キャリアに対する治療法は未だに不十分であり、より良い治療法を提供することが必要である。HCV 研究の経験からもウイルスの基礎研究の進展が効果的な新規抗ウイルス薬の開発に最も重要と考えられる。従って、B 型肝炎に対する創薬研究を進めるために HBV の感染複製増殖機構の解析はすべての研究の要となる。我が国における HBV 研究のレベルを世界最高水準に引き上げることを目指す。また、B 型肝炎創薬研究では研究班の間の連携が重要である。本研究の研究成果はウイルス培養系・動物モデル開発・創薬スクリーニングなどの研究班に提供する。また、肝炎ウイルス研究にかかわる若手研究者の育成をおこなう。今年度は、研究班会議を 2 回実施した。また、肝炎研究基盤整備事業により感染研ウイルス第二部で実施している肝炎ウイルスセミナーやシンポジウムにも研究班の分担研究者の研究室に所属する若手研究者に参加を呼びかけた。

今年度は実中研から供給された NOG マウスをバックボーンとした uPA トランスジェニックマウスにヒト肝細胞を効率よく移植することができた。このヒト肝細胞キメラマウスには HBV が感染可能であるこ

とを確認した。今後 HBV 感染実験動物モデルとして  
様々な研究に利用できる。

#### E. 結論

uPA-NOG マウスにヒト肝細胞を移植して、HBV 感  
染感受性を確認した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. 渡士幸一、内田奈々、大東卓史、史与原知子、  
鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆宇、IL1 および TNF- $\alpha$   
の B 型肝炎ウイルス感染阻害活性、第 60 回日本ウ  
イルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012,  
11. 13-15)

#### G. 知的所得権の出願・登録状況

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（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究分担者：鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授

分担研究課題：HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析

研究要旨：本研究では、阻害剤探索の新たな標的分子を見出すため、HBV 遺伝子発現におけるプレゲノム RNA の核外輸送及びスプライシングの分子機構の解明を行う。HBV の転写後調節には、PRE (post-transcriptional regulatory element) と呼ばれる RNA 領域が関与することが報告されているものの、PRE と結合して実際に転写後調節に機能する分子は何かなどその分子機構は全くといってよいほど明らかにされていない。今年度、ヒト肝がん細胞の核抽出物を用いた HBV-PRE 結合因子の網羅的な解析から、23 種類の宿主細胞タンパク質を同定した。これらには RNA の二次構造、二重鎖 RNA を認識するもの、mRNA の輸送、スプライシングに関与するものなどが含まれていた。今後、これらの宿主因子の機能解析を通じて HBV-RNA の核外輸送、スプライシングの分子機構を明らかにし、新規創薬標的を見出す。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) キャリアの数は、世界的には 3 億 5000 万人にのぼると推定される。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。現行の治療薬とは機序の異なる新規治療薬の開発が待望されており、そのために HBV の感染複製増殖機構の解明が重要である。

HBV の生活環において、転写後、プレゲノム RNA (pgRNA) は細胞質へ輸送されカプシドへパッケージングされる。pgRNA の核外輸送は HBV の複製増殖に必須と考えられ、HBV RNA 内に post-transcriptional regulatory element (PRE) が存在することは知られているが、関与する宿主因子とその役割など調節機構は十分に解明されていない。また、pgRNA の一部はスプライシングされ、その意義、調節機構は必ずしも明らかでない。本研究では、HBV 遺伝子発現における pgRNA の核外輸送及びスプライシングの分子機構の解明を目指す。

B. 研究方法

HBV 遺伝子型 C 株のゲノム DNA プラスミドを基に、pgRNA の PRE 領域 (nt 1225-1585) を *in vitro* で合成し BrU 標識した。非特異的な会合を除外するためのコントロールとして antisense 鎖からも同様に標識 RNA を合成した。それらに Huh7.5.1 細胞 ( $0.7 \times 10^8$  個) の核抽出液を反応させ、抗 BrU 抗体で免疫沈降することにより PRE 領域に会合する核タンパク質を回収した。得られた共沈タンパク質を SDS-PAGE で展開し CBB 染色し、コントロールと比して有意に増加していると考えられるバンドを切り出し、プロテアーゼ消化、LC-MS/MS によりタンパク質同定を行った。

(倫理面への配慮) 株化細胞のみを用いた研究であり該当しない。

C. 研究結果

HBV-PRE に特異的に会合していると考えられるバンドを切り出し、質量分析を行ったところ、計 23 個のタンパク質が同定された。それらはすべて直接または間接的に RNA への会合が報告されているタンパク質であり、そのうちの 1 つ Polypyrimidine

tract-binding protein は HBV-PRE との会合が報告されていた。また RNA の二次構造や二重鎖 RNA を認識して会合することが報告されているものが 4 種類含まれていた。一方、23 タンパク質をタンパク質間相互作用の観点からこれまでの報告に照らし合わせ相互作用モデルを作成すると、mRNA 核外輸送にかかわる複合体の構成因子 (PRE binding Nuclear export factor: PRE-NEX 1-8) とスプライシングに関わる複合体の構成因子 (PRE binding Splicing factor: PRE-SF 1-7) および同定分子間では相互作用が報告されていない因子 (PRE binding protein: PRE-BP 1-8) に分類された。

#### D. 考察

HBV-PRE は、HBV RNA 内の約 360 base 領域で、特徴的な Stem-loop 構造をとり、HBV 遺伝子型、株間でよく保存されている。これまで、PRE に結合する宿主タンパク質として PTB などの報告があるが、実際に核外輸送、スプライシング等に関与するかは全く解析されていない。今年度、網羅的なプロテオーム解析から、23 種類の PRE 結合タンパク質を同定した。この中には、細胞由来 mRNA の輸送に関わるもの、スプライシングに関わるものがそれぞれ 8、7 種類含まれていた。また、同定したタンパク質間で

の相互作用が知られているケースも数多く存在した。今後、同定した宿主因子の中で、HBV pgRNA の輸送、スプライシングに実際に関わっている分子を、遺伝子ノックダウン及び強制発現解析で明らかにする。得られた結果を基に、宿主因子と pgRNA、宿主因子間の結合様式を解析し、最も重要な相互作用を明らかにする。HBV 複製増殖においてキーとなる宿主因子-HBV RNA の相互作用を標的とした阻害剤探索系の構築を行う。

#### E. 結論

HBV-PRE に結合する 23 種類の宿主因子を同定した。今後、これらの機能解析を通じて HBV 転写後調節の分子機構を明らかにし、新規創薬標的を見出す。

#### 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



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（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究分担者：梁 明秀（横浜市立大学医学部微生物学）

分担研究課題：HBV タンパク質の発現、酵素活性および結合因子の解析

**研究要旨** B型肝炎ウイルス（HBV）はその活発なウイルス産生と HBV 逆転写酵素の逆転写精度の不正確さから感染者生体内で多くの変異が生じることが知られており、このことが薬剤耐性ウイルスを生じさせる大きな要因となっている。実際の治療を進める上でも、薬剤耐性 HBV は最も注意すべき障害の 1 つとなっている。本研究課題では、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、HBV 逆転写酵素を合成し、in vitro におけるハイスループット薬剤スクリーニング系を構築することを目的とする。

#### A. 研究目的

核酸アナログ製剤は HBV の逆転写酵素を阻害し、ウイルスの増殖を抑える新しい HBV の抗ウイルス剤として臨床上注目されている。しかしながら、長期の治療による薬剤耐性ウイルスの出現が問題となっており、薬剤耐性の少ない新たな薬剤の開発が望まれている。一方で、HBV 逆転写酵素を対象とした in vitro 酵素活性アッセイ法の報告は現在のところ皆無である。その原因としては、1) 既存の大腸菌や昆虫細胞系において HBV 逆転写酵素タンパク質の発現および可溶化がきわめて困難である、2) HBV-P 遺伝子を目的とする発現ベクターにインフレームで組換える必要がある（組換え DNA 委員会の承認が必要）、3) 発現を誘導後、細胞を破壊してタンパク質を可溶化させた後、アフィニティカラムを用いてタンパク質を精製しなければならない、4) 精製した HBV 逆転写酵素の活性測定に適したハイスループットアッセイ法が開発されていない、などの問題があった。本研究課題では、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、HBV-P 遺伝子産物である逆転写酵素を合成し、in vitro におけるハイスループット薬剤アッセイ系を構築することを目的とする。

#### B. 研究方法

Hepatitis B virus DNA, complete genome, clone: Ae\_US および Hepatitis B virus DNA, complete genome, clone: C\_JPNAT の逆転写酵素領域をヒト化コドンで最適化した人工 DNA を作製した。PCR 法を用いて、鋳型 DNA の構築を行い pEU-E01 に挿入した。次にコムギ無細胞タンパク質合成系により HBV DNA ポリメラーゼ全長タンパク質および逆転写酵素+RNaseH 領域タンパク質を合成した。逆転写酵素の活性は、primer として DIG 標識した DNA を用い、合成される DNA に標識核酸(ビオチン標識 dUTP)を取り込ませることにより AlphaScreen を用いて検出した。また、鋳型を各阻害剤で対応できるように合成部分がランダム配列になるよう 40mer の RNA 鋳型を設計した。また、PolyA40mer を鋳型としたアッセイを同時に実施した。

#### C. 研究結果

##### 1. HBV-polymerase 合成および可溶化の検討

HBV DNA ポリメラーゼ全長：HBV polymerase full length および HBV 逆転写酵素+RNA 分解酵素領域（HBV polymerase /RT domain + RNaseH domain）の転写鋳型を作製し、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて翻訳を行った。その結果、

HBV DNA ポリメラーゼ全長タンパク質の合成量はきわめて少なく、また非常に不溶性の高い蛋白質であった。可溶化および合成量を増加させるため、NaCl 添加を試みたが可溶化は見られなかった。次に、種々の界面活性剤を添加して合成を行ったところ界面活性剤の種類と濃度によって可溶化を促進するものが見られた。今後は合成された逆転写酵素の活性確認を行い、適した Detergent の選択を行う。

## 2. AlphaScreen による Reverse Transcriptase 活性検出

3'側にビオチン化したプライマーおよび、DIG 標識した基質 dNTP を添加し、各種 RT の存在下で合成反応を行った。次にアルファスクリーン試薬 (スロレプトアビジンコートアクセプタービーズ、DIG 抗体、プロテイン A コートドナービーズなど) を付加し 30 分、室温でインキュベート後、アルファスクリーン検出器 (Envision™, パーキンエルマー社) で検出をした。得られた結果を集計し、逆転写酵素活性を計算した。その結果、ランダム配列を鋳型とした場合にはバックグラウンドが高く、顕著な活性が見られなかったが、PolyA/DIG-oligo(dT)15 を用いた場合において、若干のカウントが検出された。また、検討した海面活性剤の中では、Tween-20(0.25%)が最も S/N 比が高くなっていた。

## 3. PAGE による RT 活性検出

鋳型 RNA に Cy3 標識した primer を混合後、HBV-polymerase または HIV RT を添加し、逆転写酵素阻害剤 (3TC) の存在下、非存在下において 37°C、1hr 逆転写反応を行った。その後、ポリアクリルアミド電気泳動を行い、RT による生成産物をスミアバンドにて検出した。ポジティブコントロールとした HIV-RT のバンドは、PolyA/oligo(dT), 40mer RNA/DNA primer とともに阻害剤添加により消失し、バンドが RT による生成産物であることが確認された。HBV-full および HBV-RT のレーンにおいてもスミアバンドが見ら

れたが、3TC 添加でもバンドは消失せず、また polymerase(-)のレーンにも同様のバンドが確認できていることから、これらのバンドは非特異的なものであると考えられた。今後は HBV-full および HBV-RT の合成量および活性を増加させることが必要であると考えられる。

## D. 考察

現在使用されている核酸アナログ製剤は HBV の逆転写酵素を阻害し、ウイルスの増殖を抑える効率的な抗ウイルス剤として有用性が高い。しかしながら、薬剤耐性 HBV の出現は临床上最も注意すべき障害の1つとなっている。実際に、ラミブジン初回治療患者の実に 30-40%が治療に失敗するとされており、さらには、ラミブジンからエンテカビルへの切り替え例の 15%、ラミブジンからラミブジン+アデフォビル併用に切り替え例の 5%に新たな耐性が出現したことが報告されている。このような状況下で、薬剤耐性に強い新たな非核酸系逆転写酵素阻害剤の開発は急務であると考えられる。しかしながら、HBV DNA ポリメラーゼタンパク質の発現や可溶化がネックとなり、酵素活性を指標とした *in vitro* 薬剤スクリーニング系の開発は達成されていない。本研究ではハイスループット HBV 逆転写酵素 *in vitro* アッセイ法の構築に向けた基盤研究を行った。その結果、コムギ無細胞タンパク質合成系では、界面活性剤の添加により酵素活性を有する HBV 逆転写酵素の合成が可能であることが確認された。また、AlphaScreen を用いることで、わずかな酵素活性が確認できた。また、ランダムな核酸配列を用いたアッセイでは活性が確認できなかったものの、PolyA/oligo(dT)を鋳型としたアッセイではわずかながらではあるが酵素活性が認められた。今後は RT タンパク質の可溶化および発現を増加させる最適化条件を検討することで、実際の薬剤スクリーニングに活用できるタンパク質の合成とアッセイ系の構築が可能であると考えられる。

## E. 結論

コムギ無細胞タンパク質合成系と AlphaScreen を用いた酵素活性アッセイ系を組み合わせることにより、HBV 逆転写酵素を標的とする新たな *in vitro* 薬剤スクリーニング系の構築を試みた。AlphaScreen を用いたアッセイ系では特異的な酵素活性が確認されており、今後、RT タンパク質の合成および可溶化の効率を上昇させることでアッセイ系の構築が期待できる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T. Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol.* 87(4):2120-27, 2012.
- 2) Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, Ryo A. Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu. *Sci Signal.* 245(5): ra73, 2012.
- 3) Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J Proteomics.* 75(15): 4863-73, 2012.

### 2. 学会発表等

なし

## G. 知的所得権の出願・登録状況

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（平成24年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究分担者：朴 三用  
研究協力者：杉山 佳奈子

分担研究課題：ウイルスタンパク質および関与する宿主因子の構造解析

研究要旨：B型肝炎ウイルスのタンパク質および関与する宿主因子の構造解明による感染複製増殖機構解明や、構造を基に新たな創薬基盤構築を目指す。本年度ではX蛋白質（HBx）中心に構造生物学な研究を行った。

HBx蛋白質は、宿主の細胞内において様々なシグナルカスケードの蛋白質の活性化やアポトーシスを阻害することによって細胞のがん化を促進する蛋白質である。B型肝炎ウイルス感染後の肝がんへの進行を食い止める観点において、HBx蛋白質に関する機能的、構造的知見を得ることは大変重要であるが、構造に関しては未だ何の情報も得られていない。そこで、本研究ではHBx線結晶構造解析法を用いてHBx蛋白質の構造を決定することを目的とし、蛋白質の発現実験を行っている。

A. 研究目的

HBx蛋白質は、宿主因子と相互作用し、転写の活性化補助因子として機能し、ウイルス増殖の中心的な役割を果たす。本研究では、HBx蛋白質の構造解明に向けて、蛋白質の発現系の構築を目指す。

蛋白質の構造決定を行うためには純度の高い蛋白質を大量に得る必要があり、蛋白質を安定かつ大量に発現させることは非常に重要なポイントとなっている。そこで、構造解析に用いるに十分な量の蛋白質を得ることを目的に、大腸菌発現系、バチルス発現系を用いてHBx蛋白質の発現確認を行った。

B. 研究方法

大腸菌発現系では宿主に大腸菌 BL21 (DE3) RILP 株を、ベクターに pET28 および pGEX6P を用いることによって、His-Tag 融合蛋白質および GST 融合蛋白質の発現を試みた。

バチルス発現系では *Brevibacillus* に HBx 蛋白質の遺伝子を含む pNCM02、pNY326 ベクターを導入す

ることによって HBx 蛋白質を菌体外へ分泌させる方法を試みた。

C. 研究結果

大腸菌発現系においては、His-Tag、GST 融合型共に HBx 蛋白質の発現が確認されたが、ほぼすべて不溶性であり、構造解析に用いる蛋白質を得るには至らなかった。天然変性状態を予測するアルゴリズムを用いて HBx 蛋白質のフォールディングを確認したところ、1~50 残基は構造をとっていないことが予測されたため、その部位を除いた箇所 ( $\Delta 50$ ) に関して同様の発現実験を行ったが、やはり可溶性の蛋白質を得ることは出来なかった。

バチルス発現系に関しては、そもそも蛋白質の発現が見られず、HBx 蛋白質の発現には適していない系であった。

今後は全長および  $\Delta 50$  の HBx 蛋白質の発現を目指し、昆虫細胞発現系 (Sf-9) およびヒト細胞発現系 (HEK293) を用いて発現の確認を行っていく予定で

ある。

#### D. 考察

大腸菌およびバチルスを用いて HBx 蛋白質単独での発現を試みたが、どちらも構造解析に用いるに足る資料を得ることは出来なかった。

HBx 蛋白質はそもそもヒトの細胞内で発現している蛋白質であることから、より天然に近い状態での発現を行った方が可溶性蛋白質を得る可能性は高いと考えられるため、今後は細胞を用いた発現系を用いる予定である。

また、前述のように HBx 蛋白質は宿主細胞内において様々な蛋白質と相互作用していることから、単独では強固な構造を保っていない可能性が考えられる。そこで、今後は HBx 蛋白質と相互作用する宿主蛋白質との今日発現を行い、安定な複合体を形成させることで HBx 蛋白質を得ることも試していく必要があると考えている。

#### E. 結論

細菌を用いた発現系を用いて HBx 蛋白質の発現を試みたが、全長、および構造を保っていると予想された部位に関して、どちらも可溶性の蛋白質を得ることは出来なかった。

今後は細胞を用いた発現系を試みることによって、蛋白質の大量発現を目指す予定である。

#### 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

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

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（平成24年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究分担者：菅 裕明  
研究協力者：加藤敬行、由宇夢瑠

分担研究課題：HBV タンパク質に結合する環状ペプチドの探索

研究要旨：本研究分担班は、独自に開発した RaPID システムを駆使し、B型肝炎ウイルス感染における新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指す。本研究期間に、X タンパク質および HBV 逆転写酵素等に結合する特殊ペプチドを発見し、その生物活性について検討、薬剤開発への糧となるシーズを提供する。

A. 研究目的

本研究分担班は、独自に開発した RaPID システムを駆使し、B型肝炎ウイルス感染における新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指す。本研究期間に、X タンパク質および HBV 逆転写酵素等に結合する特殊ペプチドを発見し、その生物活性について検討、薬剤開発への糧となるシーズを提供する。

B. 研究方法

当研究室で独自に開発した RaPID（Random non-standard Peptide Integrated Discovery）システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてる。本年度は、その準備として、探索にあてるライブラリーの構築、ならびに細胞表面あるいはバキュロウイルス上に発現されたタンパク質への結合特殊ペプチドの探索法の開発おこなった。（倫理面への配慮）

本研究はヴィトロを中心としており、倫理面への配慮を特に必要ないが、全て P2 レベルで実験を行っている。また、共同研究者が行う動物個体を用いた実験については、所属機関のルールに則って行う。

C. 研究結果

本年度は、標的蛋白質が共同研究者から手元に届いていないため、探索が瞬時に始められるように特殊ペプチドライブラリーの構築と、標的蛋白質の発

現・精製が困難な場合を想定し、細胞表面あるいはバキュロウイルス上に発現されたタンパク質への結合特殊ペプチドの探索法の開発おこない、その技術の確立を得た。

D. 考察

細胞表面に発現された標的に関しては、そのバックグラウンドを除去する為には、ネガティブセレクション用の細胞を用意することはもちろんのこと、非常に厳密な条件検討を必要とすることが分かった。一方、バキュロウイルス上に発現されたタンパク質では、細胞上よりもバックグラウンドを下げて探索ができることがわかり、実質的にはこの両者の組み合わせによる探索が好ましいと考えている。

E. 結論

来年度に向け、特殊ペプチド薬剤の探索を開始できる準備が完了した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) C. J. Hipolito, H. Suga “Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: The FIT and RaPID systems” Current Opinion in Chemical Biology 16 196-203 (2012)

- 2) Y. Hayashi, J. Morimoto, H. Suga “In vitro selection of anti-Akt2 thioether-macrocylic peptides leading to isoform-selective inhibitors” ACS Chemical Biology 7, 607-613 (2012)
- 3) K. Iwasaki, Y. Goto, T. Katoh, H. Suga “Selective thioether macrocyclization of peptides having the N-terminal 2-chloroacetyl group and competing two or three cysteine residues in translation” Organic & Biomolecular Chemistry 10, 5783-5786 (2012)
2. 学会発表
- 1) Hiroaki Suga 「The nontraditional peptide therapeutics」 AACR Annual Meeting, Chicago, IL USA; 3.31.2011-4.4. 2012
- 2) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Natural Product-Like Peptides against Therapeutic Targets」 Asia TIDES Oligonucleotide and Peptide Research, Technology and Product Development, Las Vegas, NV USA; 5.20-5.23. 2012
- 3) Hiroaki Suga 「Non-Traditional Peptide Therapeutic Leads」 Colby-Sawyer College New London, NH USA; 8.5-8.10. 2012
- 4) Hiroaki Suga 「RaPID system: A new discovery tool of natural product-like peptides from de novo libraries」 3rd International Symposium on DNA-encoded chemical libraries, Zurich, Switzerland; 8.20. 2012
- 5) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 EFMC-ISMC 2012 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry, Berlin, Germany; 9.2-9.6. 2012
- 6) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 ICCP2012-International Conference on Circular Proteins, Heron island, Australia; 10.14-10.17. 2012
- 7) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 13th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Bangkok, Thailand; 11.25-11.27. 2012
- 8) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 13th Tetrahedron Symposium, Taipei, Taiwan; 11.27-11.30. 2012
- 9) Hiroaki Suga 「RaPID Discovery of Non-Traditional Peptide Drug Leads」 Flexizyme, FIT and RaPID: The enabling technologies for probes discovery, Olmué, Chile; 12.2-12.6. 2012
- G. 知的所得権の出願・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

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（平成24年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究分担者： 千葉 勉（京都大学医学研究科消化器内科）

分担研究課題： HBV ゲノムを誘導発現可能なマウスモデルの作成と解析

**研究要旨：** B型肝炎ウイルス (HBV) 感染により、無症候性キャリア、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎、肝硬変から肝細胞癌に至るまで、さまざまな病態が生じることが知られている。しかしながら、HBV に対する新しい創薬をめざすためには、これら多様な免疫応答により惹起される病態を模倣したモデルマウスの樹立が急務である。そこで本研究課題では、HBV 感染が肝細胞に成立することにより免疫応答を誘導することができる新しいモデルマウスの樹立を目的とし、HBV 感染に起因する肝疾患の病態解明と創薬ターゲットの絞り込みをめざす。すなわち、任意の時期に肝細胞にB型肝炎ウイルス全タンパク質を発現し、肝炎としての免疫応答を惹起する新しい誘導型トランスジェニックマウスの作成を進め、その表現型の解析を行う予定としている。

**A. 研究目的**

B型肝炎ウイルス (HBV) 感染により形成されるさまざまな病態は、ウイルス側の要因と宿主側の免疫応答の両者の相互作用により形成されるものと推定される。

HBV 感染では、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎～肝硬変、肝細胞癌、無症候性キャリア、といった多様な病態が生じることが特徴である。これらの病態形成には、宿主側の免疫応答が中心的な役割を果たしており、肝細胞からのウイルス排除には自然免疫・獲得免疫の両者の関与が必要となる。このため、HBV に対する新しい創薬をめざすためには、これら多様な免疫応答により惹起される病態を模倣したモデルマウスの樹立が急務である。しかしながら、ヒトと同様に、マウスでも胎児期からわずかでも HBV 抗原提示が潜在すると免疫寛容状態となり、肝炎を模倣する免疫応答が生じないということが障壁となり、HBV 感染が肝細胞に成立することにより免疫応答を惹起する B型肝炎の病態を模倣するモデルマウスはほとんどない。そこで、胎児期には厳密にウイルスタンパク質の発現を制御し、生後、任意の時期に薬剤誘導性にウイルスタンパク質を肝細胞に発現する新規 B型肝炎モデルマウスを樹立し、

HBV 感染に起因した肝炎の病態解明と創薬ターゲット候補の絞り込みを本研究課題の目的とする。

他方、ウイルス側の要因としては、ウイルスゲノムの変異により特徴づけられる。すなわち、HBV 感染の最大の特徴のひとつとして、ウイルスゲノム配列に非常に高頻度に塩基変化が生じていることがあげられ、HBV 感染者では、単一の宿主内においても互いに類似の配列を有する多数の変異クローンの集合体としてウイルス感染が成立している。この多彩な変異ウイルスが、HBV 感染時の病態形成や抗ウイルス治療への感受性・抵抗性と深く関連している。例えば、HBV ゲノムの pre-Core 領域の 1892 番目のクローンが変異型になったウイルスクローン (pre-Core 変異株) は、HBe 抗原から HBe 抗体への seroconversion の成立に関与するとともに、劇症肝炎症例の血中に高頻度に検出されることが知られている。しかしながら、これまでの遺伝子解析方法では、生体内に感染した多彩な変異ウイルスクローンの全体像を把握することは困難であった。そこで、次世代シーケンサーを駆使した deep sequencing を HBV ゲノム解析に適応することにより、多様な肝疾患病態形成や治療感受性に関与するウイルスゲノム変化の詳細な検討を同時に進めていく。



## B. 研究方法

### 1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

任意の時期に肝細胞に B 型肝炎ウイルス全タンパク質を発現し、肝炎としての免疫応答を惹起する新規モデルマウスの作成を進める。具体的には、アルブミンプロモーター下に tet-on システムを連結し、doxycycline 投与により repressor が離れる新規システムを応用し、薬剤誘導性に肝細胞に特異的に HBV 全タンパク質を発現するコンストラクトを作成する。作成したコンストラクトの薬剤による repressor 制御能の検証には、in vitro で肝培養細胞 (HepG2 細胞) に同コンストラクトを transfection し、薬剤誘導前後での血清中に分泌される HBs 抗原、HBe 抗原タンパク質の定量を行った。その後、作成したコンストラクトをマウス胚への injection を実施した。

### 2. HBV ゲノムの次世代シーケンサー解析；

次世代シーケンサー解析にはゲノムアナライザー II X (イルミナ社) を使用した。サンプルとしては、ヒト肝組織より DNA を抽出し、超音波発生器を用いて核酸を約 100 bps から 500bps の長さに断片化した。断片化した核酸の両側断端を酵素処理により修復した後、その断端に、ゲノムアナライザー II X での解析に必要なアダプター配列タグの付加を行った。引き続き、アダプターを付けたサンプルを電気泳動した後、ゲル切り出しを行うことにより、ゲノムアナライザー解析に適した約 200-300bps の長さの核酸のみを選別・抽出した。次に、抽出されたそれぞれの核酸サンプルに、全 6 塩基配列で構成されている 12 種類のインデックス・タグのいずれかを付加し、サンプルの調整を行った。これらの調整済サンプルを、ゲノムアナライザー II X を用いたペアエンド法により両端 76 塩基を読み取る大規模並列シーケンス解析を実施した。このマルチプレックス・タグ法を用いた次世代シーケンサー解析により、各レーンにおいて 12 サンプルの解析が実現し、コントロールサンプルを用いた基礎的検討からは、各サンプルにおいて、約 1000 万から 3000 万塩基という膨大な量の塩基配列情報を得られることが確認された。

### (倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるように十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子研究に関する倫理指針」(平成 17 年 6 月 29 日一部改正) 及び「疫学研究に関する倫理指針」(平成 19 年 8 月 16 日全部改正) 並びに「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年 7 月 31 日全部改正) に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報 を適正に管理保存した。

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、「研究開発等に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸防止措置などを定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

動物実験に関しては、「動物の保護および管理に関する法律」等に基づく「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 6 月 1 日一部改正) に従った。また、当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施した。

## C. 研究結果

### 1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

はじめに、HBV 肝炎モデルマウス作成のためのコンストラクトの構築を行った。アルブミンプロモーター下に tet-on システムを連結し、doxycycline 投与により repressor が離れる新規システムを応用し、下流に全長の HBV 配列を連結した。ウイルス抗原タンパク質のアミノ酸配列には変化を与えないが、ウイルスの DNA ポリメラーゼのみ産生できないように人為的に遺伝子変異を導入することにより、

作成したコンストラクトから産生されたHBV粒子のヒトへの感染性を消失させる工夫を行った。作成したコンストラクトの薬剤による repressor 制御能を検証するために、in vitro で肝培養細胞(HepG2細胞)に同コンストラクトを transfection し、doxycycline 投与前後で培養上清を回収し、産生・分泌された HBs 抗原、HBe 抗原タンパク質の定量を行うことにより、薬剤投与によりウイルス抗原タンパク質の発現制御が達成できていることを確認した。その後、作成したコンストラクトをマウス胚への injection を実施した。

## 2. HBV ゲノムの次世代シーケンサー解析；

本年度は、HBV に生じているウイルス変異の包括的な解析 platform を構築するとともに、実際の B 型肝炎症例の肝組織で検出される HBV ゲノム変異の全体像を掌握することを目標として、次世代シーケンサーを用いたウイルスゲノムの deep sequencing 解析を行った。

急性/劇症肝炎、慢性肝炎～肝硬変、肝細胞癌、それぞれの病態を形成する HBV ゲノムの全体像を検討する目的で、各臨床病態の肝組織から DNA を抽出し、HBV の amplicon の増幅をおこなった、引き続き、Deep sequencing 解析を行うことにより、HBV 感染により惹起されるそれぞれに病態において、肝組織中には極めて多彩な遺伝子変異を持つクローンが多数共存することが明らかとなった。興味深いことに、HBe 抗原陽性を示す肝硬変 6 例の組織中では既報通り全例において Pre-Core が野生型のウイルスが major clone として時検出されたが、HBe 抗体が陽性となった seroconversion 後の 8 例の肝組織中でも 4 例 (50%) では野生型のウイルスが major clone であることが確認された。他方、HBe 抗原/抗体の seroconversion の有無に関わらず肝硬変症例の肝組織では core promoter 領域はすべて変異クローンで占められていることもわかった。以上から、HBe 抗原/抗体の seroconversion は、core promoter 領域や pre-Core 領域の変異以外のメカニズムが存在しているものと推測された。

## D. 考察

本研究課題では、薬剤誘導性に repressor タンパク質を制御するシステムを用いることにより、肝細胞に任意の時期に免疫応答を惹起する B 型肝炎モデルマウスの作製を目指す。次世代シーケンサーにより、多様な肝疾患病態を呈する肝組織に感染した HBV ゲノムの特徴を明らかにすることができれば、各臨床病態に関連した HBV ゲノムの特徴をもつモデルマウスの樹立も将来的には可能となる。その解析基盤となる新規マウスの樹立と表現型の解析を引き続き進める予定である。

## E. 結論

HBV の病態解明と創薬ターゲットの絞り込みを達成することを目標とし、ヒト B 型肝炎を模倣する肝細胞に全長 HBV を発現する新しいモデルマウスの作製と、実際の臨床病態に相関した肝組織中の HBV ゲノムの特性的解析を行った。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. PLoS ONE. 2012; 7: e35052.
- 2) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S. Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. Hepatol Res. 2012; 43: 67-71.
- 3) Chiba T, Marusawa H, Ushijima T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: Mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. Gastroenterology. 2012; 143: 550-563.

- 4) Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T. Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *Int J Cancer*. 2012; 130: 1294-1301.
- 5) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, Chiba T. Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Viral Hepat*. 2012; 19: 32-38.
- 6) Osaki Y, Ueda Y, Marusawa H, Nakajima J, Kimura T, Kita R, Nishikawa H, Saito S, Henmi S, Sakamoto A, Eso Y, Chiba T. Decrease in alpha-fetoprotein levels predicts reduced incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection receiving interferon therapy. *J Gastroenterol*. 2012; 47: 444-451.
- 7) Takahashi K, Marusawa H, Chiba T. Large-scale identification of effector genes that mediate the type I interferon antiviral response. *Gastroenterology* 2012; 142: 178-180.
- 8) Shimizu T, Marusawa H, Endo Y, Chiba T. Inflammation-mediated genomic instability: roles of AID in carcinogenesis. *Cancer sci*

2012; 103:120-126.

## 2. 学会発表

- (1) 池田敦之、丸澤宏之、千葉 勉. 次世代シーケンサーの肝疾患診療への応用. 第 54 回日本消化器病学会. 2012/10/10-13. 神戸国際展示場、ポートピアホテル、神戸国際会議場. 兵庫.
- (2) 那須章洋、丸澤宏之、千葉 勉. 本邦における薬剤耐性 HCV クローンの潜在頻度の次世代シーケンサー解析. 第 48 回日本肝臓学会総会. 2012/6/7-8. 石川県立音楽堂、ホテル日航金沢、ANA クラウンプラザホテル金沢. 石川.
- (3) 金秀基、上田佳秀、丸澤宏之、羽賀博典、上本伸二、千葉 勉. 肝移植後 C 型肝炎治療の重大な有害事象. 第 48 回日本肝臓学会総会. 2012/6/7-8. 石川県立音楽堂、ホテル日航金沢、ANA クラウンプラザホテル金沢. 石川.

## G. 知的所得権の出願・登録状況

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

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（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究分担者：堀田博

研究協力者：勝二郁夫、Lin Deng、林美和子、甘翔、篠崎健太、陳明

分担研究課題：HBV タンパク質と相互作用する宿主タンパク質の構造と機能の解析

研究要旨：B型肝炎ウイルスのXタンパク質（HBx）はウイルス遺伝子の転写活性化作用を有するのみならず、多くの宿主因子と相互作用し、宿主細胞の増殖、炎症、シグナル伝達関連遺伝子の転写脱制御作用やシグナル伝達攪乱作用等を介して、細胞癌化に関与していることが示唆されている。本研究では、HBxタンパク質の多様な機能の分子機序を明らかにするために、タンデムタグ免疫沈降法・質量分析法により、新規HBx結合宿主タンパク質の探索を行った。その結果、既知の1種類を含む11種類のHBx結合タンパク質の候補が同定された。また、HBxタンパク質によるMAPキナーゼ経路やTGF- $\beta$ /Smad3経路の脱制御機構についても解析した。HBxタンパク質の発現によりJNK、p38 MAPK及びERKはそれぞれ異なるタイミングでリン酸化・活性化されたが、TGF- $\beta$ やJNKで制御されることが知られているSmad3のリン酸化には明らかな影響は認められなかった。HBV感染におけるこれらのシグナル伝達経路のクロストーク及びその意義について今後更に詳細に解析を進める予定である。

**A. 研究目的**

B型肝炎ウイルス（HBV）はヒト肝細胞に感染し、免疫能が正常の成人に感染した場合は主として急性肝炎を、また、免疫能が不十分な新生児や乳幼児に感染した場合は持続感染（キャリアー）になり、慢性肝炎、肝硬変や肝細胞癌を引き起こす。わが国では約 100 万人の HBV キャリアーが存在すると推定されている。

HBV はゲノム塩基配列の多様性に基づいて少なくとも 8 種類の genotype (A-H) に分けられ、それらはさらに複数の subgenotype (HBV/B1 等) に細分される。HBV genotype/ subgenotype の違いは地球規模での地域偏在性と相関し、また、慢性化率や発癌率など臨床病態との相関も指摘されている。我が国では、genotype C と genotype B が主な遺伝子型である。Genotype C は他の genotype に比べ肝細胞癌発症リスクが高いことが報告されている。

HBV ゲノムは約 3.2 kb の不完全二本鎖環状 DNA

で、Pre-S/S 遺伝子、Pre-C/C 遺伝子、P 遺伝子、X 遺伝子の 4 つの open reading frame が部分的に重なり合って存在している。Pre-S/S 遺伝子からウイルスエンベロープを構成する S タンパク質（HBs 抗原）、M タンパク質、L タンパク質が産生される。Pre-C/C 遺伝子からコアタンパク質（HBc 抗原）とプレコアタンパク質（HBe 抗原）が産生される。P 遺伝子から DNA ポリメラーゼが産生され、これは逆転写酵素及び RNaseH としても機能する。X 遺伝子から HBx タンパク質が産生される。HBx タンパク質は細胞質と核のいずれにも存在する。HBx タンパク質はウイルス遺伝子の転写活性化作用を有する。また、HBx タンパク質は多くの宿主因子と相互作用することも知られており、宿主細胞の増殖、炎症、シグナル伝達関連遺伝子の転写脱制御作用やシグナル伝達攪乱作用、及び p53 癌抑制タンパク質の機能阻害等を介して、細胞癌化に関与していることが示唆されている。