

本研究では、タンデムタグ免疫沈降法・質量分析法により、HBx タンパク質と結合する新規の宿主因子を探索し、HBx タンパク質の新たな機能を明らかにすることを目的とした。また、MAP キナーゼ経路や TGF- β /Smad3 経路を介した細胞増殖脱制御 HBx タンパク質がどのような影響を及ぼしているかについても解析した。

B. 研究方法

1) タンデムタグ免疫沈降法・質量分析法

発現プラスミドを用いて Huh7.5 細胞に Myc-His タグ付きの HBx タンパク質を発現させ、1% Triton X-100 を含む lysis buffer で細胞を溶解させた。HBx タンパク質は難溶性であるため、沈殿に 8 M 尿素を加えて溶解した。この HBx タンパク質を Ni-NTA アガロースにて精製した。次にビーズ洗浄により尿素を取り除き、洗浄した Ni-NTA アガロースビーズと Huh7.5 細胞溶解液と混合して、HBx タンパク質を refolding させながら細胞溶解液中の HBx 結合タンパク質と反応させた。その後、イミダゾールで HBx タンパク質及び HBx 結合宿主タンパク質を溶出し、精製した複合体をさらに抗 c-Myc 抗体ビーズにて精製した。

精製した HBx タンパク質複合体を SDS-PAGE 及び銀染色を行い HBx 結合宿主タンパク質のバンドを切り出し、質量分析法により HBx 結合宿主タンパク質の候補を同定した。

2) HBx タンパク質が宿主細胞の MAP キナーゼ経路や TGF- β /Smad3 経路に及ぼす影響の解析

Huh7.5 細胞に発現プラスミドをトランスフェクションして HBx タンパク質を発現させ、1-3 日後に細胞を回収し、ウエスタンブロット法により c-Jun、p38 MAPK、ERK1/2 及び Smad3 の発現量及びリン酸化状態を解析した。

(倫理面への配慮)

種々のタンパク質の発現プラスミドの作製及び使用は、神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。

すべての遺伝子組換え実験は神戸大学大学院医

学研究科微生物学研究室において、遺伝子組換え実験に関する法令及び指針等に準拠して行った。

C. 研究結果

1) HBx 結合宿主タンパク質候補の同定

HBx タンパク質発現 Huh7.5 細胞から得られた細胞抽出液を用いたタンデムタグ免疫沈降法及び質量分析法により、11 種類の HBx 結合タンパク質の候補が同定された。その中には、HBx タンパク質との結合が既に報告されている X-associated protein 2 (XAP-2; 別名 aryl hydrocarbon receptor interacting protein) も含まれていた。このことは、今回用いたタンデムタグ免疫沈降法・質量分析法が適切に機能していたことを示唆している。今後は、他の 10 種類の候補因子について、HBx タンパク質との相互作用について更に詳細に解析を行う予定である。

2) HBx タンパク質が宿主細胞の MAP キナーゼ経路や TGF- β /Smad3 経路に及ぼす影響の解析

HBx タンパク質を Huh7.5 細胞に一過性に強制発現させると、トランスフェクション後 2-3 日にかけて経時的に c-Jun 及び p38 MAPK のリン酸化の程度が顕著に増加した。一方、ERK のリン酸化は HBx タンパク質発現の 2 日目をピークに増加した。以上のように HBx タンパク質の発現により、JNK、p38 MAPK、ERK のシグナル伝達経路がそれぞれ異なるタイミングで活性化することが示された。

一方、Smad3 についてはリンカー領域 (Smad3L) 及び C 末端領域 (Smad3C) のリン酸化の程度を解析したが、c-Jun 及び p38 MAPK の場合に比べると、HBx タンパク質発現の影響は明らかに認められなかった。

D. 考察

HBx タンパク質は難溶性であるため、細胞溶解液の沈殿に 8 M 尿素を加えて可溶化し、それを用いてタンデムタグ免疫沈降法・質量分析法により、11 種類の HBx 結合タンパク質の候補を同定した。そのうちのの一つは HBx タンパク質との結合が既に報告されている XAP-2 (aryl hydrocarbon receptor interacting protein) であった。このことは、今回用い

た方法が適切に機能していたことを示唆している。今後、他の 10 種類の候補因子それぞれについて、免疫沈降法や蛍光抗体法により、HBx タンパク質との相互作用を詳細に解析する。また、それぞれの HBx 結合宿主蛋白質が MAP キナーゼ経路や TGF- β /Smad3 経路にどのように関与しているか、細胞増殖やアポトーシスにどのような影響を及ぼしているかについても検討する。さらに、HBx タンパク質の安定発現細胞系や HBV 複製細胞を用いて、同様の解析を行う予定である。

また、HBx タンパク質以外の HBV タンパク質(コアタンパク質 [HBc 抗原]) 及びプレコアタンパク質 [HBe 抗原]) の機能解析やそれらと結合する新規宿主タンパク質の探索も併せて行い、HBV の感染複製機構の詳細を明らかにしたい。

E. 結論

1) HBx タンパク質発現 Huh7.5 細胞の抽出液を用いたタンデムタグ免疫沈降法及び質量分析法により、11 種類の HBx 結合宿主タンパク質の候補を同定した。

2) HBx タンパク質の一過性発現により、JNK、p38 MAPK、ERK がそれぞれ異なるタイミングで活性化された。一方、HBx タンパク質の Smad3 シグナル伝達経路への影響は今回の実験系では明らかには認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Nasronudin, Amin M, Juniastuti, Soetjipto, [Hotta H](#), Hayashi Y. Detection of highly prevalent hepatitis B virus co-infection with HIV in Indonesia. *Hepatol Res*, (in press)
2. El-Shamy A, Shindo M, Shoji I, Deng L, Okuno T, [Hotta H](#). Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, (in press)

3. Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, [Hotta H](#). Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α . *J Virol*, 86(23): 12903-12911, 2012.
4. El-Shamy A, Shoji I, El-Akel W, Bilasy SE, Deng L, El-Raziky M, Jiang DP, Esmat G, [Hotta H](#). NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4a predicts clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients. *J Clin Microbiol*, 50(12): 3886-3892, 2012.
5. Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Horiguchi T, Sun X, Deng L, Shoji I, [Hotta H](#), Sada K. HCV NS5A protein containing potential ligands for both Src homology 2 and 3 domains enhances autophosphorylation of Src family kinase Fyn in B cells. *PLoS ONE*, 7(10): e46634, 2012.
6. Yano Y, Seo Y, Miki A, Saito M, Kato H, Hamano K, Oya M, Ouchi S, Fujisawa T, Yamada H, Yamashita Y, Tani S, Hirohata S, Yoon S, Kitajima N, Kitagaki K, Kawara A, Nakashima T, Yu H, Maeda T, Azuma T, El-Shamy A, [Hotta H](#), Hayashi Y. Mutations in non-structural 5A and rapid viral response to pegylated interferon- α -2b plus ribavirin therapy are associated with therapeutic efficacy in patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *Int J Mol Med*, 30(5): 1048-1052, 2012.
7. Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Ide YH, Deng L, Shoji I, Tanaka Y, Hasegawa Y, Ota M, [Hotta H](#). Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load. *J Gastroenterol*, 47(10): 1143-51, 2012.
8. Shoji I, Deng L, [Hotta H](#). Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. *Front Microbiol*, 2: A278, 1-5, 2012.
9. El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo

- Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated α -interferon /ribavirin therapy. PLoS ONE, 7(2): e30513, 2012.
10. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, Hotta H. A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved *N*-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis c virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. J Med Virol, 84(2): 229-234, 2012.
 11. 進藤 道子, El-Shamy Ahmed, 奥野 忠雄, 堀田 博. C型慢性肝炎時から肝癌発生まで経過を追えたC型肝炎ウイルスジェノタイプ1bのコア蛋白アミノ酸多様性と肝癌発生との関連性. 肝臓, 53(9): 541-548, 2012.
2. 学会発表
1. Deng L, Chen M, Jiang DP, Shoji I, Hotta H. Up-regulation of MAPK phosphatase 3 is involved in HCV-induced suppression of FoxO1 phosphorylation. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
 2. Jiang DP, Ratnoglik S L, Aoki C, Deng L, Shoji I, Hotta H. Development of therapeutic and preventive vaccines against Hepatitis C virus. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
 3. Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. Identification and characterization of a novel NS5A-interacting protein, SMYD3. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
 4. Matsui C, Shoji I, Deng L, Hotta H. HCV infection induces lysosomal degradation of hepatocyte nuclear factor 1 α via interaction with HCV NS5A protein. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2012. Venice, Italy.
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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)
 10. 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.
 11. 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 α 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.
 12. 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

- ブ, 2012. 金沢.
13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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 α -2a /Ribavirin療法の位置付け. 第16回日本肝臓学会大会, 2012. 神戸.
 17. 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.

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
該当なし

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

B型肝炎ウイルス増殖と細胞死・細胞極性との関連の解析

研究分担者：竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授

研究要旨：細胞内の飢餓応答及び恒常性の維持機構として重要なオートファジーはアポトーシスを始めとする細胞死機構と密接に関わりあっているが、B型肝炎ウイルス（HBV）増殖への影響は不明である。また、細胞極性の維持に重要である Rab11a は細胞内輸送にも関わっているが、HBV 増殖への関与は明らかではない。そこで、今回オートファジーの促進及び Rab11a の欠損が HBV 感染細胞に与える影響を検討した。肝細胞株にソラフェニブを投与すると、濃度依存的、時間依存的にオートファジーは亢進した。HBV 感染細胞系として用いた HBV ベクターを組み込んだ HB611 細胞株及び HepG2.2.15 細胞では、ソラフェニブの投与により親株である Huh6 または HepG2 細胞株に比し強い細胞死が誘導された。アポトーシスの指標であるカスパーゼ活性は、HBV 感染細胞と親株で同等であり、ソラフェニブによる HBV 感染細胞株優位な細胞死誘導はアポトーシス非依存的である可能性が示唆された。また、細胞極性・細胞内輸送に関わる HB611 細胞株の Rab11a をロックダウンしたところ、細胞内 HBV-RNA 量は有意に増加したが、メディウム中の HBV-DNA 量は減少した。今後、ソラフェニブによる HBV 感染細胞の細胞死誘導機構を解明し、また HBV 増殖・複製機構における細胞内輸送の意義を検討することで、HBV 増殖・複製の抑制を目指した新規治療法の開発に繋げていく計画である。

共同研究者

阪森 亮太郎 大阪大学消化器内科学

疋田 隼人 大阪大学消化器内科学

清水 聡 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

細胞内の飢餓応答及び恒常性の維持機構として重要なオートファジーは能動的な細胞死機構として知られるアポトーシスと密接に関わりあっている。しかし、B型肝炎ウイルス（HBV）の増殖に対してオートファジー、アポトーシスがどう影響しているのか明らかではない。

一方で、細胞極性の維持は細胞増殖や恒常性の維持にも重要であるが、この細胞極性は細胞内輸送にも深く関わる蛋白質 Rab11a に

よって制御されていることが知られている。しかし、この Rab11a と HBV 増殖との関係は不明である。

そこで今回肝細胞にオートファジーを誘導することで、HBV 感染細胞の細胞死、HBV DNA 量がいかに変化するかを検討した。また HBV 増殖における細胞極性・細胞内輸送に係る Rab11a の役割を検討した。

B. 研究方法

オートファジーの誘導方法として、今回ソラフェニブ投与を試みた。各種肝細胞株にソラフェニブを投与し、オートファジーの変化を検討した。HBV 感染細胞系として、Huh6 細胞株に genotype C の HBV を発現するベクターを組み込んだ HB611 細胞株、及び HepG2 細

胞株に genotype D の HBV を発現するベクターを組み込んだ HepG2. 2. 15 細胞株を使用した。細胞死の評価として WST 細胞増殖アッセイを行い、アポトーシスの評価として caspase3/7 活性を測定した。また細胞極性・細胞内輸送を制御する Rab11a の検討のために、siRNA を用いたノックダウン実験を行った。

(倫理面への配慮)

組み替え遺伝子を用いた実験は、大阪大学遺伝子組み換え安全委員会の承認のもと行った。

C. 研究成果

肝がん細胞株である Huh7 細胞株及び PLC/PRF/5 細胞株にソラフェニブを投与すると、濃度依存的、時間依存的にオートファジーの進行に必要な LC3-II の発現が亢進し、オートファジーによって特異的に分解される P62 の発現低下を認めた。電子顕微鏡像でもオートライソソームの増加を認め、肝細胞株でソラフェニブ投与はオートファジーを亢進させることが明らかとなった。

そこで、Huh6 細胞株と Huh6 細胞株に HBV ウイルスベクターを組み込んだ HB611 細胞株にソラフェニブを投与した。いずれの細胞株でもソラフェニブの投与で P62 の発現は減少し、オートファジーが促進された。しかし、ソラフェニブの投与で Huh6 細胞株に比し HB611 細胞株で細胞増殖はより顕著に抑制され、HB611 細胞株で細胞死が強く誘導された。そこでアポトーシスの指標である caspase3/7 活性を測定したが、Huh6 細胞株比し HB611 細胞株で有意な差を認めず、ソラフェニブによる HB611 細胞株での細胞死の増強はアポトーシス非依存的である可能性が示唆された。次に HepG2 細胞株と HepG2. 2. 15 細胞株を用いて検討を行ったが、同様にソラフェニブは HBV を産生する HepG2. 2. 15 細胞

でより強いアポトーシス非依存的な細胞死を誘導した。なお、ソラフェニブ投与では HB611 細胞、HepG2. 2. 15 細胞における HBV 産生に大きな差を認めなかった。

細胞極性・細胞内輸送に関わる HB611 細胞株の Rab11a を siRNA でノックダウンしたところ、細胞内 HBV-RNA 量は有意に増加した。一方でメEDIUM中の HBV-DNA 量は減少し、HBV ウイルス増殖・複製過程における Rab11a の関与が示唆された。

D. 考察と結論

ソラフェニブは肝細胞のオートファジーを促進したが、HBV 感染細胞ではアポトーシス非依存的な細胞死が増強することが明らかとなった。細胞死はアポトーシス機構だけでなく、オートファジー依存的な細胞死の存在も知られており、今後このソラフェニブによる細胞死機構の解明を行うことで、HBV 感染細胞の排除に向けた創薬開発がすすむことが期待される。

また、Rab11a のノックダウンにより HBV 産生株で細胞内 HBV-RNA 量は増加したが、細胞外 HBV-DNA 量は低下した。このことは Rab11a が HBV の転写後からウイルス複製・放出のいずれかの機構に関わっていることを示唆している。Rab11a は細胞内輸送を司る蛋白としても知られており、今後、HBV 増殖過程における細胞内輸送を検討することで、HBV 増殖・複製の抑制を目指した新規治療法の開発が期待できる。

E. 研究発表

論文発表

[1] Nawa T, Ishida H, Tatsumi T, Li W, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Hosui A, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N, Takehara T. Interferon- α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C

pathway. *Virology*. 432: 452-459, 2012.

学会発表

- [1] Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2012) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. **The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease**. Boston, USA, November 8 - 12. (oral presentation)
- [2] Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Minoru Shigekawa, Satoshi Shimizu, Wei Li, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. (2012) Bid and Bim are essential regulators involving the intrinsic pathway of apoptosis in hepatocytes in the absence of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. **The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease**. Boston, USA, November 8 - 12. (oral presentation)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：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：加藤直也 東京大学医科学研究所疾患制御ゲノム医学ユニット 特任准教授

研究協力者：室山良介 東京大学医科学研究所疾患制御ゲノム医学ユニット 特任助教

分担研究課題：HBx の組み様式とその機能解析

研究要旨：1) B型肝炎ウイルスのX蛋白(HBx)は肝発癌と深い関連がある。発癌に関連するB型肝炎ウイルスX遺伝子変異に関しては今までに多数の報告があるが再現性に乏しい。そこで公開されているデータベースを用いて肝癌関連HBx変異を検討した。ロジスティック回帰により肝癌グループと非肝癌グループで有意に異なる9か所の核酸変異を見出した。うち8か所の核酸変異はアミノ酸置換を伴っていた。今後、本アミノ酸置換のHBxの機能に及ぼす影響の解析が必要である。2) B型肝炎ウイルスX遺伝子はB型肝炎ウイルスの感染成立、維持に重要である。また、HBxはトランス転写活性化能を有しており、この転写活性化能はHBxによるB型肝炎ウイルスの増殖促進作用に重要である。HBxの転写活性化能を阻害する薬剤は、B型肝炎ウイルスの複製を阻害する薬剤となる可能性がある。そこで、HBxの転写活性化能を指標としての薬剤スクリーニング系の確立を目指した研究を開始した。

A. 研究目的

1) B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)は肝細胞癌の主要な病原因子の1つである。本邦においても肝細胞癌による死亡は年間3万人を超え、その約20%にB型肝炎ウイルスが関与している。B型肝炎ウイルスには4つのORF(S, P, X, C遺伝子)が存在しており、このうちX遺伝子より転写・翻訳されるX蛋白(HBx)のトランスジェニックマウスでは発癌が認められることから、HBxは発癌と深い関連があるといわれている(Nature 1991)。

発癌に関連するB型肝炎ウイルスX遺伝子変異に関しては今までに多数の報告があるが再現性に乏しい。そこで、われわれは公開されているデータベースを用いて、B型肝炎ウイルスX蛋白(HBx)の肝発

癌に関わる変異を同定することを目的として研究を行った。

2) B型肝炎ウイルスX遺伝子はB型肝炎ウイルスの感染成立、維持に重要である。また、HBxはトランス転写活性化能を有しており、このトランス転写活性化能はHBxによるB型肝炎ウイルスの増殖促進作用に重要である。したがって、HBxの転写活性化能を阻害する薬剤は、B型肝炎ウイルスの複製を阻害する薬剤となる可能性がある。そこで、HBxの転写活性化能を指標として、HBxの転写活性化能を阻害する薬剤をハイスループットスクリーニング系の確立を目的として研究を行った。なお、HBxのトランス転写活性化能は、持続感染の維持、すなわち covalently closed circular (CCC) HBV DNA の維持

にも関わっている可能性があり、HBx の転写活性化能を阻害する薬剤は、B 型肝炎ウイルスの持続感染を阻止し得る可能性がある。

B. 研究方法

1) B型肝炎ウイルスのシークエンスデータベースとして Japan Hepatitis Database、BIO HBV database、DDBJ を利用した。これらデータベースから、ジェノタイプ C の B 型肝炎ウイルス X 遺伝子の全長塩基配列を抽出し、さらに肝癌の有無が明らかになっている患者血清から得られた塩基配列に絞って、B 型肝炎ウイルス X 遺伝子の肝癌関連変異の解析を行った。統計学手法としては χ^2 検定、ロジスティック回帰を用いた。

2) まず、われわれが有していた CAG プロモーター下に HBx を発現するプラスミドを用いて、SRE、SRF、CRE、NF- κ B、NF-AT、AP-1 各シグナル伝達経路の活性化につきルシフェラーゼを用いたリポーターアッセイにより検討した。活性化が顕著に認められるシグナル伝達系を選択し、Huh7 細胞を用いて、リポーターベクターの stable transformant の樹立を試みた。次に、複製可能なジェノタイプ C の B 型肝炎ウイルス 1.4 倍長を含むプラスミドを入手し、そこから X 遺伝子をテトラサイクリン存在下で発現するベクターにサブクローニングした。

(倫理面への配慮)

本研究では、B 型肝炎患者より得られた B 型肝炎ウイルスの塩基配列情報は、公開された公的なデータベースより入手したものであり、倫理面の問題は無いと判断される。

C. 研究結果

1) 公開されているデータベースから X 遺伝子を含む 4223 シークエンスデータを入手した。そこから、

ジェノタイプ C で全長の X 遺伝子領域を含む 791 シークエンスを抽出した。さらに、オリジナル資料の情報が参照でき、由来と診断が明らかとなっている 762 シークエンスを抽出した。そこからさらに血清由来の 617 シークエンスを抽出。肝癌グループの 96 シークエンス、非肝癌グループの 500 シークエンスを最終的に解析対象とした。

まず、核酸ベースで、 χ^2 検定を行ったところ、肝癌グループと非肝癌グループ間で有意に異なる 22 塩基を見出した。うち 9 塩基はポリメラーゼとオーバーラップする領域内に、10 塩基はエンハンサー 2 領域とオーバーラップする領域内に、5 塩基はコアプロモーター領域とオーバーラップする領域内にあった。これら 22 塩基につき、ロジスティック回帰分析を行ったところ、独立して肝癌と関連する 9 塩基 (nt1383、nt1479、nt1485、nt1626、nt1653、nt1719、nt1726、nt1762、nt1800) を抽出し得た。うち 3 塩基はポリメラーゼとオーバーラップする領域内に、4 塩基はエンハンサー 2 とオーバーラップする領域内に、2 塩基はコアプロモーター領域とオーバーラップする領域内にあった。肝癌関連 9 塩基のうち、8 塩基はアミノ酸置換を伴うものであった (aa4 Arg→Arg、aa36 Thr→Pro、aa38 Pro→Ser、aa85 Ala→Thr、aa94 His→Tyr、aa116 Val→Leu、aa118 Lys→Thr、aa130 Lys→Met、aa143 Cys→Arg)。ポリメラーゼ領域とオーバーラップしている領域内の 3 塩基変異はアミノ酸置換をもたらさなかった。

2) 肝癌細胞株である Huh7 細胞に HBx を CAG プロモーター下に発現するプラスミドと、SRE、SRF、CRE、NF- κ B、NF-AT、AP-1 の各シスエンハンサーエレメントをルシフェラーゼ遺伝子上流にもつプラスミドを共トランスフェクションし、細胞内シグナル伝達系の活性化をリポーターアッセイにより検討した。SRE は約 1.8 倍、SRF は約 2.1 倍、CRE は約 1.6 倍、NF- κ B は約 3.2 倍、NF-AT は約 2.1 倍、AP-1

は約 1.8 倍に活性化した。われわれや他グループの既報通り、HBx は細胞内シグナル伝達経路を肝癌細胞においても活性化することを確認した。そこで最も顕著に活性化が認められた NF- κ B レポーターベクターを恒常的に保持する Huh7 細胞の樹立を行っている。また、ジェノタイプ C の HBx をテトラサイクリンの存在下で発現するベクターを構築しつつあり、HBx 発現につき、ウェスタンブロットティングによる確認を行っている。

D. 考察

1) B 型肝炎における肝発癌と関連する HBx のアミノ酸置換を 8 か所同定した。これら 8 アミノ酸置換は、HBx のもつ肝発癌に関わる機能に深く関わっていることが推測される。今後、HBx の様々な機能に及ぼす本アミノ酸置換の影響につき、検討を進める必要がある。

2) HBx のもつトランス転写活性化能を阻害する薬剤のハイスループットスクリーニング系の確立を行っている。本薬剤は、B 型肝炎ウイルスの複製を阻害するのみならず、持続感染を阻止する可能性があると期待される。

E. 結論

- 1) 肝癌関連 HBx 変異を同定した。
- 2) HBx のトランス転写活性化を阻害する薬剤のハイスループットスクリーニング系を樹立中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

特になし

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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：飯島沙幸 名古屋市立大学大学院研究科 助教

分担研究課題：HBV感染と小胞体ストレスに関する解析

研究要旨：

HBVによる肝癌発症メカニズムについてはいくつも仮説があり、詳細は明らかでない。今研究ではHBs蛋白の小胞体蓄積による小胞体ストレス(ER stress)に注目し、メカニズムの解明を目指す。今年度はHBV感染時のER stress 経路に関連する宿主側因子の発現変動を解析した。HBV感染ヒト肝臓キメラマウスの肝臓内ではER stress関連因子の発現上昇が認められ、感染後、線維化の進行と共にER stress経路が活性化していることが示唆された。

A. 研究目的

HBV感染による肝癌発症までのメカニズムは不明な点が多い。核酸アナログの使用によりHBV感染患者に対する治療の選択肢は著しく増えたが、発癌率に関する影響はいまだ不明のままである。

これまでウイルス側の発癌関連因子としてHBx, HBs蛋白が報告されており、肝癌組織に組み込まれたHBV遺伝子のほとんどが、HBxとpreS2/S蛋白をコードする遺伝子配列を保持している。また、preS遺伝子全体もしくはpreS2に欠損が生じるとSmall HBsの産生低下と相対的なLarge HBsの増加が見られ、Large HBsが小胞体に蓄積することが知られている。preS2領域の欠失は慢性肝炎例や肝細胞癌症例で多く見られ、さらに、preS deletionの頻度はgenotypeによって異なり、病態の進展に有意に関与していることが報告されている。

今研究ではHBs蛋白の小胞体蓄積に着目し、蛋白蓄積によるER stressが肝線維化・肝癌発症にどのように関与するかを明らかにし、臨床の場へ応用することを目標とする。

B. 研究方法

1)HBV感染によるER stress関連遺伝子の発現プロファイルを経時的に確認する。

①in vivoにおけるER stress関連因子の発現解

析：HBV感染実験に用いたヒト肝臓キメラマウスの肝臓からRNAを抽出し、RTD-PCRにて8個の遺伝子について発現解析を行い、非感染コントロールサンプルと比較した。

②in vitroにおけるER stress関連因子の発現解析：HBV genotype CクローンとS蛋白のみ産生する変異体クローンをHuh7細胞にトランスフェクションしウイルス産生をさせた。その細胞内のER stress関連因子の発現をリアルタイムPCR法で定量した。

2)Genotype間のER stressレベルの比較

HBV遺伝子型によってウイルス複製率・ウイルス蛋白発現量は異なった傾向を示すが、それらの差異がER stressレベルに影響するか検討する。また、HBs蛋白の各領域(PreS1, PreS2, S)についても検討し必要領域の特定を目指す。

(倫理面への配慮)

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。

C. 研究結果

(1)①HBV感染群と非感染コントロール群を比較するとER stressの指標となる因子の発現に差異が認められた。感染群ではARF6, PERK等の小胞体膜貫

通キナーゼの発現が高く、ER stress シグナル経路が活性化していると考えられる。

②ER ストレスシャペロンである Grp78 は、これまでの知見の通りウイルス産生細胞で発現が高く、細胞内でER stress が生じていると考えられる。同様に他の因子(PERK, IRE1, ATF4)でコントロールと差異が確認された。

(2)に関連して、Genotype A, B, C の large S, Middle S 発現ベクターを作製した。small S も作成予定である。

D. 考察

今回発現解析に用いた感染キメラマウスは、感染後3か月で肝臓の線維化が認められている。このサンプルでER stress 関連因子の発現上昇が認められたことは、少なくともこれらの因子の発現は線維化の進行と関連していると推測される。現在、ER stress 経路の活性化に伴って発現が変動するさらなる遺伝子の抽出を目指して、マイクロアレイによる発現解析を進行中である。

E. 結論

肝線維化が認められたHBV感染キメラマウス肝臓においてER stress 因子の発現上昇が確認された。次年度以降はマイクロアレイ解析で抽出された遺伝子を詳細に検討し、宿主側のメカニズム解明に繋げるとともにGenotype ごとのS蛋白の影響を比較検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakamoto T, Tanaka Y, Kani S, Sugiyama M, Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the Dependence of Hepatitis B Virus Genotype G on Co-infection with Other Genotypes for Viral Replication. J Viral. Hepat., in press.
- 2) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsuhashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E,

Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon-1 in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. Gut., 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

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

分担研究者： 加藤孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
研究協力者： 山田典栄 国立感染症研究所ウイルス第二部
杉山隆一 国立感染症研究所ウイルス第二部

分担研究課題：B型肝炎ウイルス薬剤耐性株の耐性発現機序の解析

研究要旨：B型慢性肝炎治療の第1選択薬であるエンテカビルに対する薬剤耐性発現機序を解析するため、エンテカビル耐性HBV株の複製モデルコンストラクトを構築した。エンテカビル投与に対し耐性を示した症例を3例選択し、それらの症例からHBV株を分離し塩基配列を確認した。得られたHBV株にはこれまで報告されているエンテカビル耐性変異は認めず、RT領域の他の部位に変異を認めたことから、これらの変異がエンテカビル耐性に関与している可能性が考えられた。そこで1つの症例からHBVゲノムを抽出しその全塩基配列を決定した上で、コンセンサス配列を持つ複製モデルコンストラクトを構築した。得られたコンストラクトは、HuH-7細胞に導入する事によりHBVの複製が確認された。今後このコンストラクトを用い、エンテカビル耐性機序の解析を行う。

A. 研究目的

現在、B型慢性肝炎に対する治療には主に核酸アナログ製剤が用いられている。これらの核酸アナログ製剤は、抗ウイルス活性が強く副作用も少ないが、その一方で高率に耐性株が出現する事が知られている。特に古くから使用されているラミブジンでは、1年間の投与で20%以上の症例で耐性株が出現する事が報告されており、耐性株の出現が核酸アナログ製剤による治療成績に大きな影響を与えている。近年、B型慢性肝炎治療の第1選択薬として用いられているエンテカビルでは、この耐性株の出現率が低く、高いHBV-DNA陰性化率が得られている。しかし、このエンテカビル投与症例の中でも投与の長期化に伴い、少数ではあるが薬剤耐性ウイルスが出現する例や反応不良例が存在する。本研究では、これら耐性ウイルスの存在が疑われる症例からHBV-DNAを分離し、そのゲノム中で既報のエンテカビル耐性変異や他の耐性変異となり得る変異の有無を確認した。

B. 研究方法

これまで核酸アナログの投与歴がなくエンテカビルの投与を行った症例で、エンテカビル投与によりHBV-DNAの陰性化が見られなかった症例およびHBV-DNAの再上昇を認めた症例など、耐性ウイルスの存在が疑われる症例を選択した。これらの症例の血清からDNAを抽出後、HBV polymeraseのRT領域をPCRで増幅しdirect sequence法にて塩基配列を決定した。一部の症例では、HBVゲノム全長をPCRにて増幅した後に全長の塩基配列を決定し、その情報をもとにHBVゲノムすべてのORFを含むような1.3倍長のHBVゲノム配列を持つ複製モデルコンストラクトを作製した。

（倫理面への配慮）

本研究で用いた慢性肝炎患者由来試料はインフォームド・コンセントを得て採取された検体であり、その使用については「臨床研究に関する倫理指針（平成20年厚生労働省告示第415号）」に準拠し、国立感染症研究所の「ヒトを対象とする医学研

究倫理審査委員会」に申請し承認を得ている（申請番号 377）。

C. 研究結果

エンテカビル治療を行うも十分な HBV-DNA 量の低下が見られず、HBV-DNA 陽性のまま経過した 1 例、エンテカビル投与により HBV-DNA が検出感度未満になったが投与中に再上昇が見られた 2 例について検討を行った。これら 3 症例の HBV polymerase RT 領域を PCR で増幅し、ダイレクトシーケンスにて解析したところ、これらの症例はすべて Genotype C であり、これまで報告されている RT 領域のエンテカビル耐性変異は検出されなかった。しかしいずれの症例でも既報の薬剤耐性変異以外の部位に変異を認め、これらの変異が薬剤耐性に関与している可能性が考えられた。

そこで、HBV-DNA 量の低下が見られず HBV-DNA 陽性のまま経過した症例の HBV 全ゲノム配列を 2 つの領域に分けて PCR で増幅し TA-Vector にクローニングした後に、5 クローンずつ塩基配列を決定しコンセンサス配列を作製した。得られたコンセンサス配列を元に 1.3 倍長のゲノム配列を持つ複製モデルコンストラクトを作製した。この複製モデルコンストラクトは HuH-7 細胞に導入し、その複製をサザンブロットで確認することができた。また、導入細胞をエンテカビルで処理する事により HBV 複製の低下を認め、この系によりエンテカビルの薬剤感受性が評価可能と考えられた。

D. 考察

エンテカビルに抵抗性を示す症例中の HBV ゲノムを解析し、薬剤耐性に関わる可能性がある polymerase RT 領域の変異を同定した。さらに、その治療抵抗性を示す患者から得られた HBV ゲノムの配列を用い、複製モデルコンストラクトを作製した。この複製モデルコンストラクトを、HuH-7 細胞に導入する事で、HBV の複製が確認できた。

E. 結論

本研究で同定された変異がエンテカビル耐性に

関与しているかの検討が必要である。今後、治療抵抗性を示す患者から得られた HBV の配列を持つ複製モデルコンストラクトを用い、同定された変異がエンテカビル耐性に与える影響を解析する。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の出願・取得状況

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

分担研究者：相崎英樹

分担研究課題：HBVの生活環における宿主脂質の役割

研究要旨：細胞内脂質は多くのウイルスの感染・増殖において重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、本研究では、HBV感染の生活環のうち、ウイルス吸着から侵入、核への輸送までの初期感染過程と、cccDNA転写、ウイルスゲノム複製、粒子形成、分泌の後期感染過程に分けて、細胞内脂質のHBV生活環に与える影響を調べた。HMG-CoA reductase 阻害剤のLovastatinによりHBV初期感染過程には影響を与えなかったが、HBV後期感染過程を抑制した可能性が示された。今後は、より効果的な方法で細胞内脂質をコントロールし、HBV感染・増殖に与える影響の解析を目指す。

A. 研究目的

本研究班はB型肝炎の新規治療薬開発に向けて、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染複製増殖機構の解明を目指している。細胞内脂質は多くのウイルスの感染・増殖において重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、本研究では、HBV感染の生活環のうち、ウイルス吸着から侵入、核への輸送までの初期感染過程と、cccDNA転写、ウイルスゲノム複製、粒子形成、分泌の後期感染過程に分けて、細胞内脂質のHBV生活環に与える影響を調べる。

B. 研究方法

(1) HBV 初期感染過程における細胞内脂質の役割

細胞内脂質が初期感染過程に与える影響を調べるため、DMSO, hydrocortisone 等を加え、1ヶ月培養した differentiated HepaRG 細胞に HMG-CoA reductase 阻害剤 lovastatin を添加した3時間後に HBV を感染させ、12日間培養後、細胞上清中の HBs 量を ELISA 法で測定する。

(2) HBV 後期感染過程における細胞内脂質の役割
細胞内脂質が後期感染過程に与える影響を調べるため、テトラサイクリンを除くことで HBV pgRNA

を産生する HepAD38 細胞株を用いて、テトラサイクリンを除くと同時に lovastatin を添加し、6日後の培養上清中の HBV DNA 量を realtime PCR 法で測定した。

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は国立感染症研究所内のバイオリスク管理委員会、組換え DNA 実験委員会等の承認を受けて行った。

C. 研究結果

(1) HBV 初期感染過程における細胞内脂質の役割

lovastatinを添加しても細胞上清中のHBs量に変化は認められなかった。

(2) HBV 後期感染過程における細胞内脂質の役割

lovastatinを添加により細胞上清中のHBV DNA量は減少傾向を示した。

D. 考察

LovastatinによりHBV初期感染過程には影響を与えなかったが、HBV後期感染過程を抑制した可能性が示された。細胞内コレステロールの恒常性は維持

されており (Simons, K., 2000 Science)、10%FCS 含有培地存在下ではHMG-CoA reductase 阻害剤の作用は弱い可能性があるため、細胞内コレステロール量の低下を確認する必要がある。HBV 粒子膜、細胞膜のコレステロール量低下には、methyl- β -cyclodextrin により細胞膜からコレステロールを除去する薬剤の方が有効であると考えられる。より効果的な方法で細胞内脂質を確実にコントロールし、HBV 感染・増殖に与える影響を解析する必要があると思われた。低脂質薬は既にヒトに投与されている薬剤であることから、その抗HBV作用が明らかになれば大変有用である。

E. 結論

細胞内脂質がHBVの生活環に影響を与えている可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Liu HM, Aizaki H, Machida K, Ou JH, Lai MM. Hepatitis C virus translation preferentially depends on active RNA replication. PLoS One. 2012;7:e43600.
- 2) Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. Virology. 2012;10:29-38.
- 3) Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T. Japanese 4) reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. J Clin Microbiol. 2012;50:1943-9.
- 4) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and Measurement of ATP Levels in Living Cells Replicating Hepatitis C Virus Genome RNA. PLOS Pathogen 2012;8:e1002561.
- 5) 田中純子、小山富子、相崎英樹. C型肝炎ウイルス (HCV)による感染. 日本臨床ウイルス学会、臨床とウイ

ルス、2012;40:28-35.

- 6) 相崎英樹、HCV感染と代謝異常(脂質・エネルギー)、医学の歩み、2012; in press.
- 7) 相崎英樹、HCV粒子形成に關与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、Liver Forum in Kyoto 第14回学術集会記録集、メディカルトリビューン、2012;30-33.
- 8) 相崎英樹、C型肝炎ウイルスの生活環、細胞、ニューサイエンス社、東京、2012; in press.

2. 学会発表

- 1) Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, Mizokami M, Kuroda M, Wakita T. Independent evolution of multi-dominant viral genome species observed in a single HCV carrier. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
- 2) Watashi K, Uchida N, Saeed M, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Characterization of anti-HCV release inhibitors targeting phospholipase D. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
- 3) Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyaura T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
- 4) Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived Hepatitis C virus was effective both in vitro and in vivo. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
- 5) Kim S, Date T, Aizaki H, Watanabe H, Wakita T. NS3 protease derived from genotype 1b

- Con1 attenuates viral replication. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
- 6) Uchida N, Watashi K, Suzuki R, Aizaki H, Chiba J, Wakita T. Phospholipase D regulates membrane trafficking during Hepatitis C virus egress. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
- 7) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. An alternative endocytosis pathway for the productive entry of Hepatitis C virus. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
- 8) Watanabe N, Date T, Hussein Aly H, Aizaki H, Wakita T. Neutralization antibody induction by immunization with E2 proteins purified from different cells. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Lido-Venice, Italy 2012.
- 9) Matsumoto Y, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Matsuura T, Suzuki T, Miyamura T, Ichinose S, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan. 2012.
- 10) Matsumoto Y, Matsuura T, Suzuki T, Wake K, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against Hepatitis C virus in vitro. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
- 11) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Identification of a host factor that interacts with hepatitis virus NS2 protein and participates in the viral assembly. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
- 12) Matsuda M, Suzuki R, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. An alternative endocytosis pathway for the infectious entry of hepatitis C virus. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
- 13) Kim S, Date T, Aizaki H, Watanabe H, Wakita T. NS3 protease derived from genotype 1b Con1 attenuates viral replication. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
- 14) Watanabe N, Date T, Aizaki H, Wakita T. The role of envelope N-glycans in HCV lifecycle. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
- 15) Watashi K, Uchida N, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T. Phospholipase D is a cellular regulator during hepatitis C virus egress and a possible target for antiviral strategy. The 10th JSH single topic conference, Tokyo 2012.
- 16) Aizaki H, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV productio、The 1st International Symposium on Latent TGF- β Activation Reaction・RIKEN Symposium, Hyogo, 2012.
- 17) 相崎英樹、HCV感染に伴う宿主の代謝の変化-脂質代謝、エネルギー代謝を中心に-, The 11th Hepatitis Expert Meeting・学術講演会・教育講演、東京、2012.
- 18) 坂田幸太郎、原詳子、鈴木哲郎、相崎英樹、脇田隆宇、小嶋聡一、C型肝炎ウイルスNS3プロテアーゼによるTGF- β 疑似活性の発現、第48回日本肝臓学会総会・シンポジウム、金沢、2012.
- 19) 相崎英樹、HCV粒子形成に関与する宿主因子の同定と解析、平成24年度遺伝子病制御研究所

研究集会、感染・免疫・炎症・発癌、北海道、2012.

- 20) 松田麻未、鈴木亮介、渡士幸一、相崎英樹、松浦善治、鈴木哲朗、脇田隆字、C型肝炎ウイルスの一過性感染性粒子を用いた細胞内侵入機構の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.
- 21) 渡士幸一、内田奈々子、大東卓史、清原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、IL-1およびTNF-alphaのB型肝炎ウイルス感染阻害効果、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.
- 22) 安東友美、相崎英樹、杉山真也、溝上雅史、黒田誠、脇田隆字、C型肝炎ウイルスの quasispecies 解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.
- 23) 松本喜弘、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、松浦知和、鈴木哲朗、宮村達男、和氣健二郎、

脇田隆字、相崎英樹、グリチルリチンのC型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス作用の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.

- 24) 渡邊則幸、伊達朋子、Aly Hussein、相崎英樹、脇田隆字、異なる細胞を用いて作成したE2タンパク質の中和抗体誘導効果、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.
- 25) 相崎英樹、HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析、Liver Forum in Kyoto 第14回学術集会、京都、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

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

HBxタンパク質と相互作用する細胞側因子の同定

研究分担者：岡本 徹 大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)が持つHBxタンパク質は、HBV感染における発癌だけでなく、ウイルス複製にも関与することが知られているが、未だその機能は不明である。そこで、HBxの機能を明らかにするために、HBxと相互作用する分子を質量分析により網羅的に解析した。相互作用したいくつかのタンパク質をクローニングし、HBxとの結合活性を検討したところ、ヒストンの脱メチル化に関与するJumonji Cドメインを持つJMJD5が同定された。JMJD5はHBxと直接結合し、HBV粒子の産生に関与することが示唆された。

A. 研究目的

HBVは肝癌を発症するウイルスであり、世界では4億人もの感染者が存在する。治療薬としては逆転写阻害剤が用いられているが、その著効率は低く、また一生服用せねばならず、有効な治療法とは言い難い。HBVがコードしているHBxはHBVが引き起こす肝細胞癌の原因タンパク質であり、HBVの複製にも関与していることが報告されている。したがって、HBxやHBxと相互作用する宿主タンパク質を標的とする薬剤は、HBVの複製だけでなく、肝癌の抑制にも効果を発揮できる有用な治療薬となる可能性を秘めている。本研究では、HBxと相互作用する宿主タンパク質を同定し、その相互作用の生物学的な意義を検討することで、新しいB型肝炎の創薬候補を同定することを目的とした。

B. 研究方法

OSF タグを付加した HBx を 293T 細胞に発現させ、ストレプトタグビーズを用いて、HBx に結合活性を示すタンパク質を精製し、質量分析によってタンパ

ク質を同定した。その中で、ヒストン脱メチル化に関与する JMJD5 に注目し、その結合を免疫沈降法と酵母ツーハイブリッド法で確認した。さらに、JMJD5 ノックダウン細胞を作製し、培養上清中に放出される HBV のゲノム量を定量的 PCR によって検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施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、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HBx と相互作用する新規のタンパク質として JMJD5 を同定した。JMJD5 は HBx と酵母内でも相互作用が確認され、HBx の 75-94 アミノ酸領域で結

合していた。また、JMJD5 の発現をノックダウンした HepG2.2.15 細胞の培養上清中のウイルスゲノム量が有意に低下していたことから、JMJD5 は HBx と相互作用することで HBV 複製に関与していることが示唆された。

D. 考察

JMJD5 はヒストン脱メチル化に関与するタンパク質であり、JMJD5 が標的とする分子が HBV 複製に関与していることが考えられる。HBx はそれ自身に DNA 結合能はないが、様々な遺伝子発現を制御していることが報告されており、JMJD5 が HBx による遺伝子発現制御に関与している可能性が推測された。

E. 結論

HBx と結合する新規分子として JMJD5 を同定した。JMJD5 は HBV の複製に関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, Vaux DL. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis*, 2013, Jan 17;4:e465
2. Okamoto T, Zobel K, Fedorova A, Quan C, Yang H, Fairbrother WJ, Huang DC, Smith BJ, Deshayes K, Czabotar PE. Stabilizing the Pro-Apoptotic BimBH3 Helix (BimSAHB) Does Not Necessarily Enhance

Affinity or Biological Activity. *ACS Chem Biol*, 2012, Dec 10. [Epub ahead of print]

3. Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol*, 2012, 87, 489-502.
4. Giam M, Okamoto T, Mintern JD, Strasser A, Bouillet P. Bcl-2 family member Bcl-G is not a proapoptotic protein. *Cell Death Dis*, 2012, Oct 11;3:e404.
5. Okamoto T, Campbell S, Mehta N, Thibault J, Colman PM, Barry M, Huang DC, Kvensakul M. Sheeppox Virus SPPV14 Encodes a Bcl-2-Like Cell Death Inhibitor That Counters a Distinct Set of Mammalian Proapoptotic Proteins. *J Virol*, 2012, 86, 11501-11511.
6. Yamamoto M, Okuyama M, Ma JS, Kimura T, Kamiyama N, Saiga H, Ohshima J, Sasai M, Kayama H, Okamoto T, Huang DC, Soldati-Favre D, Horie K, Takeda J, Takeda K. A cluster of interferon- γ -inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2012, 37, 302-12.

2. 学会発表

Kowaki T, Ngoc PH, Fukuhara T, Okamoto T, Matsuura Y, Identification of host factors interact with hepatitis B virus X protein. 第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日-14 日, 2012

H. 知的所得権の出願・登録状況

特になし。