

201228004A

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

B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の  
樹立及び感染系による  
病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上田啓次

平成25 (2013) 年 12月

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

B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の  
樹立及び感染系による  
病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上田啓次

平成25（2013）年 12月

## I. 総括研究報告

B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発

上田 啓次

## II. 分担研究報告

1. HBV pseudotype、HBV膜蛋白相互作用による感染受容体の分離・同定。  
上田 啓次
2. HBV 受容体発現細胞株の探索および感染による宿主細胞の微細構造変化の解析  
森石 恆司
3. 発現・精製したHBV膜蛋白をプローブとした相互作用因子の網羅的分離によるHBV感染受容体の分離・同定  
黒田 俊一
4. HBVエンベロープタンパク質と相互作用する細胞膜表面分子の網羅的探索  
黒木 和之
5. HBV感染におけるリン酸化タンパク質の機能解析  
岡本 徹
6. 細胞表面の糖鎖変化とHBV感染に関する研究  
三善 英知
7. HBV感染経路に寄与するHBV表面抗原由来糖鎖構造の解析  
三崎 亮
8. HBV感染による病態発症機構の解析  
竹原 徹郎
9. HBV感染症における免疫細胞機能修飾機序の解明と免疫制御法の開発  
考藤 達哉
10. HBVポリメラーゼ発現・精製と活性測定系の確立、立体構造解析  
大崎 恵理子

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## IV. 研究成果の刊行物・別刷



## I. 総括研究報告書

B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による  
病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発

研究代表者 上田 啓次

大阪大学大学院医学系研究科感染免疫医学講座ウイルス学 教授

**研究要旨:** 今尚不明である HBV 感染受容体を分離・同定し、HBV には簡便かつ有効な感染系を樹立すること、これを用いて、HBV 感染機構を含めた HBV の生活環、HBV 関連病態発症機構を解明し、HBV の特性や病態に基づいた治療法の開発を促進すること、糖鎖修飾はウイルス感染動態や病態発症と深く関わる HBV 感染機構や関連病態との関わりを解明すること、HBV 持続感染にみられる免疫抑制機構の詳細を解明することを目指して研究を展開した。B型肝炎ウイルス (HBV) 膜蛋白の PreS1 領域と相互作用する因子の分離、HepG2 細胞における PreS1S2-Fc 蛋白質と特異的に結合する細胞集団の分離、塩素酸ナトリウム処理を施した Huh-7 細胞の抽出物中より、BNC と結合するタンパク質をプルダウンアッセイによって分離し、BNC に対して高い親和性を有すると考えられるタンパク質の単離に成功した。感染モニター tool として、マーカー遺伝子として GFP、YFP、または分泌型ルシフェラーゼ (GLuc や NanoLuc) をもつ組換え HBV ベクターを構築した。2012 年 11 月に報告された NTCP に関しては、NTCP を過剰発現する HepG2 細胞の HBV 感染感受性を確認できた。糖鎖関連では、N 型糖鎖の分岐構造を決定する糖転移酵素の遺伝子 (GnT-III, GnT-V, Fut8) の過剰発現肝がん細胞の作製、HBVpp を発現する細胞では対照となる非発現細胞と比較して、フコース残基を保持する分岐型糖鎖が顕著に増加することが判明した。免疫抑制機構に関しては、B 型慢性肝炎の病態形成に MDSC の関与、HBV 感染による全身性 IDO 活性の亢進など新たな知見が得られた。更に、HBVpol の terminal protein、RT 活性ドメインの発現に成功した。

A. 研究目的

我国の HBV 感染患者は約 150 万人存在すると推定され、HBV 感染症の制御・克服は重要な課題である。現行の抗 HBV 剤は抗 HBV 剤として開発されたものではなく、変異体の出現も多く

(J. Antimicro. Chemother. 61:766)、完治に向けた新規薬剤・治療法の開発が望まれる。本問題の解決には HBV 感染現象を容易に観

察できる感染系の構築が不可欠であり、それには HBV 感染受容体を分離・同定する必要がある。本因子の同定は科学的にもインパクトが高く、簡便な *in vitro*、個体レベルでの感染系の構築により HBV 感染制御へ向けた新たな展開が期待できる。

私どもは本問題の解決に向けたここ数年の成果として、HBV 膜粒子を被ったレトロウイルス (HBV pseudotype particle; HBVpp)

の作製に成功し(投稿中)、感染能を指標にしたHBV感染受容体のスクリーニング系を開発した。HBVppを用いた実験で肝癌由来培養細胞株にHBV付着因子が存在するという結果も得つつある。本系を有効に活用しつつ、初期の重点目標として、平成26年度までにHBV感染受容体の分離・同定から*in vitro*感染系の樹立を目指す。HBV感染受容体の分離・同定は立体構造の解明とそれに基づく薬剤探索に寄与される。

HBV感染病態(肝炎、肝硬変、肝癌)では糖鎖修飾状態が変動し(Trends Microbiol. 14:211)、免疫担当細胞の活性化に影響を与えている可能性がある。HBVの糖鎖修飾を標的にした抗HBV剤の開発も視野に入れる(Antiviral Res. 80:11)。HBVの人工的持続感染細胞(HB611、PNAS 84:444)や遺伝子発現系で糖鎖修飾の変動や免疫制御系遺伝子のプロファイルを探索し、肝炎発症機序の解明に迫る。

また、HBVポリメラーゼ自体の活性測定系はなく、抗HBV剤の開発を阻んでいる。種々の発現系を駆使して、3年を目途にHBVポリメラーゼ活性測定系を確立し、試験管内抗HBV剤マスキング系の確立及び立体構造の解明とそれに基づく薬剤探索を可能にする。

平成26年度以降、*in vitro*感染系の構築を目指し、得られた知見を自然感染系で検証するとともに、感染機構の詳細を解明、抗HBV剤のスクリーニングを開始する。また個体レベルの感染系の構築による肝炎、肝硬変、肝発癌のモデル開発を目指す。

## B. 研究方法

HBV感染受容体の分離・同定では、

- 1) 肝癌培養細胞株(HepG2)の未処理/処理細胞から蛋白を抽出し、
- 2) 本蛋白を二次元蛋白泳動し、未処理/処理で比較した。
- 3) HBV側リガンド; PreS1~HBs N端部をプローブにして相互作用因子を処理細胞から分離した。
- 4) pFUSErIgGfc(Invivogen)により、FACSによりPreS1/S2に対する付着能が有する細胞分画を分離した。
- 5) BNCを用いたプルダウンアッセイにより、ヒト肝臓由来細胞株から相互作用因子を分離した。

感染後の特異的な細胞内微細構造を解析するために、

- 1) HepG2 および HepG2. 2. 15 細胞を電子顕微鏡により解析した。ヒト肝臓 cDNA ライブラリ(Clontech)からPCRによりヒトNTCP遺伝子を増幅し、pcDNA3.1に導入し、培養細胞にて発現した。FACSによりPreS1/S2-Fc融合蛋白質の発現細胞への付着能を評価した。

組換えHBVベクターの構築、組換えHBVパッケージング細胞の作製では、

- 1) CMVプロモーターにより野生型HBV pregenomic RNAを発現するpCSH4プラスミドを構築した。
- 2) HBV全蛋白質を発現するレトロウイルスベクターをHepG2細胞に導入し安定的に組み込んだ株を樹立した。
- 3) 作製された組換えHBVを各種培養条件のもと、4%PEG8000存在下で感染実験を行った。

NTCP に関して、

- 1) 本因子を過剰発現するHepG2細胞を作製し、HBVの感受性を検討した。
- 2) また、130種類のリン酸化酵素阻害剤をHBVの感染性粒子を定常的に産生するHepG2. 2. 15細胞に作用させ、細胞の生存率、産生されたHBs抗原量を指標にしてHBVの増殖抑制効果を検討した。

糖鎖関連研究では、

- 1) GnT-V、Gnt-III、Fut8 を強発現するHuh7、Hep3B を作製した。
- 2) HBVpp 発現細胞と非発現細胞について、糖鎖構造解析を行った。

HBV による免疫抑制機構の解明では、

- 1) B 型肝炎患者 PBMC を用い、FACS により細胞表面マーカー ; CD33<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> 分画として MDSC を同定した。
- 2) B 型肝炎患者と非感染健康成人から血清を採取し、血清キヌレニン (Kyn) を HPLC 法で測定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験指針に基づき諸施設において申請・許可、場合によっては大臣確認実験承認を得た上で研究を遂行した。ヒトサンプルの使用に当たっては、施設倫理委員会にて実験内容が承認を受け、B 型肝炎患者及び健康者に文書を用いて説明の上、署名による同意を得た上で行った。

## C. 研究結果

・研究代表者 (上田啓次)

(1) B 型肝炎ウイルス (HBV) 膜蛋白の PreS1 領域と相互作用する因子を分離した (成果概要図 1A)。

(2) 感染誘導処理+/-、分化誘導処理+/- で変動する蛋白分子を 2 次元電気泳動法で同定した。

(3) NTCP はある種の現存肝癌培養細胞株では発現が認められないことが解った (成果概要図 2B)。

・研究分担者 (森石恆司)

(1) HepG2 細胞に対して FACS を行い、PreS1S2-Fc 蛋白質が特異的に結合する細胞集団を確認した (成果概要図 1B)。

(2) HBV を産生している HepG2. 2. 15 細胞の細胞内微小器官の特異的変化を透過電子顕微鏡で観察し、報告されている様な Fillopodia の消失はないことを確認した。

・研究分担者 (黒木和之)

(1) ヒト肝癌由来細胞株 HuH7 は DMSO 存在下で培養することで HBV 感染を許容することが解った。

(2) NTCP\* 遺伝子など肝細胞特異的遺伝子の発現上昇が見られることを確認した。

・研究分担者 (黒田俊一)

(1) 出芽酵母で作製した HBV 表面抗原 L 粒子が HuH7 細胞に低親和性受容体から高親和性受容体に受け渡され、クラスリン依存性エンドサイトーシス及びマクロピノサイトーシスで込まれることを確認した。

(2) 細胞内侵入速度は、L 粒子と HBV (報告値) とで大差がなかった。

・研究分担者 (岡本徹)

(1) B 型肝炎ウイルス (HBV) のエンベロープタンパク質を搭載した水疱性口内炎ウイルスのシュードタイプ (VSVpv) は、コントロールウイルスに比べ HepG2 細胞に高い感染性を示すことを確認した (成果概要図

2A)。

・研究分担者 (三善英知)

(1) HB611 細胞 (HBV 産生細胞) では Huh6 細胞に較べて、SSA および AAL レクチンとの結合が増加し、逆に E4-PHA との著明な結合性の低下を認めた。

(2) Hep3B, HepG2, Huh7 に GnT-III, GnT-V, Fut8 などの糖鎖遺伝子の発現ベクターを導入し、糖鎖改変細胞を樹立し、著名な糖鎖構造変化を確認した (成果概要図 3)。

・研究分担者 (三崎亮)

(1) HBV 粒子膜粒子の糖鎖構造解析・改変のための HBV pseudotype particle (HBVpp) (研究代表者より提供) の数 10~数 100 nmol 程度の確保を目指し HBVpp の大量生産を行っている。

・研究分担者 (竹原徹郎)

(1) 免疫抑制に関わる抹消血単核球の MDSC の頻度を測定し、健常人に比し、B 型慢性肝炎患者では MDSC の頻度が高い傾向にあることを確認した (成果概要図 4A)。

・研究分担者 (考藤達哉)

(1) 免疫抑制作用を有すると考えられる indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) の活性は HBV 慢性肝炎患者では亢進し、HBV 産生細胞 (Hep2.2.15, HB611) とその親株で差がないことを確認し、HBV 感染による炎症が IDO 活性亢進に重要であることが示唆された (成果概要図 4B)。

・研究分担者 (大崎恵理子)

(1) HBV ポリメラーゼの大腸菌での発現により、ドメインを構成する末端蛋白、逆転写酵素領域の発現・精製に成功した。

## D. 考察

1) HBV 側リガンド領域 (preS1~preS2 若しくは HBsN 端まで) をプローブとして相互作用因子の探索で、特異的に結合する因子を分離できている。また既存ヒト肝癌由来培養細胞株 (HepG2) にこの領域と相互作用する分画の存在を確認したことから、HBV 側リガンド領域と相互作用する HBV 受容体若しくはその構成因子が現存する培養肝癌細胞株に内在するものと考えられた。HepaRG を分化誘導/非誘導した蛋白の二次元泳動で分化誘導特異的な spot を幾つか分離しており、これらの中に HBV 受容体の候補因子の存在が期待された。

2) 2012 年 11 月に HBV 受容体として報告された NTCP に関しては、受容体 hunting team を中心にその信憑性の検討を行っているが、少なくとも受容体の一つである可能性を示す結果を得ている。今後、再現性等更なる検討が必要である。

3) 糖鎖改変細胞株における HBV 産生能と HBV 粒子の糖鎖修飾の変化、感染性など次なる興味深い知見を得る基礎が築かれた。

4) HBVpp 産生系で、HBV 膜蛋白を発現させることにより、細胞自体のフコース修飾が増加するという現象は、HBV 膜蛋白産生が細胞全体の糖鎖修飾機能に変化をもたらすという興味深い結果である。

5) B 型慢性肝炎患者の抹消血中の骨髓由来抑制性免疫細胞 (MDSC) の上昇は、MDSC の HBV 感染に対する免疫抑制誘導反応の一端であると思われる。HBeAg 陰性者や、HBV DNA 量が低い患者で高い傾向があり、seroconversion や病態の進展に MDSC の機能が関与していることを示唆している。



6) B 型慢性肝炎・肝癌患者の血清中キヌレニン濃度の有意な上昇や HBV 産生依存性に IFN- $\gamma$  が IDO を誘導することは、HBV 感染による IDO を介した制御性 T 細胞による免疫抑制機序を示唆している。

#### E. 結論

- 1) HBV 受容体の分離・同定へ向けて確実な進捗があり、その実態解明は近いものと期待された。
- 2) HBV 感染と糖鎖修飾変化は極めて興味深く、HBV 感染病態との関連性の解明が今後の重要な目標となる。
- 3) HBV による免疫抑制機構の作動はヒト感染者から知見を得、個体モデルで実証することが不可欠である。その目標へ向かって意義ある知見が得られた。

## 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

HBV pseudotype、HBV膜蛋白相互作用による感染受容体の分離・同定

研究分担者：上田 啓次 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：HBV 感染受容体はウイルスの発見から半世紀足らずに現在に至っても全く明らかにされていない。簡便な *in vitro* 感染系が存在しないことが、その重要な理由であると思われるが、このことにより HBV のライフサイクルや病態発症機構の詳細は不明なままである。また抗 HBV 剤は抗 HIV 剤のたらい回し的に使用されており、HBV の本質を理解した真の抗 HBV 剤は開発されていない。こういった問題の解決には是非とも HBV 感染受容体を分離・同定しその本質を明らかにし、簡便な *in vitro* 或は個体レベルでの感染系を確立することが重要であると思われる。私どもは本問題の解決に向けたここ数年の活動の成果として、HBV 膜粒子を被ったレトロウイルス（HBV pseudotype ; HBVp）の作製が可能であることを確認し（投稿中）、感染能を指標にした HBV 感染受容体の生物学的 cDNA ライブラリースクリーニングシステムを開発したが、HBVp を用いた感染性スクリーニングの過程上、現存の肝癌培養細胞株にある処理を加えることで、HBVp の感染性が上昇することをみいだした。本現象は肝癌培養細胞株には HBV 受容体が内在することを示唆しており、処理/未処理細胞を用いた遺伝子発現レベル及び蛋白レベルの差分解析により本因子の同定を試みた。本年度は HBV 側リガンドである PreS1～HBs をプローブにした蛋白レベルでの解析により、幾つかの因子を分離した。

A. 研究目的

HBV 感染受容体はウイルスの発見から半世紀足らずに現在に至っても全く明らかにされていない。簡便な *in vitro* 感染系が存在しないことが、その重要な理由であると思われるが、このことにより HBV のライフサイクルや病態発症機構の詳細は不明なままである。また抗 HBV 剤は抗 HIV 剤のたらい回し的に使用されており、HBV の本質を理解した真の抗 HBV 剤は開発されていない。こういった問題の解決には是非とも

HBV 感染受容体を分離・同定しその本質を明らかにし、簡便な *in vitro* 或は個体レベルでの感染系を確立することを目指す。そして、感染系による包括的な抗 HBV 剤の探索・開発、本受容体を標的とした創薬の実現を目指す。

B. 研究方法

HBV 感染受容体の分離・同定

- 6) 肝癌培養細胞株（HepG2）の未処理/処理細胞から蛋白を抽出した。

- 7) 本蛋白を二次元蛋白泳動し、未処理/処理で比較した。
- 8) HBV 側リガンド ; PreS1~HBs N 端部をプローブにして相互作用因子を処理細胞から分離した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験指針に従い遂行した。

#### C. 研究結果

- 1) HepG2 処理/未処理細胞から抽出した蛋白で処理細胞特異的な幾つかの spot を分離した。
- 2) HBV 側リガンド ; PreS1~HBs N 端部をプローブにした相互作用因子の分離実験で幾つかのバンドを検出した。

#### D. 考察

培養肝癌細胞株にある処理を加えることでHBVpの感染性が上昇することから、培養肝癌細胞株にはHBVに対する付着因子が内在しているものと想定された。今回、二次元蛋白電気泳動法で処理細胞特異的なspotを幾つか同定したが、これらがHBVの受容体若しくはその一構成因子であるかを検討する必要がある。

PreS1~HBs N 端部をプローブにした相互作用因子の分離実験においても、幾つかの相互作用因子を分離し得た。今後、MSにより、これら因子の同定を進めるとともに、受容体としての活性を検討する。

#### E. 結論

培養肝癌細胞株にはHBV付着因子が内在し、HBV受容体活性をもつ可能性がある。

#### F. 研究発表

論文発表

- 1) Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. "Kaposi's sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell transformation." In "Herpesviruses", Magel, D. G. and Tyring, S., ed., In-Tech ISBN 978-953-51-0186-4. pp93-104, 2012.
- 2) Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. "Characterization of Kaposi's sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis." In "Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). Leukemia Research and Treatment. doi:10.4061/2011/726964.
- 3) Ohsaki, E. and Ueda, K. "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency." *Frontiers in Virology*. 3:7-19, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00007.
- 4) Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. "Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II." *Virology* 425:95-102,

2012.

doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.008

5) Noma, S., Ohya-Shimada, W., Kanai, M., Ueda, K., Nakamura, T., Funakoshi, H. “Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7.” *Neuroscience Res.* 73(2):115-21. 10.1016/j.neures.2012.03.001.

6) Ueda, K. “For the future studies of Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus”. An Editorial. *Frontiers in Virology* 3: 1-2, 2012. doi: 10.3389/fmich.2012.00237.

7) Ueda, K. “Kaposi’s Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are Evaded.” *J. Blood and Lymph* 2:3, 2012. doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109.

8) Ueda, K., Ohsaki, E., and Omori, H. “Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity.” *Biophys. Res. Comm.* under revision.

9) 上田啓次. HHV-8 「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会 (編集中)

10) 上田啓次. B型肝炎のウイルス学. 化学療法の領域 48:125-133, 2012.

11) 上田啓次. 遺伝子挿入 HBV を用いた感染リセプターの探索. 肝胆膵 65 : 601-609, 2012.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し



## HBV 受容体発現細胞と受容体の探索と感染細胞内微細構造の解析

研究分担者：森石 恆司 山梨大学医学部 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス (HBV) 感染における侵入に重要な受容体分子はよくわかっていない。本研究は、HBV の preS1/S2 領域に対して付着能を有する細胞株を探しだし、その細胞から受容体分子を同定し、HBV 侵入を阻害する化合物スクリーニング系を開発する事を目的としている。さらに、開発されたスクリーニング系により、抗 HBV 侵入阻害剤開発を目指す。本年度は、preS1/S2 領域をウサギ IgG Fc に融合させ、293T 細胞で発現し、その精製融合蛋白質により細胞表面への付着性を検討した。さらに受容体候補である NTCP への preS1/S2 の付着性も検討した。また、感染後の細胞内微小構造変化を解析した。

### A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染者は世界で三億人を越えるといわれ、半数の肝癌患者が HBV 感染に由来すると報告されている。その病原性発現機構や感染機構に不明な点が多く残されており、より有効な抗 HBV 療法開発の障害となっている。特に感染初期の侵入機構で最も重要なステップである受容体および付着機構はわかっていない。HBV のエンベロップ蛋白質は S, M, L と存在しており、それぞれの C 末端領域は共通で、S 蛋白質である。L 蛋白質は PreS1 を唯一有しており、PreS1 領域が HBV 侵入に重要であることが知られている。PreS1 の N 末端は Myristoyl 化されてされており、それが標的細胞へのウイルス粒子の付着に重要なウイルス側因子として認識されている。最近、HBV 受容体候補として、Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide (NTCP) が報告された (Yan et al. eLife, 2012, 1:e00049)。PreS1 領域 2-48 のアミノ酸残基を合成し、N 末端を Myristoyl 化し、それをプローブにして、NTCP 分子を単離している。NTCP 発現によって HBV/HDV 感染を許容することから、有力な受容体候補の一つとして考えられる。本研究は、HBV 受容体を同定するために

受容体発現細胞株を分離・同定し、HBV preS1/S2 領域を IgG の Fc 部分に融合させ、ウイルス侵入評価系を開発する事を第一の目標に上げている。また、その評価系を用いて、HBV 侵入阻止活性を有している化合物を同定し、抗 HBV 剤開発を目指す。本年度は、HBV preS1/S2 と IgGFc を融合させた融合蛋白質を作製し、ウイルス侵入機構を解析する評価系開発を目指した。また、感染成立の確証を得るため、感染細胞における細胞内微小構造の変化も電子顕微鏡により解析した。

### B. 研究方法

ウイルス遺伝子型 C の PreS1/S2 領域をコードする遺伝子領域を PCR で増幅し、pFUSErIgGFc (Invivogen) に組み込み、ウサギ IgG Fc 領域との融合蛋白質を 293T 細胞に発現した。Protein G-Sepharose 4B (GE) によって培養上清から融合蛋白質を精製し、FACS により PreS1/S2 に対する付着能が有する細胞株の同定を目指した。また、感染後の特異的な細胞内微細構造を解析するために、HepG2 および HepG2. 2. 15 細胞を電子顕微鏡により解析した。ヒト肝臓 cDNA ライブラリ (Clontech) から PCR によりヒト NTCP 遺伝子を増幅し、pcDNA3. 1 に導入し、培養細胞にて発現

した。FACSによりPreS1/S2-Fc融合蛋白質の発現細胞への付着能を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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を必要とする材料は含まれない。

### C. 研究結果

ウイルス受容体分子を同定する目的として、本年度は受容体結合を担うウイルス蛋白質preS1/S2部分に結合する細胞株を選別する方法の確立を目指した。遺伝子型CのPreS1/S2とウサギIgG Fc融合蛋白質(preS1/S2-Fc)をコードするプラスミドを作製し、それを培養細胞293Tに導入し、融合蛋白質を発現・精製した。その精製融合蛋白質を用いてHepG2細胞に対してFACSを行い、PreS1/S2-Fc蛋白質が特異的に結合する細胞集団を認めた。

NTCP遺伝子を293Tに導入し、その発現をWesternで確認できた。さらにNTCPを発現させた293T細胞およびHuh7細胞に対して、preS1/S2-Fcを処理し、FACSにより結合能を解析した。NTCPの発現により、細胞表面へのpreS1/S2-Fcの結合が有意に認められた。

さらに、感染成立を確実に評価するために、感染特異的な細胞内変化を見つける目的で、ウイルス粒子を産生しているHepG2. 2. 15細胞の細胞内微小器官の特異的な変化を透過電子顕微鏡で観察した。親株HepG2細胞を対照に観察したところ、HepG2. 2. 15細胞内に粒子状の構造物が細胞質に観察された。また、既報で報告されているようなFilopodiaの消失はなく、非感染細胞と同様に感染していてもFilopodiaが存在していた。

### D. 考察

本研究により、HepG2にも僅かながらPreS1/S2へ付着能を有する細胞集団が

存在することが分かった。また、PreS1/S2への付着実験からNTCPが新規HBV受容体候補の一つである可能性が強まった。次年度は他のウイルス遺伝子型のPreS1/S2領域をFc融合蛋白質を作製・精製し、様々な細胞株を用いて結合細胞株の同定を目指す。また、NTCP発現細胞、HBV感染感受性細胞、HepaRG細胞およびヒト肝臓初代継代細胞に対してそれらFc融合蛋白質が結合するか確認し、感染阻止が可能か検討する予定である。PreS1/S2自体にHBV感染阻止能がないか検討し、感染阻止剤として使用が可能か検討したい。

### E. 結論

本研究結果から、PreS1/S2が特定の細胞集団へ付着する能力があることやNTCP発現によりPreS1/S2結合能を獲得することがわかり、HBV感染阻止化合物スクリーニング系開発の基盤が確認された。

### F. 健康危険情報 特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge Amphimedon sp. *PLoS One*, 7: e48635, 2012
2. Tripathi LP, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen YA, Matsuura Y, Mizuguchi K: Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator

PA28gamma Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study. *J. Proteome Res.*, 11: 3664-3679, 2012

3. Moriishi K, Matsuura Y: Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 3: 54, 2012

4. Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, Nagano H: Upregulation of nuclear PA28gamma expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 3: 379-385, 2012

## 2. 学会発表

1. Kasai H., Kawakami, K., Yamashita, A., Ikeda, M., Kato, N., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., Moriishi, K. FKBP6 plays an important role in HCV replication through binding to HCV NS5A. 19<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. 2012. October 5-9.

2. 葛西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本徹、松浦善治、楠木正己、森石恆司 新規宿主因子 FKBP6 による HCV 複製制御機構の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日～15日

3. 藤本雄介、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、森石恆司 海綿動物 *Amphimedon* sp. 抽出画分による HCVNS3 プロテアーゼ・ヘリカーゼ活性阻害の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日～15日

4. 山下篤哉、沈暉、葛西宏威、藤本雄介、森石恆司 Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物によ

る HCV ゲノム複製阻害効果の検討  
第60回日本ウイルス学会学術集会、  
2012年11月13日～15日

H. 知的所有権の出願・登録状況  
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

発現・精製したHBV膜蛋白をプローブとした相互作用因子の  
網羅的分離によるHBV感染受容体の分離・同定

研究分担者：黒田 俊一  
名古屋大学大学院生命農学研究科 教授

研究要旨：我々はB型肝炎ウイルス(HBV)の外殻構造を模したウイルス様粒子(Bio-nanocapsules; BNC)を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に発現させ、大量に調製する事に成功している。このBNCはHBVと同様に、ヒト肝臓細胞特異的に細胞内に侵入する能力を備えており、その機構を詳細に解析した結果、HBVとほぼ同等の速度で、同様の経路を介してヒト肝臓由来細胞株の細胞内へ侵入する事が判明し、HBVのモデルとして非常に有用な素材であることが示された。このBNCを使用して、ヒト肝臓細胞株のタンパク質の中から、HBVの細胞内侵入に必要な不可欠であると思われる未同定の感染受容体を分離・同定する事を目的とし、BNCを用いたプルダウンアッセイによってHBV感染受容体の単離を試みた。その結果、BNCと結合するタンパク質の分離に成功し、現在はこのタンパク質の同定を進めている。

#### A. 研究目的

HBVは、全世界で2~3億人が感染していると言われ、日本国内でも150万人もの感染患者が存在していると推定されている。HBVへの感染は、慢性肝炎や肝硬変、更には肝臓癌へとつながるため、その感染の予防や治療は大変重要な課題である。

しかしながら、HBVの感染機構には未だ不明な点が多く、感染に必要なはずの受容体でさえ、数十年間研究されてきているにも関わらず、同定されていない。こうした背景から、HBVの感染機構に基づく有効な治療法は未だ開発されておらず、HBVの予防や治療法の確立のためにも、受容体

の同定と、それに続く感染機構の詳細な解析は必要不可欠である。

我々は、HBVの感染に必須であると言われているHBVのLタンパク質を外殻に有する、ウイルス様粒子BNCを、大量に調製する技術を有している。従来のHBVビリオンを用いた研究では、ビリオン自体の大量調製が困難である事や、HBVの効率的な感染系が無い事がネックとなっていたが、大量に調製可能、且つHBVとほぼ同様の構造を有するBNCをHBVのモデルとして使用する事で、従来の研究とは一線を画する実験系の構築が可能となり、HBV感染受容体の特定や、HBVの感染機構を詳細に解析する事

も出来ると考えられる。

従って本研究では、BNC の HBV の感染モデルとしての有用性を検証し、更には HBV の感染受容体の同定と、それに続く感染機構の解析を行う。また、これらの研究を通して、HBV 感染の予防、治療に貢献できる知見を得る事を目的としている。

## B. 研究方法

BNC のヒト肝臓細胞への感染機構を解析するために、蛍光標識した BNC を調製し、*in vitro* においてヒト肝臓由来細胞、又は非ヒト肝臓由来細胞への結合と侵入、更に細胞内局在を、共焦点顕微鏡を用いて観察、解析した。

本研究では、主に二つのアプローチによって HBV 感染受容体の単離・同定を行う事とした。① BNC を用いたプルダウンアッセイによる HBV 感染受容体の単離・同定、と② One cell pick up 装置を使用したヒト肝臓 cDNA ライブラリからの網羅的スクリーニングである。平成 24 年度においては①の方法で実験を行ったので、これについて報告する。HBV 感染受容体を単離するプルダウンアッセイのために、まずは BNC を NHS 活性化セファロースビーズへ共有結合させ、BNC 修飾ビーズを作製した。また、ヒト肝臓由来細胞株 Huh7 を溶解させ、タンパク質抽出液を調製した。この際 Huh7 は、HBV の低親和性受容体の中でも HBV との結合に重要であると言われているヘパリンの硫酸化を阻害する、塩素酸ナトリウム (sodium chlorate) で処理したものを使用した。BNC 修飾ビーズと Huh7 のタンパク質抽出液を

混合し、BNC と抽出液中に存在していると思われる HBV 受容体とを結合させた。

このビーズを遠心、洗浄した後に、結合しているタンパク質を SDS-PAGE に供した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う組換え DNA 実験については、文部科学省研究開発 2 種省令に準じ、名古屋大学大学院生命農学研究科へは、「タンパク質中空ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の開発 (部局承認番号: 農 09-018)」、「多様なウイルス外皮タンパク質から構成される中空ナノ粒子シリーズを用いる gene delivery system および drug delivery system に関する研究 (部局承認番号: 農 10-040)」、及び「中空ナノ粒子を用いる細胞への遺伝子及び薬剤導入の検討 (部局承認番号: 農 11-009)」として申請し、承認されている。なお、実験動物及びヒト由来試料は取り扱っていない。

## C. 研究結果

BNC の各種細胞株への結合性を解析した結果、予想通りヒト肝臓由来細胞株においてのみ、強い結合を示した (図 1)。特に、HBV の感染感受性が高いと言われているヒト肝臓初代細胞 (図中 Hepatocytes) において、顕著に高い結合性を示した。一方で、非ヒト肝臓由来細胞株に対する結合性は非常に弱く、ラット肝臓由来細胞株 (MH1C1) においてもその結合性が低かった。次に、ヒト肝臓由来細胞株 (Huh7) の細胞内への侵入について解析した結果、ヒト血漿由来 HBsAg とほぼ同様に、細胞表面に結合した



BNC の内、約 3 割のものが一時間のうちに細胞内に取り込まれている事が確認でき

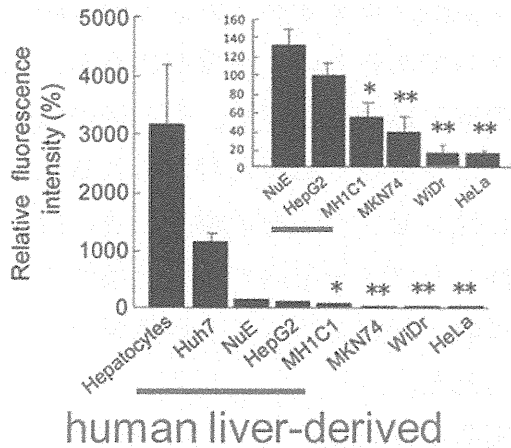


図 1, 各種細胞への結合性の比較

た(図 2)。更に、細胞内への取り込みを阻害する各種の薬剤を添加して BNC の細胞内への取り込みを解析した結果、CPZ (chlorpromazine) と amiloride によってその取り込みが阻害された事から(図 3)、BNC は Huh7 においては、クラスリン依存的エンドサイトーシスと、マクロピノサイトーシスの二つの経路を介して細胞内へ取り込まれることが示された。この傾向は HBsAg でも同様に得られた。

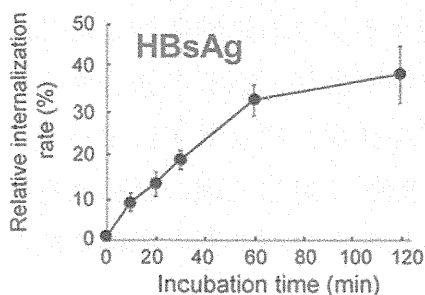
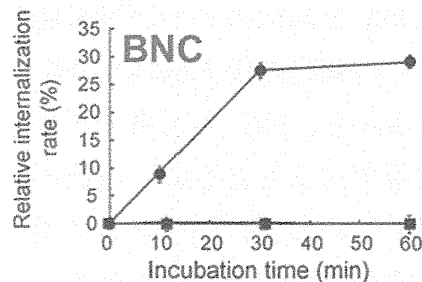


図 2, Huh7 に対する細胞内侵入速度の解析

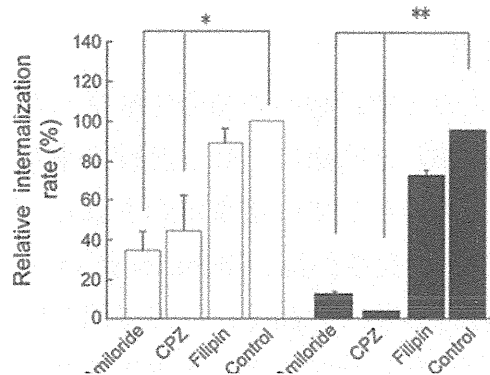


図 3, Huh7 細胞への取り込み経路の解析

また BNC は、HBV 感染において従来から報告されているように、細胞内侵入に際してまずは細胞表面の低親和性レセプター(ヘパリン依存性)に結合し、その後、より親和性の高い未知のレセプター(高親和性レセプター)へ移行した後にエンドサイトーシスによって取り込まれることも明らかとなった。

HBV 受容体単離のためのプルダウンアッセイの結果、BNC 修飾セファロースに結合していると思われるいくつかのタンパク質が単離された(図 4、binding のレーン、赤矢印)。BNC が結合していないビーズには全くタンパク質が結合していないため、これらのタンパク質は、BNC に特異的に結合しているものと考えられる。

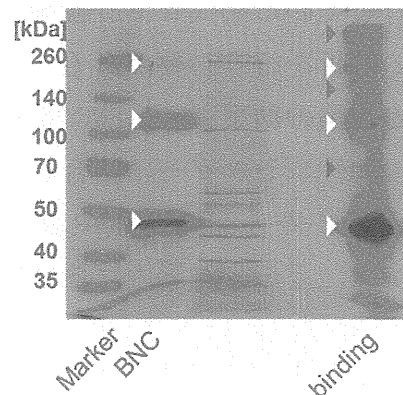


図 4, プルダウンアッセイの結果

#### D. 考察

BNC の各種細胞への結合を解析した結果より、HBV と同様に、ヒト肝臓由来細胞株特異的に結合している事が示された。また、HBV 感染感受性が高い Hepatocytes ではその結合性が著しく高く、一方で同じ肝臓由来細胞でありながらラット由来の MH1C1 では結合性が低かった。これらの結果は、初代ヒト肝臓細胞に効率的に感染し、ヒト以外の生物種には感染しない(チンパンジー等の一部例外を除く)という HBV の特徴を BNC が有している事を示すものである。また、BNC の Huh7 細胞内への取り込みは、BNC よりも構造や構成成分が HBV と近い、HBsAg とほぼ同様の速度であることが示された。更に、細胞内への侵入機構も BNC と HBsAg とほぼ同様である事から、やはり BNC は HBV の性質を反映した侵入機構によってヒト肝臓細胞内へ取り込まれている事が示された。なお、今回使用した Huh7 の様な肝臓ガン由来細胞株は、カベオラ構造を有しておらず、カベオラ依存性エンドサイトーシスが生じないと言われている。HBV や BNC がこの経路を介している事を検証するためには、カベオラを有している初代ヒト肝臓細胞を用いて同様の解析を行う必要がある。

これらの実験の結果より、BNC は HBV と同様に低親和性レセプターに結合した後に高親和性レセプターへ移行、その後エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ

る、という経路を介している事が示唆された。低親和性レセプターについては、ヘパラン硫酸プロテオグリカン等の細胞外マトリクスであるという既報があるが、細胞内への取り込みに関連し、その後の感染にとってより重要であると考えられる未知の高親和性レセプターを単離する為には、低親和性レセプターを取り除いた条件で受容体の単離・同定を行うことが重要であると考えられた。

実際に、塩素酸ナトリウム処理によって、低親和性レセプターと BNC が結合しない状態にした細胞の抽出液を用いてプルダウンアッセイを行った結果、幾つかのタンパク質が単離された。分離されたタンパク質は、恐らくヘパラン硫酸プロテオグリカン等の低親和性受容体とは異なる、高親和性受容体である可能性が示唆された。このタンパク質を今後質量分析によって同定する事で、HBV の感染受容体の特定につながると考えられる。

#### E. 結論

BNC は、HBV と同様のヒト肝臓細胞特異性を示し、その細胞内侵入機構も HBV と酷似している事から、HBV の感染モデルとして非常に有用であるとともに、以後の HBV 受容体単離のためのプローブとして用いる事が非常に有効であると考えられる。

塩素酸ナトリウム処理を施した Huh-7 細胞の抽出物中より、BNC と結合するタンパク質をプルダウンアッセイによって分離した結果、BNC に対して高い親和性を有すると考えられるタンパク質の単離に成功した。