

201228005A

厚生労働省科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた
感染阻害低分子化合物およびレセプター探索

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠

平成25(2013)年5月

厚生労働省科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた
感染阻害低分子化合物およびレセプター探索

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠

平成25(2013)年5月

目 次

I. 総括研究報告

- HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索 1
下遠野 邦忠 (国立国際医療研究センター)

II. 分担研究報告

1. 蛍光発色遺伝子を発現するHBV様粒子の産生とそれを用いた
感染初期過程の解析 7
下遠野 邦忠 (国立国際医療研究センター)
2. HBV感染モデル細胞系の樹立 11
落谷 孝広 (国立がん研究センター研究所)
3. 蛍光標識HBVを用いた感染評価と受容体探索 15
杉山 真也 (肝炎・免疫研究センター)
4. HBV感染を阻害する低分子化合物のスクリーニング 19
長田 裕之 (理化学研究所基幹研究所)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 21

IV. 研究成果の刊行物・別刷り 25

I 総括研究報告

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）
総括研究報告書

HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物
およびレセプター探索

研究代表者 下遠野 邦忠 国立国際医療研究センター 特任部長

要旨

培養細胞へ HBV が効率よく感染する系を構築し、それを用いて感染初期系を解析すると同時に、感染初期過程を阻害する低分子化合物を見いだす事をめざした。今年度は、受容体分子のスクリーニング系を確立するために蛍光ウイルスの作成を行った。HBV ゲノム内に GFP 遺伝子あるいはルシフェラーゼ遺伝子を発現させる CMV プロモーター付きのカセットを挿入した。また、HBS と GFP または mCherry を融合させた蛍光 HBS 蛋白の作成をした。それらを組み合わせることで感染後に細胞を蛍光発光（発色）させるウイルス、感染動態をモニターするための蛍光を発するウイルスの作成を行い、超遠心やサザンブロット解析で粒子形成を確認した。感染性の試験をヒト初代肝培養細胞を用いて感染実験を行い感染が成立すると思われる結果を得た。

これまでの研究から、ヒト初代肝細胞に HBV 感染が成立する事が認められているので、この系を用いて評価を行う一方、新たに感染効率の高い細胞株を得る事を試みた。落谷らが独自に開発した YPAC 因子（インヒビターカクテル）存在で初代肝細胞を培養し細胞株の樹立を試みた。一方、肝幹細胞や成体幹細胞からの肝細胞分化技術を駆使することにより感染効率の高い培養細胞の獲得も試み、以下の成果を得た；（1）4 種のシグナル伝達阻害剤カクテルである YPAC (Y-27632, Rho-associated kinase inhibitor, PD0325901; mitogen-activated protein kinase inhibitor, A-83-01; type 1 TGF beta receptor Alk5 inhibitor, CHIR99021; glycogen synthase kinase-3 inhibitor) をラット初代培養肝細胞に添加し、その細胞増殖、肝細胞様形態の維持を観察した結果、YPAC 未処理の細胞は培養 14 日後には 97% が細胞老化用の形態を示して死滅したのに対し、YPAC 処理群では、正常な染色体数を保ちながら、70% の肝細胞が正常な肝細胞様の形態と生存率を保っており、YPAC の有効性が示唆された。（2）YPAC 処理によって、成熟肝細胞の指標となる microRNA122 の発現が培養 14 日間に渡って維持された。

抗 HBV を微生物や植物の二次代謝産物、およびその誘導体の中に見いだすために、それらに存在する化合物ライブラリー整備した。抗 HBV 作用物質の探索には、感染モデル系を利用して、従来の治療薬（インターフェロンや核酸アナログ）とは異なる新たなタイプの HBV 治療薬の開発を目的とした。本年度は微生物生合成遺伝子改変技術やフラクションライブラリー、表現型スクリーニング基盤を利用し、新規天然化合物の創製を行った。

分担研究者

落谷 孝広

国立がん研究センター研究所

分野長

杉山 真也

国立国際医療研究センター

上級研究員

長田 裕之

理化学研究所基幹研究所 施設長

研究協力者

上仲 一義

化学及血清療法研究所

菊池研究所 上級研究員

A. 目的

HBV 感染の完全排除は困難であり、抜本的な治療法の開発が求められている。HBV を人為的に排除するために開発された薬剤としてポリメラーゼの逆転写活性阻害剤等があるが、ウイルス血症の状態を緩和する事はできるものの、完全排除には至らない場合が多い。従来の核酸化合物による治療に加えてウイルス複製過程の異なる点を標的にした治療薬が開発されればそれとの併用療法によるウイルスの排除が可能になると期待される。そこで本研究では HBV が標的細胞に感染する初期過程（ウイルスが細胞を認識して吸着し、細胞の中に入り込むまで）を明らかにして、その反応を阻止する方策を探ることを目的とした研究を行う。そのために、感染の初期過程を効率よく測定できる系の開発をウイルス側の改良と HBV に感受性の高い培養細胞の開発の両方面から行い、得られた系をスクリーニングに適する様に改良し、それを用いて低分子化合物をスクリーニングする。HBV の初期過程を阻害する候補物質が得られたら、ケミカルバイオロジーを駆使して候補物質からより効果の高い化合物の選択を行うと共にウイルス受容体の探索を行う。また、細胞およびウイルスに対する抗体の開発を行い感染予防に役立つ。

B. 研究方法

これまでの研究から HBV の感染には HBS 抗原の PreS1 が重要である事が示唆されている。これまで受容体の探索には

HBS に結合する細胞蛋白質がその候補と考えられ、HBS を探索針として探索が広く行われてきた。しかし、これまでに、真に受容体として認められた因子はない。受容体探索の難しい理由のひとつは、効率の良い HBV 感染系がないことである。また、HBV の膜タンパク質 (HBS) と会合する受容体候補の探索法は HBV 感染性粒子表面タンパク質の高次構造が反映されないために、方法としてあまり適しない可能性がある。また、感染の成立を HBS 抗体染色で検出するのは検出感度や簡便さなどの点でスクリーニングには不向きである。そこで、本研究では、HBV 擬粒子を用いた生理的な感染様式を用いて、感染を鋭敏に閏知する方法の開発を行うことをめざした。また、感染効率の高い細胞の樹立も重要である事から、細胞の開発を行った。さらに得られる系を用いて抗 HBV 作用物質をスクリーニングするために化合物を整備した。それぞれの研究方法は以下に記載の通りである。

(1) 蛍光遺伝子や蛍光発光蛋白質の遺伝子を内包する HBV ゲノムの調製(杉山、下遠野)

i) HBV ゲノムの中に CMV-GFP-pA のカセットを挿入した改変 HBV ゲノムを作製した (pUC19/HBV-GFP)。他に、HBS 遺伝子に蛍光遺伝子 (GFP, mCherry) を融合させたものを作製する。これらの改変で失われたウイルス遺伝子で、正常なウイルス粒子産生のために必要となる構造遺伝子を供給するために、パッケージングシグナルであるイプシロンの機能を欠損させた HBV ゲノム (pUC19/HBV- $\Delta\epsilon$) を準備する。(このイプシロン欠損ゲノムは粒子内に取り込まれないことが知られている)

ii) 改変ウイルスの産生実験

改変ウイルスゲノムと構造蛋白供給用ゲノムを同時にトランスフェクションして上清と細胞を回収する。上清は、スクロース溶液を用いた超遠心で分画を取得する。各分画の HBV 抗原, HBVDNA 量を測定すると同時に、回収した細胞は、コア内包の HBV ゲノムを抽出する方法でゲノムを回収し、サザンブロットにより細胞内での粒子形成能を確認する。

iii) 感染実験

ヒト肝臓の初代細胞に上で得られたウイ

ルスを感染させる。細胞液を抽出して、蛍光活性を調べて感染を評価する。

(2) HBV 感染過程を効率よく再現するための肝細胞の培養の試み。(落谷) 分担研究者(落谷)が独自に発見した4種のシグナル伝達阻害剤カクテルであるYPAC (PNAS, 2010)を応用する事で、初期感染過程を標的とした新規治療薬の開発に有用な細胞系を単離する。具体的には、この4種類の低分子化合物の組み合わせを変える事で、最も効率的に、ヒト肝細胞の長期機能維持培養を可能にするインヒビターカクテルを同定する。初年度はラット初代培養肝細胞を用いて培養条件を検討する。また、ヒト成人肝細胞のHBV感染の感受性を、細胞形態、継代による機能維持との関連で解析する。

(3) HBVスクリーニング系を用いて化合物スクリーニングを開始する事をめざして、(i)微生物由来天然化合物の網羅的な収集と、(ii)表現型スクリーニング基盤の構築を行う。(i)について、生合成遺伝子改変微生物やフラクションライブラリー、天然化合物データベース NPPlot を用いて新規微生物二次代謝産物を探索する。(ii)について、細胞形態変化などの表現型を指標に薬剤作用を簡便に予測するシステム構築を試みる。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え生物等の使用に際しては、各研究機関の定める細則や指針を遵守する。なお、感染性ウイルスの構築には大臣承認を得た上で実施する。

本研究で使用する研究材料のうちHBVゲノムは既に単離されているものを使用している。本研究で使用する細胞は、いずれもインフォームドコンセントのもとに倫理審査を得て採取する。市販されているヒト肝細胞については倫理的な問題点はない。

C. 研究結果

(1) 遺伝子組換えによってHBVゲノム内にGFPの発現カセットを内包した組み換えゲノムを作製した(pUC19/HBV-GFP)。また、HBS蛋白と蛍光蛋白の融合蛋白も作成した(pEGFP-C1/HBS と pmCherry-C1/HBS)。

これらを細胞内に導入し、いずれについても細胞の80%程度で蛍光遺伝子を発現していることを確認した。

また、(pUC19/HBV- $\Delta\epsilon$)を構築した。このプラスミドを導入した細胞ではHBVゲノム複製が行われていないことをサザンブロットにより確認した。

次に、pUC19/HBV- $\Delta\epsilon$ と pUC19/HBV-GFP の両方を細胞に導入し、一過性の感染粒子の作製実験を行った。培養上清を回収し密度勾配遠心を行い、野生型ウイルス粒子画分(1.2g/mL)に抗原とDNAのピークを観察した。

一方、プラスミド導入細胞から回収した細胞抽出液中に、通常のHBVの複製よりも弱いながらも組み換え体ゲノムの複製を確認した。

(2) 蛍光発色蛋白質(NanoLuc)の遺伝子を内包するHBVゲノムの調製

HBVのCoreをコードする領域をNanoLuc遺伝子と置き換えたプラスミドを構築した。このプラスミドと複製能を欠いたHBV全ゲノムを導入した細胞(HuH7)上清を回収して濃縮し、上清にHBs抗原が検出される事を確かめた。フェニックスバイオよりヒト肝臓キメラマウスから調製したヒト肝細胞を入手し、この細胞に対する感染実験を行った。他にはHuS細胞に対する感染実験も試みた。両細胞に感染させ数日後に細胞抽出液を調製した。その中のルシフェラーゼ活性を測定し、コントロールに比べて有意に高い値を示す事を確認した。

(3) 4種のシグナル伝達阻害剤カクテルであるYPACをラット初代培養肝細胞に添加して培養し、YPACの有効性が示唆された。また、YPAC処理によって、成熟肝細胞の指標となるmicroRNA122の発現も、培養14日間に渡って維持されていた。

(4) 微生物由来天然化合物の網羅的な収集

ポリケチド生合成遺伝子(PKS)改変微生物からリベロマイシンなどポリケチド系新規代謝産物を単離した。薬剤処理による細胞の形態変化を網羅的に収集した細胞形態変化データベース「モルフォベース」を構築し、形態変化を指標に薬剤作用を予測するモルフォベースプロファイリング法を開発した。

D. 考察

(1) 蛍光遺伝子を内包する HBV 擬粒子の産生。

蛍光遺伝子を内包した組み換え HBV ゲノムとウイルス遺伝子を産生するプラスミドを導入した細胞からは、組み換え体 HBV 粒子が産生されると考えられる。

今後は、初代培養肝細胞やヒト肝細胞置換キメラマウスへの感染実験を行い、その感染力価を確認していく。また、より効率的なウイルス産生システムを検討する。蛍光を発色する遺伝子 (NanoLuc) を内包する HBV 様粒子の産生実験を行った。培養上清を濃縮し、それを感染させた肝細胞において Luc 活性が観察されたことから、擬粒子が産生されそれが感染性を示す事が示唆された。しかし、粒子産生が期待される培養上清中に擬ウイルス粒子が確かに存在するかについての確認実感は時間の関係で完了していない。今後、NanoLuc 遺伝子をもつウイルスが存在するかについては、サザンブロットにより検証する必要がある。また、感染が真に HBV 粒子感染の機構により成立しているかについても、阻害剤による感染阻止等の実験を行い検証する必要がある。

(2) 本年度 YPAC が肝細胞形態・機能維持の能力を有する事が判明したので、この手法をヒト初代培養肝細胞に応用し、ヒト肝細胞培養維持にも有効かどうかを判定する。肝細胞の長期培養が可能になった場合、他の班員との共同研究で蛍光ラベル化 HBV 粒子を感染させ、その動態を解析し、初期感染過程を標的とした新規治療薬の開発に有用な細胞系を確立する。

(3) HBV 感染阻害薬の探索源に資する化合物を整備した。今後 3 万種類以上整えることを目指す。さらに、新規微生物代謝産物を見出すと共に植物エキスのフラクションライブラリー作製に着手し、当初の目標をクリアするべく研究は順調に進んでいる。また、今回構築したモルフォベースプロファイリング法は、HBV 感染アッセイ系でヒットした化合物の作用評価に役立つことが期待される。

本研究が開始された年に、HBV 受容体候補として sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) が報告された。本蛋白質は HBV PreS1 と会

合する因子として単離された。本因子が真に唯一の HBV 受容体なのか、あるいは複数個存在するうちのひとつなのか興味を持たれる。次年度には今年度が開発したウイルス感染系を用いて、本因子の受容体としての評価実験を行いたい。

E. 結論

(1) 遺伝子組み換えにより外来蛍光蛋白質を有する HBV ゲノムを構築し、その粒子形成を確認した。

(2) インヒビター (TPAC) による遺伝子発現変化の誘導が、肝細胞の分化機能維持や長期培養に貢献する可能性を示した。

(3) 抗 HBV 薬のスクリーニングに資する化合物ライブラリーを拡充するため、遺伝子改変微生物から新規代謝産物を単離した。細胞形態変化を指標に薬剤作用を予測するモルフォベースプロファイリング法を開発した。

F. 健康危険情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for analysis of the hepatitis C virus life cycle. *Microbiol Immunol.* 56(1):1-9. 2012

2. Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. *Virus Res.* 163(1):390-395, 2012

3. Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol.* 2012 Dec 18.

4. Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W,

Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: In vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 Jan 15;23(2):503-6.

5. Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(9):e44743.

6. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One*. 2012;7(6):e39175.

7. Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet*. 2012 Jun 19;13:47.

8. Kawamata M, Ochiya T. Two distinct knockout approaches highlight a critical

role for p53 in rat development. *Sci Rep*, 2: 945, 2012

9. Katsuda T, Sakai Y, Ochiya T. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes as an alternative to human adult hepatocytes. *J Stem Cells*, 7: 1-17, 2012

10. Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Taguchi YH. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. *PLoS One*, 7:e48366, 2012

11. Nogawa T, Takahashi S, Sekiyama Y, Takagi H, Uramoto M, Koshino H, Kawatani M, Shimizu T, Osada H. Creation of novel reveromycin derivatives by alcohol added fermentation. *J Antibiot*, in press, 2012

12. Futamura Y, Kawatani M, Kazami S, Tanaka K, Muroi M, Shimizu T, Tomita K, Watanabe N, Osada H. Morphobase, an encyclopedic cell morphology database, and its use for drug target identification. *Chem Biol*, 19:1620-1630, 2012

2. 学会発表

1. 「宿主・ウイルスゲノム解析によるC型肝炎の病態解明にむけて

“Host and viral genome analyses on hepatitis C”」杉山真也 ワークショップB1 国立遺伝学研究所研究会 NIG Workshop 国立遺伝学研究所 三島 2012年3月12日

2. 「IL28B 特異的測定系の開発と臨床的意義の検討」杉山真也, 村田一素, 溝上雅史 シンポジウムS1-1 第77階日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 神戸商工会議所 神戸 2012年6月21日

3. 「C型慢性肝炎と自然治癒に関連する第二遺伝要因の探索とその応用」杉山真也, 平峯智, 西田奈央, 伊藤清顕, 村田一素, 正木尚彦, 井戸章雄, 坪内博仁, 溝上雅史 ワークショップ WS25-3 第48回日本肝臓学会総会 ポルテ金沢 金沢 2012年6月7日

4. 落谷孝広 マイクロRNAによるステム細胞からの肝細胞誘導, 第25回日本動物実験代替法学会, 2012年12月7日,

東京

5. 二村友史, 川谷誠, 風見紗弥香, 富田康司, 渡邊信元, 長田裕之「細胞形態変化データベースを基盤としたがん分子標的薬の探索研究」第16回日本がん分子標的治療学会学術集会, 北九州, 6月, 2012

6. 野川俊彦, 高橋俊二, 関山恭代, 高木海, 岡野亜紀子, 浦本昌和, 川谷誠, 越野広雪, 清水猛, 長田裕之「新規リペロマイシン誘導体の創製と活性評価」第54回天然有機化合物討論会, 東京, 9月, 2012

7. 二村友史, 川谷誠, 青野晴美, 渡邊信元, 長田裕之 “Development and utilization of an encyclopedic cell-morphology database, Morpholome, for the drug target identification” 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 9月, 2012

8. 野川俊彦, 川谷誠, 浦本昌和, 岡野亜紀子, 青野晴美, 高橋俊二, 長田裕之「糸状菌より単離した新規ピロリジジノン化合物, ピロリジラクトンの構造」日本農芸化学会2013年度大会, 仙台, 3月, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願名称: ラット胚性幹細胞を用いたキメララットの作製法

出願人: 国立がん研究センター; DSファーマバイオメディカル株式会社

発明者 落谷 孝広、川又 理樹

出願日時 平成22年7月23日

出願番号 特願2010-166571

2. 実用新案登録

なし

Ⅱ 分担者研究報告

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

蛍光発色遺伝子を発現するHBV様粒子の産生とそれを用いた感染初期過程の解析

分担研究者 下遠野 邦忠 国立国際医療研究センター 特任部長

研究要旨：

培養細胞へHBVが効率よく感染する系を構築し、それを用いて感染初期系を解析すると同時に、感染初期過程を阻害する低分子化合物を見いだす事をめざした。そのためにHBVゲノムに蛍光蛋白質をコードする遺伝子、あるいは蛍光を発光する遺伝子を組み込んだ擬HBV粒子の作成を行い、それを用いて標的細胞へお感染実験を行った。もし、感染が成立すれば細胞から蛍光標識されるか、細胞抽出液を蛍光発色する事により発光が観察されると期待された。細胞にはヒト初代肝培養細胞および樹立されたヒト肝細胞を用いた感染実験を行った。その結果、感染が成立すると思われる結果を得た。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）感染は宿主の免疫機構が働き中和抗体（HBs抗体）が産生される事により、ウイルス血症状態が無くなるといわれている。しかし、その他のHBVマーカーの有無により、ウイルス量に差はあるものの若干のウイルスが血流中に検出されたり肝組織内にウイルスゲノムが検出されたりする。すなわちHBs抗体の出現がウイルスの完全なる排除を意味しない場合がある。現在はウイルスポリメラーゼを標的にした核酸化合物HBVの複製を阻害する事を利用した治療やインターフェロンによる治療がなされているが、これらの治療によってもウイルスの完全排除は困難であり、抜本的な治療法の開発が求められている。

本研究では従来の核酸化合物による治療に加えてウイルス複製過程の異なる点を標的にした治療薬が開発されればそれとの併用療法によるウイルスの排除が可

能になると期待される。そこで本研究ではHBVが標的細胞に感染する初期過程（ウイルスが細胞を認識して吸着し、細胞の中に入り込むまで）を明らかにして、その反応を阻止する方策を探ることを目的とした研究を行う。

B. 研究方法

HBV感染者の血清中には僅かなHBV粒子（Dane粒子）の他に、HBs蛋白質の凝集塊が圧倒的に多数存在する。この血清は高い感染性を有するので、HBs蛋白質凝集塊がDane粒子感染を阻害しないと考えられる。すなわち、Dane粒子表面のHBs蛋白質はHBs抗原凝集塊よりも感染の反応に優先すると考えられる。そこでDane粒子（HBV）様ウイルス粒子をもとにした感染系を人為的に構築する事を考え、以下の研究方法を採用した。

- (1) 蛍光発色蛋白質（NanoLuc）の遺伝子を内包するHBVゲノムの調製
HBVゲノムからPreCoreをコードする

領域と DR1, DR2 シス因子を含むサブゲノムを取り出し、Core をコードする領域を NanoLuc 遺伝子と置き換える。

(2) 粒子産生に必要な全ての HBV 蛋白質を産生するベクターの構築

1.2 倍 HBV ゲノムからパッケージングシグナルに変異を入れて、このゲノムが粒子に組み込まれないような構造にする。

(3) 組み換え体ウイルスの産生

上の(1)(2)で得られたプラスミドを HuH7 に導入して、培養上清を回収し HBV 様粒子を濃縮する。

(4) 感染実験

ヒト肝臓の初代細胞に(3)で得られたウイルス液を感染させる。細胞液を抽出して、NanoLuc 活性を調べて感染を評価する。

(倫理面への配慮)

本研究で使用する研究材料のうち HBV ゲノムは既に単離されているものを使用し、細胞は市販されているヒト肝細胞を用いており、倫理的な問題点はない。

C. 研究結果

(1) 蛍光発色蛋白質 (NanoLuc) の遺伝子を内包する HBV ゲノムの調製

実験方法に従い、HBV の Core をコードする領域を NanoLuc 遺伝子と置き換えたプラスミドを構築した。構造の概略を図に示した。

(2) 粒子産生に必要な全ての HBV 蛋白質を産生するベクターの構築

粒子に組み込まれないようにするために、シス因子 Epsilon に変異 (A から G) を導入した。構造の概略図を図

に示した。

(3) 組み換え体ウイルスの産生

上記(1)(2)のプラスミドを共に HuH7 にトランスフェクとした。3日後に上清を回収して濃縮した。上清に HBs 抗原が検出される事を ELISA により確かめた。

(4) 感染実験

フェニックスバイオよりヒト肝臓キメラマウスから調製したヒト肝細胞を購入し、この細胞に対する感染実験を行った。他には HuS 細胞に対する感染実験も行った。

両細胞に感染させ数日後に細胞抽出液を調製した。その中のルシフェラーゼ活性を測定し、コントロールに比べて有意に高い値を示す事を確認した。

D. 考察

蛍光を発色する遺伝子 (NanoLuc) を内包する HBV 様粒子の産生を行った。培養上清を濃縮し、それを感染させた肝細胞において Luc 活性が観察されたことから、擬粒子が産生されそれが感染性を示す事が示唆された。しかし、粒子産生が期待される培養上清中に擬ウイルス粒子が確かに存在するかについては、まだ確認していない。今後、NanoLuc 遺伝子をもつウイルスが存在するかについては、サブプロットの実験により検証する必要がある。また、感染が真に HBV 粒子感染の機構により成立しているかについても、阻害剤による感染阻止等の実験を行い検証する必要がある。

E. 結論

HBV の感染初期過程を明らかにして、感

染を阻害する因子を見いだすには感染初期反応を簡便に測定できる系が必要である。筆者は分担研究員の一人杉山真也博士と共同で、ここに記載の方法による簡便、かつ特異的に感染を評価する系の開発を試みている。これまでの予備的な実験から、蛍光発色を指標にして感染を評価する系ができつつあると考えられる成果を得て来た。次年度はこの系の信憑性を検証し、問題なければスクリーニングの系を動かすための系の開発を行う予定である。

F. 健康危険情報

無し.

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Aly HH, Shimotohno K, Hijikata M, Seya T. In vitro models for analysis of

the hepatitis C virus life cycle. Microbiol Immunol. 56(1):1-9. 2012

- 2) Ujino S, Nishitsuji H, Sugiyama R, Suzuki H, Hishiki T, Sugiyama K, Shimotohno K, Takaku H. The interaction between human initiation factor eIF3 subunit c and heat-shock protein 90: a necessary factor for translation mediated by the hepatitis C virus internal ribosome entry site. Virus Res. 163(1):390-395, 2012

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

1. その他

なし

蛍光標識 HBV を用いた感染評価と受容体探索

分担研究者 氏名：杉山真也

所属：国立国際医療研究センター

職名：上級研究員

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）が発見されて以来、その感染受容体は不明のままである。本研究では、その HBV 感染受容体を同定することを目的とする。今年度は、受容体分子のスクリーニング系を確立するために蛍光ウイルスの作成を行った。HBV ゲノム内に GFP 遺伝子を発現させる CMV プロモーター付きのカセットを挿入した。また、HBS と GFP または mCherry を融合させた蛍光 HBS 蛋白の作成をした。それらを組み合わせることで感染後に細胞を蛍光させるウイルス、感染動態をモニターするための蛍光を発するウイルスの作成を行った。それらを超遠心やサザンブロットにより解析することで粒子形成を確認した。

A. 研究目的

本研究では、HBV のゲノムを改変、もしくはウイルス粒子への蛍光蛋白の修飾などを行うことで、HBV の感染過程を明らかとすることを目的とした。

現在も HBV 感染の受容体は不明のままであり、組織化された肝臓でしか感染しないことなどから細胞間の相互作用により誘導される遺伝子が有力な候補として考えられている。ウイルス感染の可視化を行うことで、*in vitro* や *in vivo* での感染の過程を観察し、受容体探索の有力なツールとする。

具体的には、感染過程を観察できる

ように、感染が成立した際に細胞が蛍光を発する機能を持つウイルス、ウイルスの感染動態を確認するためのウイルス自身が蛍光する粒子の作製を行った。

B. 研究方法

HBV ゲノムの中に CMV-GFP-pA のカセットを挿入した改変 HBV ゲノムを作製した（pUC19/HBV-GFP）。他に、HBS 遺伝子に蛍光遺伝子（GFP, mCherry）を融合させたものを作製した。これらの改変で失われたウイルス遺伝子で、正常なウイルス粒子産生のために必要となる構造遺伝子を供給す

るために、パッケージングシグナルであるイプシロンの機能を欠損させた HBV ゲノムを準備した (pUC19/HBV- $\Delta\epsilon$)。このイプシロン欠損ゲノムは粒子内に取り込まれないことが知られている。

改変ウイルスゲノムと構造蛋白供給用ゲノムを同時にトランスフェクションして上清と細胞を回収した。上清は、スクロース溶液を用いた超遠心で分画を取得した。各分画の HBV 抗原、HBVDNA 量を測定した。回収した細胞は、コア内包の HBV ゲノムを抽出する方法でゲノムを回収し、サザンブロットにより細胞内での粒子形成能を確認した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験では、組換えウイルスゲノムを保有した感染性ウイルスが産生されるために大臣承認を得た上で実施した。患者データは使用していないため、個人情報等は取り扱っていない。

C. 研究結果

遺伝子組換えによって HBV ゲノム内に GFP の発現カセットを内包した組み換えゲノムを作製した (pUC19/HBV-GFP)。また、HBS 蛋白と蛍光蛋白の融合蛋白も作成した (pEGFP-C1/HBS と pmCherry-C1/HBS)。

まずは、それらを個々にトランスフェクションすることで、細胞内での発

現を確認したところ、いずれについても細胞の 80%程度で蛍光遺伝子を発現していることを確認した。

続いて、ウイルス粒子の構造遺伝子をトランスに供給するための HBV ゲノムを作製した。パッケージングシグナルを欠損させたクローンを作成し、サザンブロットにより複製が行われていないことを確認した (pUC19/HBV- $\Delta\epsilon$)。

pUC19/HBV- $\Delta\epsilon$ と pUC19/HBV-GFP をコトランスフェクションすることで一過性の感染粒子の作製を行った。培養上清を回収し、濃度勾配のあるスクロース液を用いた超遠心で分画を得た。その HBs 抗原、HBcr 抗原、HBVDNA を測定したところ、1.2g/mL 当りに抗原と DNA のピークを観察した。それを感染粒子の分画と考えた。

コトランスフェクションした細胞から回収した細胞溶解液は、コア内包型ゲノムのみを回収するサザンブロットにより複製効率 (粒子形成能) を確認した。その結果、通常の HBV の複製よりも弱いながらも粒子形成を確認した。

同様にして、pUC19/HBV- $\Delta\epsilon$ 、pUC19/HBV-GFP、pEGFP-C1/HBS または pmCherry/HBS を組み合わせることで HBS の外殻に蛍光蛋白を持つ感染粒子を行い、超遠心とサザンブロットにより粒子形成を確認した。

D. 考察

超遠心から得た分画の HBVDNA 量

や抗原量から，粒子が存在すると考えられた．その分画の密度は 1.2g/mL であり既報のとおりであった．サザンブロットによってもゲノムを内包した粒子形成を確認できた．

今後は，初代培養肝細胞やヒト肝細胞置換キメラマウスへの感染実験を行い，その感染力価を確認していく．また，より効率的なウイルス産生システムを検討する．

E. 結論

遺伝子組み換えにより外来蛍光蛋白を有する HBV ゲノムを構築し，その粒子形成を確認した．

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sunbul M, Sugiyama M, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol*. 2012 Dec 18.
- 2) Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: In vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 Jan 15;23(2):503-6.
- 3) Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(9):e44743.
- 4) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One*. 2012;7(6):e39175.
- 5) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K,

Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet*. 2012 Jun 19;13:47.

2. 学会発表

- 「宿主・ウイルスゲノム解析による C 型肝炎の病態解明にむけて “Host and viral genome analyses on hepatitis C”」杉山真也 ワークショップ B1 国立遺伝学研究所研究会 NIG Workshop 国立遺伝学研究所 三島 2012 年 3 月 12 日
- 「IL28B 特異的測定系の開発と臨床的意義の検討」杉山真也, 村田一素, 溝上雅史 シンポジウム S1-1 第 77 階日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 神戸商工会議所 神戸 2012 年 6 月 21 日
- 「C 型慢性肝炎と自然治癒に関連する第二遺伝要因の探索とその応用」杉山真也, 平峯智, 西田奈央, 伊藤清顕, 村田一素, 正木尚彦, 井戸章雄, 坪内博仁, 溝上雅史 ワ

ークショップ WS25-3 第 48 回日本肝臓学会総会 ポルテ金沢 金沢 2012 年 6 月 7 日

H. 知的財産権の出願・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

HBV 感染モデル細胞系の確立

分担研究者 落谷孝広 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野 分野長

研究要旨：スクリーニングに用いる感染細胞の利用については、これまでの研究からヒト初代肝細胞に対する HBV 感染が認められているので、この系を用いて評価を行いつつ、既に樹立されている肝細胞の培養条件を検討し、落谷らは独自に開発した YPAC などの因子（インヒビターカクテル）を用いた感染効率の高い細胞株を得る事、あるいは肝幹細胞や成体幹細胞からの肝細胞分化技術を駆使するなどして感染効率の高い培養細胞の獲得をおこなう。初年度の成果は以下の通りである：（1）4種のシグナル伝達阻害剤カクテルである YPAC をラット初代培養肝細胞に添加し、その細胞増殖、肝細胞様形態の維持を観察した結果、YPAC 未処理の細胞は培養14日後には97%が細胞老化用の形態を示して死滅したのに対し、YPAC 処理群では、正常な染色体数を保ちながら、70%の肝細胞が正常な肝細胞様の形態と生存率を保持しており、YPAC の有効性が示唆された。（2）YPAC 処理によって、成熟肝細胞の指標となる microRNA122 の発現も、培養14日間に渡って維持されていた。

A. 研究目的

抗ウイルス薬開発のスクリーニングに用いる感染細胞の利用については、これまでの研究からヒト初代肝細胞に対する HBV 感染が認められているので、この系を用いて評価を行いつつ、既に樹立されている肝細胞の培養条件を検討し、分担研究者らは独自に開発した YPAC などのインヒビター（低分子化合物）を用いた感染効率の高い細胞株を得る事、あるいは肝幹細胞や成体幹細胞からの肝細胞分化技術を駆使するなどして感染効率の高い培養細胞の獲得をおこなう。

B. 研究方法

HBV 感染過程を再現するために最適な肝細胞の培養系が確立されていない。分担研究者（落谷）が独自に発見した4種のシグナル伝達阻害剤カクテルである YPAC (PNAS, 2010) を応用する事で、初期感染過程を標的とした新規治療薬の開発に有用な細胞系を提供する。具体的には、この4種類の低分子化合物の組み合わせを変える事で、最も効率的に、ヒト肝細胞の長期機能維持培養を可能にするインヒビターカクテルを同定する。初年度は、ラット初代培養肝細胞およびヒト成人肝細胞を用いて、そのスクリーニングを、細胞形態、継代による機能維持を測定可能なアッセイ系を立ち上げる。

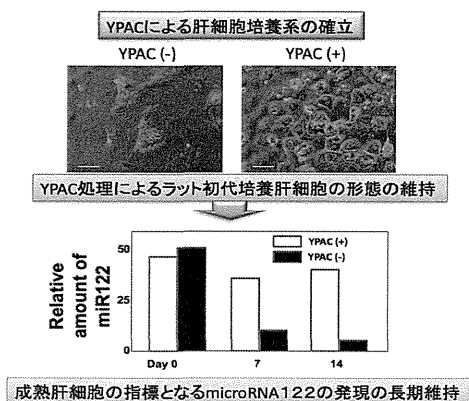
(倫理面への配慮)

本研究で使用する細胞は、いずれもインフォームドコンセントのもとに倫理審査を得て採取され、市販されているヒト肝細胞であるため、倫理的な問題点はない。

C. 研究結果

1) 4種のシグナル伝達阻害剤カクテルである YPAC をラット初代培養肝細胞に添加し、その細胞増殖、肝細胞様形態の維持を観察した結果、YPAC 未処理の細胞は培養 14 日後には 97% が細胞老化用の形態を示して死滅したのに対し、YPAC 処理群では、正常な染色体数を保ちながら、70% の肝細胞が正常な肝細胞様の形態と生存率を保持しており、YPAC の有効性が示唆された。

(2) YPAC 処理によって、成熟肝細胞の指標となる microRNA122 の発現も、培養 14 日間に渡って維持されていた。



D. 考察

(1) 初年度で YPAC の肝細胞形態・機能維持の能力が有る事が判明したことから、この手法をヒト初代培養肝細胞に適応し、

microRNA122 や肝臓特異的遺伝子発現を指標にして、肝細胞培養維持に有効かどうかを判定する。

(2) YPAC による肝細胞機能維持と長期培養が可能になった場合、他の班員との共同研究で蛍光ラベル化 HBV 粒子を感染させ、その動態を解析し、初期感染過程を標的とした新規治療薬の開発に有用な細胞系を確立する。

E. 結論

初年度の成果から、インヒビターによる遺伝子発現変化の誘導が、肝細胞の分化機能維持や長期培養に貢献する可能性が明らかとなった。

F. 健康危険情報

特に初年度は無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawamata M, Ochiya T. Two distinct knockout approaches highlight a critical role for p53 in rat development. *Sci Rep*, 2: 945, 2012

2) Katsuda T, Sakai Y, Ochiya T. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes as an alternative to human adult hepatocytes. *J Stem Cell s*, 7: 1-17, 2012

3) Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Taguchi YH. Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease. *PLoS One*, 7:e48366, 2012

1. 学会発表

落谷孝広 マイクロRNAによるステム細胞からの肝細胞誘導, 第25回日本動物実験代替法