

- パシフィコ横浜 2013.
- 2) 金 秀基、丸澤宏之、肝幹/前駆細胞を起源とする肝発癌モデルを用いたゲノム異常の網羅的解析. 第 17 回日本肝臓学会大会. 品川プリンスホテル. 2013.
 - 3) 上田佳秀、海道利実、伊藤孝司、小川晃弊、吉澤 淳、藤本康宏、森 章、増田智先、細川実緒、上杉美和、端 幸代、河合知喜、松原和夫、千葉 勉、上本伸二. 肝移植後 C 型肝炎に対するテラプレビル+ペグインターフェロン+リバビリン治療. 第 31 回日本肝移植研究会・シンポジウム. 熊本全日空ホテルニュースカイ. 2013.
 - 4) 渡部則彦、池田亜希、丸岡隆太郎、西浦尚代、岩本 諭、青木信裕、木戸政博、千葉 勉. 慢性から劇症まで多様な病態を呈する自己免疫性肝炎モデルを用いた AIH 病態形成機構の解明. 第 50 回日本消化器免疫学会総会・シンポジウム. ホテルグランドビル市ヶ谷. 2013.
 - 5) 渡部則彦、丸岡隆太郎、池田亜希. 慢性から劇症まで多様な病態を呈する自己免疫性肝炎 (AIH) モデルでの病態解析. JDDW2013 第 55 回日本消化器病学会大会・パネルディスカッション. グランドプリンスホテル新高輪 2013.
- 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

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：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野
研究協力者：Lin Deng 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野
勝二郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野

分担研究課題：B型肝炎ウイルス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(HBV)は、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、しばしば慢性肝炎、肝硬変や肝細胞癌を引き起こす。HBV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と考えられている。本研究では、HBxの多様な機能の分子機序を明らかにするために新規HBx結合宿主タンパク質の探索を行い、癌抑制因子として知られペルオキシダーゼであるPrdxファミリーに属するperoxiredoxin 1 (Prdx1)、及び、様々な原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子の発現制御に関与しているヒストンメチルトランスフェラーゼSMYD3を同定した。Prdx1との結合にはHBxのN末端領域が、また、SMYD3との結合にはHBxのC末端領域が、それぞれ重要であることがわかった。HBxとPrdx1あるいはSMYD3との結合の病原的意義については今後の検討課題である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は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、しばしば慢性肝炎、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 9 種類の genotype (A~H, J) 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 の genotype や 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。我が国には genotype C と genotype B が多いが、近年、海外から持ち込まれた genotype A の感染症例が増加している。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。また、genotype A は genotype C や genotype B より慢性化率が高いことが知られている。

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 が存在する。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 RNA 分解酵素としても機能する。X 遺伝子から HBx タンパク質(HBx)が産生される。HBx は細胞質と核の双方に存在する。HBx はウイルス遺伝子の転写活性化作用を有し、また、多くの宿主因子と相互作用する多機能タンパク質であり、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、及び細胞癌化にも関与していると考えられている。

本研究では、タンデムタグ・アフィニティークロマトグラフィー/質量分析法等により HBx と結合する新規の宿主タンパク質を探索し、宿主細胞の調節機能を脱制御する HBx の役割を解明することを通して、HBV 複製機構を解明し、HBV 複製を抑制する創薬開発に繋げることを目的とした。

B. 研究方法

1) タンデムタグ・アフィニティークロマトグラフィー/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 HBx を発現させ、1% Triton X-100 を含む lysis buffer で細胞を溶解させた。全長 HBx は難溶性であるため、本実験では種々の欠失変異体を作製し、可溶性の高い HBx 欠失変異体を発現させて検討した。常法により、Huh7.5 細胞に Myc-His タグ付き HBx を発現させ、その細胞溶解液を Ni-NTA アガロースにて精製した。その後、イミダゾールで HBx/宿主タンパク質複合体を溶出し、さらに抗 c-Myc 抗体ビーズを用いて精製した。精製した HBx 複合体を SDS-PAGE で分画し、銀染色により候補と考えられるバンドを切り出し、質量分析法により HBx 結合宿主タンパク質候補を同定した。

2) タンパク質・タンパク質相互作用の解析：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 結合宿主タンパク質候補と HBx を共発現させ、2~3 日後に細胞を回収し、両者の結合や細胞内共局在について、免疫共沈法、ウエスタンブロット法及び免疫蛍光共焦点顕微鏡法を用いて解析した。

3) 宿主細胞の酸化ストレス及び JNK 活性化に及ぼす HBx の影響の解析：Huh7.5 細胞に、酸化ストレス検出用の ARE ルシフェラーゼレポーター遺伝子(pGL4.37)あるいは JNK 活性化検出用の AP1 RE ルシフェラーゼレポーター遺伝子(pGL4.44)を、全長 HBx あるいは欠失変異 HBx 発現プラスミドとともにトランスフェクションして培養後、ルシフェラーゼ活性を指標にして、宿主細胞の酸化ストレス及び JNK 活性化に

及ぼす HBx の影響について解析した。

(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。遺伝子組換え HBV の使用は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得た。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、遺伝子組換え実験及びバイオセーフティー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) 可溶性 HBx 欠失変異体の同定：種々の HBx 欠失変異体を Huh7.5 細胞に一過性に発現させ、常法により細胞溶解液を得て可溶性画分と不溶性画分に分け、それぞれを抗 HBx 抗体を用いたウエスタンブロット法にて解析した。その結果、N 末端 90 アミノ酸領域(HBx[1-90])の可溶性が高いことを確認した。

2) タンデムタグ・アフィニティークロマトグラフィー/質量分析法を用いた HBx 結合宿主タンパク質の同定：上記の HBx(1-90) 発現プラスミドを用いてタンデムタグ・アフィニティークロマトグラフィー/質量分析法を行い、新規の HBx 結合宿主タンパク質として peroxiredoxin 1 (Prdx1)を同定した。

3) HBx と Prdx1 の相互作用の解析：HBx(1-90)発現 Huh7.5 細胞において、内在性 Prdx1 と HBx(1-90)が結合することを免疫共沈法で確認した。全長 HBx と Prdx1 の結合も軽度であるが確認した。

4) HBx と Prdx1 の細胞内局在の解析：免疫蛍光共焦点顕微鏡法により、HBx(1-90)は細胞質と核にほぼ均等に分布していることがわかった。一方、内在性 Prdx1 は細胞質に強く発現し、核には弱く発現していた。そして、HBx(1-90)と Prdx1 が細胞質で共局在していることを確認した。

5) 宿主細胞の酸化ストレス及び JNK 活性化に及ぼす HBx の影響の解析：HBx によ

る酸化ストレス及び JNK 活性化並びにそれに対する Prdx1 の関与について調べるため、まず、全長 HBx あるいは欠失変異 HBx についてルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した。その結果、全長 HBx は酸化ストレス及び JNK 活性化を強く誘導するが、HBx(1-90)及び HBx(1-70)はその誘導活性が有意に減弱していることが明らかになった。現在、内在性 Prdx1 の関与について解析中である。

6) HBx と SMYD3 の相互作用の解析：まず、全長 HBx と SMYD3 を Huh7.5 細胞に一過性に共発現させると両者が結合することを免疫共沈法で確認した。また、HBV 複製細胞における HBx と一過性発現 SMYD3 の結合、及び、一過性発現全長 HBx と内在性 SMYD3 の結合を免疫共沈法で確認した。

7) HBx と SMYD3 の結合領域のマッピング解析：HBx と SMYD3 の様々な欠失変異体を Huh7.5 細胞に一過性に共発現させて両者の結合領域のマッピング解析を行った。その結果、HBx の C 末端領域(131-154)、及び、SMYD3 の C 末端領域(248-428)が、両者の結合に重要であることがわかった。

D. 考察

本研究において、タンデムタグ・アフィニティークロマトグラフィー/質量分析法を用いて、新規 HBx 結合宿主因子として Prdx1 を単離・同定した。Prdx1 はペルオキシダーゼである Prdx ファミリーに属し、細胞の生理機能を維持する重要な抗酸化タンパク質である。Prdx1 は細胞質と核に存在し、癌抑制因子として JNK、c-Myc、PTEN などシグナル伝達タンパク質と結合することにより、細胞増殖やアポトーシスなどに関与することが知られている。我々はこれまでに、Prdx1 が E6-associated protein (E6AP) と結合する事、及び Prdx1 の分解に E6AP が関与していることを報告した。本研究において、全長 HBx 及び HBx(1-90)が Prdx1 と結合することが明らかになった。両者の共局在場所は主として細胞質であるが、核における共局在もわずかであるが認

められた。ヒト肝癌組織において C 末端を欠失した変異 HBx が発現していることが報告されているが、そのような変異 HBx と Prdx1 の相互作用がどのような病原的意義を有しているかについては不明な点が多い。今後、酸化ストレス、JNK 活性化及びその他のシグナル伝達系への影響について詳細に解析する予定である。また、両者の結合に関与する領域のより詳細なマッピングも併せて行う。

一方、HBx 結合宿主因子探索の過程で、全長 HBx がヒストンメチルトランスフェラーゼ SMYD3 と結合することを見出した。SMYD3 は細胞質と核に存在しているが、核内のヒストン H3 や H4 の特定のアミノ酸残基をメチル化し、クロマチン構造変換を引き起こすことによって、種々の原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子の発現制御に関与している。また、SMYD3 は乳癌をはじめ肝細胞癌、大腸癌、前立腺癌などで過剰発現していることが報告されている。本研究において、HBx と SMYD3 の結合領域のマッピング解析の結果、HBx の C 末端領域(131-154)、及び、SMYD3 の C 末端領域(248-428)が、両者の結合に重要であることが明らかになった。HBx と SMYD3 の相互作用の病原的意義についても今後引き続き検討する。また、両者の結合領域の詳細なマッピングも併せて行う。

E. 結論

新規 HBx 結合宿主因子として Prdx1 及び SMYD3 を単離・同定した。Prdx1 との結合には HBx の N 末端領域が、また、SMYD3 との結合には HBx の C 末端領域が、それぞれ重要であることがわかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Utsumi T, Yano Y, Hotta H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Asia. World J Med Genet, (in press)
- 2) Rinonce HT, Yano Y, Utsumi T, Heriyanto DS, Anggorowati N, Widasari DI, Lusida MI, Soetjipto, Prasanto H, Hotta H, Hayashi Y.

Hepatitis B and C virus infection among hemodialysis patients in Yogyakarta, Indonesia: Prevalence and molecular evidence for nosocomial transmission. *J Med Virol.* 5(8): 1348-1361, 2013.

- 3) 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*, 43: 1032-1039, 2013.
 - 4) Ratnoglik S L, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*, (in press)
 - 5) Adianti M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni T S, Lusida MI, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiol Immunol*, (in press)
 - 6) 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*, 58: 555-563, 2013.
 - 7) Shimizu YK, Hijikata M, Oshima M, Shimizu K, Alter HJ, Purcell RH, Yoshikura H, Hotta H. Isolation of human monoclonal antibodies to the envelope E2 protein of hepatitis C virus and their characterization. *PLoS ONE*, 8(2): e55874, 2013.
 - 8) Wahyuni TS, Tumewu L, Permanasari AA, Apriani E, Adianti M, Rahman A, Widyawaruyanti A, Lusida MI, Fuad A, Soetjipto, Nasronudin, Fuchino H, Kawahara N, Shoji I, Deng L, Aoki C, Hotta H. Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virol J*, 10(1): 259, 2013.
2. 学会発表
- 1) Hotta H. HCV infection, glucose metabolism disorder and liver cancer. 2013 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and 2013 Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. Tainan, Taiwan. November 16-17, 2013.
 - 2) Triani E, Juniastuti, Utsumi T, Amin M, Soetjipto, Yano Y, Hotta H, Hayashi Y, Lusida MI. High prevalence of hepatitis B infection among Indonesian migrant workers from Lombok Island, Indonesia and its HBV molecular characteristics. Asian-Africa Research Forum on Emerging and Reemerging Infections, Sendai, January 20-22, 2014.
 - 3) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with SMYD3 and upregulates SMYD3-mediated expression of AGR3 mRNA. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
 - 4) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV upregulates Bim through ROS/JNK signaling pathway leading to Bax-mediated apoptosis. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
 - 5) Ratnoglik SL, Jiang DP, Aoki C, Sudarmono P, Deng L, Shoji I, Hotta H. Development of a prophylactic and therapeutic vaccine against Hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
 - 6) Matsui C, Shoji I, Minami N, Sianipar I R, Deng L, Hotta H. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α by hepatitis C virus NS5A protein. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
 - 7) Aoki C, Hartati S, Hanafi M, Kardono LBS, Mirawati ST, Dewi BE, Sudarmono P, Shimizu Y, Hotta H. Various statins at high concentrations enhance HCV virion release from the infected cells. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
 - 8) Hotta H, Aoki C, Ratnoglik SL, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H,

- Kawahara N. Antiviral activity of chlorophyll derivatives, pheophorbide a, chlorin e6 and mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6), against hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 9) 森順子, 姜大鵬, 定岡知彦, 山西弘一, 堀田博, 森康子. HCV非構造タンパク質 NS3遺伝子を発現する組換え水痘ワクチンの作製. 第28回ヘルペスウイルス会, 淡路, 2013年5月.
- 10) 西瀬 雄子, 斎藤 貴史, 勝見 智大, 富田 恭子, 佐藤 智佳子, 石井 里佳, 奥本和夫, 渡辺 久剛, 今井 康陽, 堀田 博, 上野 義之. 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 3 報). 第 49 回日本肝臓学会総会, 東京, 2013 年 6 月.
- 11) 矢野 嘉彦, 金 守良, 瀬尾 靖, 斎藤 雅也, 平野 仁崇, 谷 聡, 菅野 雅彦, 林祥剛, 堀田 博, 東 健. 慢性 C 型肝炎に対する 3 剤併用療法の治療効果と治療予測因子の検討・NS3 領域変異を含めて. 第 49 回日本肝臓学会総会, 東京, 2013 年 6 月.
- 12) 金 守良, El-Shamy A, 堀田 博. 2 型高ウイルス量 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, 及びそれに関連するウイルス因子、宿主因子の検討. 第 49 回日本肝臓学会総会, 東京, 2013 年 6 月.
- 13) 勝二郁夫, DENG Lin, 松井千絵子, 堀田博. HCV 感染による糖代謝障害の分子機序. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. シンポジウム, 神戸, 2013 年 11 月.
- 14) DENG Lin, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Bax 活性化の分子機序の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 15) 青木千恵, 清水洋子, Pratiwi Sudarmono, Muhammad Hanafi, Leonardus Kardono, 堀田博. *Aspergillus terreus* 抽出液及びそれに含まれるロバスタチンは高濃度で C 型肝炎ウイルス感染性粒子産生を促進する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 16) Suratno Lulut Ratnoglik, 青木千恵, 河本真理, Pratiwi Sudarmono, Lin Deng, 勝二郁夫, 淵野裕之, 川原信夫, 堀田博. Chlorophyll 分解産物 Pheophorbide a、Chlorin e6 及び半合成誘導體 Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) は C 型肝炎ウイルス増殖を阻害する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.
- 17) 松井千絵子, 勝二郁夫, 南奈苗, Sianipar Imelda Rosalyn, DENG Lin, 堀田博. HCV NS5A と Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α の相互作用と病態生理. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 18) 松岡陽子, 朝日朱美, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Smad1/Smad5 経路の脱制御とその分子機序について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 19) 森順子, 姜大鵬, 定岡知彦, 山西弘一, 堀田博, 森康子. HCV非構造タンパク質 NS3 遺伝子を発現する組換え水痘ワクチンウイルスの作製. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 20) 竹内健司, 孫 雪東, 千原一泰, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博, 定清直. C型肝炎ウイルス非構造蛋白質 NS5A における Fyn-SH2 ドメインとの結合に重要なチロシン残基同定の試み. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 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（平成 25 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：大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 宮城琢也
研究協力者：大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 中堀 輔
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 田中聡司
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 疋田隼人
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 竹原徹郎

分担研究課題：B型肝炎ウイルスの増殖機構におけるオートファジーの影響

研究要旨：オートファジーとは、細胞質内を二重膜で隔離し、ライソゾームと融合することで隔離された内容物をバルク的に分解処理するシステムであり、細胞内の飢餓応答及び恒常性の維持機構として重要である。一方で、B型肝炎ウイルス（HBV）がオートファジーに与える影響及びその意義は不明である。そこで、はじめにHBVがオートファジーを変化させるかを検討した。肝細胞株にHBV発現プラスミドを用いてHBVを強制発現させたところ、オートファジー依存的に分解されるP62蛋白は著明に減少し、オートファジーの促進が示唆された。そこで次にオートファジーがHBV増殖に与える影響を明らかにするため、HBVベクターを組み込んだHB611細胞とHepG2. 2. 15細胞を用いて、これら細胞のオートファジーを促進または抑制し、ウイルス増殖に与える影響を検討した。オートファジーを亢進させる方法として、ソラフェニブの投与及びRubiconのノックダウンを、抑制させる方法としてクロロキンの投与を行った。これらの細胞にソラフェニブを投与するとオートファジーは促進し、上清中のHBV-DNA量は有意に増加した。またRubiconを欠損させることでもオートファジーは促進し、細胞内のPre-genome RNAも有意に増加した。一方、クロロキンを投与したHB611細胞はオートファジーが減弱し、細胞内のPre-genome RNAは有意に減少した。以上より、HBV発現は肝細胞のオートファジーを促進させるが、このオートファジーの促進はHBVの増殖を亢進させることが示唆された。今後、オートファジーの抑制によるHBV増殖抑制治療の可能性が示唆された。

A. 研究目的

蛋白質のバルク的な分解機構の1つとして知られているオートファジーは、隔離膜で分解物を囲い込み、オートファゴゾームが形成された後に、ライソソームと融合しオートライソソームとなって内容物が分解される経路である。オートファジーはオルガネラの分解によりアミノ酸を産生するため、飢餓に陥った時のエネルギー源として働くことが知られている。また一度に大量の蛋白質やオルガネラを分解できるため、不良蛋白質や劣化したオルガネラの処理機構としても重要で、細胞の恒常性維持に役

立っていることも知られている。しかしこのオートファジーとHBVとの関係については不明な点が多い。そこで今回HBVがオートファジーに与える影響、またオートファジーがHBV増殖に与える影響を検討し、オートファジーが新規治療標的となるか検討した。

B. 研究方法

ゲノタイプAのHBV遺伝子を1.5-mer タンデムに繋いだ発現プラスミドをHuh7細胞にトランスフェクションさせ、HBVを強制発現させた。

また 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。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換えを用いた実験は、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. 研究結果

はじめに、HBV がオートファジーに与える影響を検討するために、肝癌細胞株である Huh7 細胞に HBV 発現プラスミドをトランスフェクションした。細胞内で HBV の発現が認められると同時に、オートファジー依存的に分解される P62 蛋白質の発現は抑制され、オートファジーの促進が示唆された。

次に、オートファジーが HBV 増殖に与える影響を検討するために、HBV 感染細胞系である HB611 細胞株及び HepG2. 2. 15 細胞株にソラフェニブを投与した。以前我々は、ソラフェニブは mTORC1 の抑制を介して肝細胞のオートファジーを促進させることを報告している。実際、ソラフェニブ投与により HB611 細胞でも P62 蛋白質の発現は減少し、オートファジーの促進を認めた。ソラフェニブの投与により HB611 細胞及び HepG2. 2. 15 細胞の培養上清中の HBV-DNA 量はいずれも増加し、オートファジーの亢進によりウイルス増殖が増加していることが示唆された。

しかしソラフェニブには Multi-kinase 阻害剤でありオートファジー促進効果以外にも様々な作用がある。そこで次にオートファジーを特異的に亢進させるために、オートファゴゾームとライソソームの融合を負に制御する蛋白質である Rubicon に着目した。この蛋白質を HepG2 細胞などの肝細胞で siRNA を用いてノックダウンさせると、LC3-II 蛋白質及び P62 蛋白質が減少し、オートファジーが促進することを確認した。B611 細胞や HepG2. 2. 15 細胞で Rubicon を

ノックダウンさせると、同様に LC3-II 蛋白質及び P62 蛋白質が減少し、オートファジーが促進した。この時細胞内の Pre-genome RNA はいずれの細胞株でも有意に上昇し、HBV 増殖は促進した。

最後に、オートファゴゾームとライソソームの融合を阻害するクロロキンをを用いて実験を行った。HB611 細胞にクロロキンを投与すると、LC3-II 蛋白質及び P62 蛋白質は発現増強し、オートファジーの後期課程が抑制された。一方、細胞内の Pre-genome RNA は有意に低下し、HBV 増殖は抑制された。

D. 考察

HBV が発現した細胞ではオートファジーが亢進するが、このオートファジーの亢進は HBV の増殖を促進することに寄与すると考えられた。一方、オートファジーの抑制は HBV 増殖を抑制することから、オートファジー阻害剤などによる HBV 増殖抑制治療の可能性が示唆された。現在オートファジーを調節する化合物スクリーニング及び開発は急速に進歩しており、臨床応用できる化合物の登場も大いに期待されている。本研究をもとに、今後さらにオートファジー特異的な阻害剤を用いて、HBV 増殖抑制効果及びそのメカニズムを明らかにすることで、オートファジーの調節による HBV 感染症の制御が可能となると期待される。

E. 結論

HBV 感染は感染細胞のオートファジーを促進させ、オートファジーの促進は HBV 増殖を亢進させた。オートファジー調節機構を標的とした HBV 新規治療の可能性が期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

[1] 田中聡司、疋田隼人、齋藤義修、中堀輔、清水聡、阪森亮太郎、宮城琢也、巽智

秀、竹原徹郎. 非アルコール性脂肪性肝障害の病態形成における、飽和・不飽和脂肪酸負荷による肝細胞オートファジーの抑制とアポトーシスの誘導. 第49回肝臓学会総会. 東京 2013年6月6日-7日.

[2] Satoshi Tanaka, Hayato Hikita, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2013) The crosstalk between apoptosis and autophagy in the pathogenesis of

non-alcoholic fatty liver disease. The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Washington, USA, November 1-5.

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（平成25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：加藤直也 東京大学医科学研究所先端ゲノム医学分野 准教授

分担研究課題：HBxの組み込み様式とその機能解析

研究要旨：1) B型肝炎ウイルス (HBV) のX蛋白 (HBx) は肝発癌と深い関連がある。公開されているデータベースを用いてHBxの肝癌関連変異を検討した。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5アミノ酸変異を見出した。これらのアミノ酸変異を病期別に検討してみると、5アミノ酸変異すべて、既に慢性肝炎や肝硬変の段階で変異が起こっており、肝癌関連変異であるが、肝癌特異的変異とは言えないことが明らかになった。2) 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HBVの増殖促進作用に重要であり、cccDNAの維持にも関わっている可能性がある。HBxの転写活性化能を阻害する薬剤は、HBVの複製を阻害する薬剤、延いてはcccDNAを駆除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。

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10~20%にHBVが関与している。HBV遺伝子には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HBV X遺伝子変異に関しては今までに多くの報告があるが、その結果は必ずしも同じ傾向にあるとは言えず、ばらばらである。そこで、われわれは①公開されているデータベースを用い、②発癌と最も関連していると言われ、日本に多いジェノタイプCに限定し、③病期が明らかなサンプルを選び、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) HBV X遺伝子はHBVの感染成立、維持に重要であることがわかっている。X遺伝

子にストップコドンを導入し、HBxを作ることの出来ないHBVは極めて感染効率が悪く、増殖能も著しく劣っている。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HBV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、HBV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の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、HBVの持続感染を阻止し得る可能性がある。

B. 研究方法

1) HBVのシーケンスデータベースとしてGenbankとJapan HBV Database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。得られた肝癌関連変異につき、病期別の変異頻度を検討し、肝癌特異的変異であるかどうかの検討を行った。

2) まず、CAG プロモーター下に HBx (ジェノタイプ D) を発現するプラスミドを肝癌細胞である Huh7 細胞内に導入、HBx を発現させ、SRE、SRF、CRE、NF- κ B、NF-AT、AP-1、Wnt/ β -catenin 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。Stable transformant は TNF- α に対する反応性を指標として選択した。次に、複製可能なジェノタイプ C の HBV の 1.4 倍長ゲノムを含むプラスミドから 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。HBx の良い抗体がないため、FLAG タグを付与した。

(倫理面への配慮)

本研究では、B型肝炎患者より得られた HBV 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、Genbank から 1,369 の HBV シークエンス、Japan HBV database から 4,011 の HBV シークエンスを収集した。そこから、ジェノタイプ C で全長の X 遺伝子領域を含む 495 シークエンスを抽出した。肝癌のシークエンスは日本を中心として、韓国、中国を含む 6 か国から集められたものであり、非肝癌のシークエンスは中国と日本を中心とした 15 か国から集められたものである。肝癌グループの 153 シークエンス、非肝癌グループの 342 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 20 塩基を見出した。これら 20 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 5 塩基 (nt1383、nt1479、nt1485、nt1652、nt1762) を抽出し得た。うち nt1653 と nt1762 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 5 塩基 7 変異のうち、5 変異はアミノ酸置換を伴うものであった (aa36 Thr \rightarrow Pro、aa36 Thr \rightarrow Ala、aa38 Pro \rightarrow Ser、aa94 His \rightarrow Tyr)。それぞれの変異につき、病期別の頻度を検討した。すべての変異は、慢性肝炎や肝硬変の段階で生じており、肝癌特異的な変異ではなかった。変異が肝癌に本当に寄与しているのかどうかは、更なる検討が必要である。

2) Huh7 細胞にジェノタイプ D の 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、Wnt/ β -catenin 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の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。HBx は NF- κ B を約 3.2 倍と最も活性化した。そこで NF- κ B レポーターベクターを恒常的に保持する Huh7 細胞を樹立した。バックグラウンドノイズが少なく、TNF- α による誘導が良好なクローンを選択し、Huh7#2NF κ B luc と名付けた。また、FLAG タグを持つジェノタイプ C の HBx を CMV プロモーターの下流にクローニングし、作成したベクターを Huh7#2NF κ B luc にトランスフェクションし、NF- κ B を約 3.9 倍まで活性化することを確認した。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、Huh7#2NF κ B luc にトランスフェクションし、double stable transfectant 細胞を得ている。

D. 考察

1) B型肝炎における肝発癌と関連する HBx のアミノ酸変異を 5 か所同定した。これら 5 アミノ酸置換は、肝癌に関連しているが、慢性肝炎、肝硬変の状態から存在しており、

肝癌に特異的な変異ではないことから、この変異と HBx の肝発癌における機能との関連については更なる検討が必要である。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 変異を同定したが、肝癌特異的な変異ではないことが明らかになった。
- 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 25 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：飯島沙幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 助教
研究協力者：田中靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授
村上周子 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任助教

分担研究課題：創薬を目指した HBV 感染による肝線維化メカニズムの解明

研究要旨：我々はこれまでにヒト肝キメラマウスを用いたHBV感染実験系で、HBV接種による線維化と強い肝傷害を認めている。この肝線維化は抗マウスTLR4抗体を投与した場合にのみ抑制されることが確認された。今回肝線維化抑制とTLR4パスウェイの関連性を検証するため感染サンプルを用いてマイクロアレイ解析を試みた。

A. 研究目的

核酸アナログ製剤の使用により 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。近年、NASH(non-alcoholic steatohepatitis：非アルコール性脂肪性肝炎)に関連した肝硬変や肝がんが増加しているものの、依然として肝癌死亡の14%がHBVに起因する。今後HBV慢性感染患者の高齢化が進むためHBV感染による肝癌発症の抑止は重要度が高い。本研究では創薬につながる肝線維化メカニズムの解明を目指す。

我々は既に、キメラマウスにHBVを接種後6ヶ月で肝線維化が進行し、強い肝傷害が見られることを確認している。また同時にTLR4、炎症性サイトカインであるIL-6の発現増加を検出している。さらにHBV感染キメラマウスにおいて抗マウスTLR4抗体を投与した場合にのみ線維化進行が抑制された。この感染実験サンプルを用いて

TLR4 pathway の詳細な解析を試みた。

B. 研究方法

抗 TLR4 抗体による感染実験に用いたキメラマウス肝臓組織から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った(図 1)。

図 1

解析対象

個体番号	HBV	被験物質
PXB56	非感染	
PXB63	非感染	
PXB91	非感染	
H11 103	感染	生理食塩水
H11 104	感染	生理食塩水
H11 301	感染	mIgG2a
H11 203	感染	mouse 抗TLR4抗体
H11 204	感染	mouse 抗TLR4抗体
H11 205	感染	mouse 抗TLR4抗体

(倫理面への配慮)

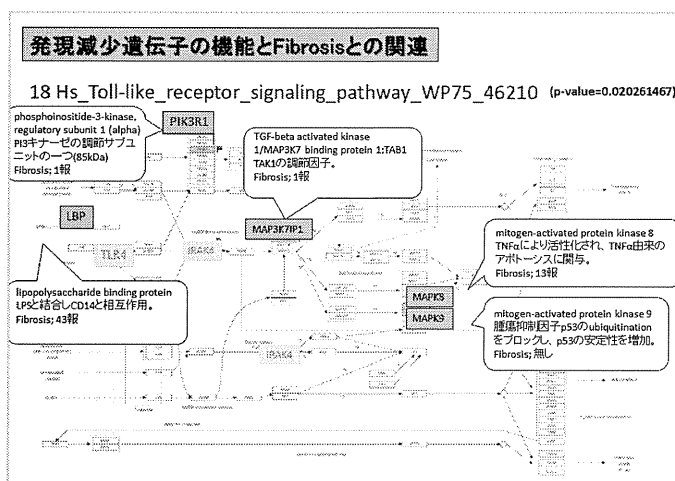
患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫

理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

マイクロアレイ解析のデータを元にパスウェイ解析を行ったところ、発現上昇遺伝子群から MAPK signaling pathway, など既に報告のあるシグナル経路の活性化が確認された。一方で TLR4 pathway 関連因子は一部が発現減少遺伝子群からの解析で抽出された(図 2)。

図 2



D. 考察

ヒト肝キメラマウス感染実験サンプルを用いて行ったパスウェイ解析で、有意な発現変動が確認されたパスウェイの上位に TLR4 pathway が認められた (HBV 感染によって活性化される MAPK パスウェイ等も同時に抽出されたので信頼性は高いと思われる)。各々の分子は線維化・HBV 感染との関連知見も存在するため現在検索中である。

E. 結論

抗 TLR4 抗体による線維化の阻害効果と肝組織内の TLR4 pathway 関連因子の発現変

動が関連している可能性が示された。今後は TLR4 pathway 関連因子を中心に遺伝子ノックダウン等の方法も含めて宿主側因子の解析を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Elkady A, Aboufotuh S, Ali EM, Sayed D, Abdel-Aziz NM, Ali AM, Murakami S, Iijima S, Tanaka Y. Incidence and characteristics of HBV reactivation in hematological malignant patients in south Egypt. World J. Gastroenterol. 2013; 19 (37): 6214-20.

2) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, Watanabe T, Poovorawan Y, Tanaka Y. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in thai population. PLoS One. 2014; 9 (1): e86007.

2. 学会発表

1) 飯島沙幸、渡邊綱正、林佐奈衣、松浦健太郎、田中靖人: C型慢性肝炎に対する3剤併用療法における薬剤投与直後のPBMC内ISG発現動態. 日本ウイルス学会, 2013, 神戸.

2) 林佐奈衣, 村上周子, 飯島沙幸, 渡邊綱正, 田中靖人: HBV genotypeFにおける肝細胞癌特異的ウイルス変異の同定. 日本ウイルス学会, 2013, 神戸.

- 3) Murakami S, Watanabe T, Omagari K, Inoue T, Iijima S, Hamada-Tsutsumi S, Hayashi S, Tajiri K, Kishi H, Tanaka Y. A novel three-dimensional long-term culture system of primary human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized liver for hepatitis B virus infection. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Oct. 20-23, 2013. Shanghai, China.
- 4) Hayashi S, Khan A, Simmons B, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Watanabe T, Tanaka Y. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus genotype F in Alaska: A retrospective case-control study. Asian Pacific Association for The Study of the Liver. Mar. 12-15, 2014. Brisbane, Australia.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

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 25 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：患者血清由来株を用いた HBV 複製系による薬剤感受性の評価

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。そこでこれらHBV株の複製モデルコンストラクトを構築し、HepG2細胞に導入した後にエンテカビルで処理し、サザンブロット法およびRTD-PCR法でエンテカビル感受性の評価を行った。

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。我々はこれらのエンテカビル耐性株の出現が疑われる症例やエンテカビルに対する反応が不良な症例の HBV 株の塩基配列

を決定し、既報のエンテカビル耐性変異と比較した。その結果、既報の変異とは異なる変異が検出され、これらの変異が新規耐性変異である可能性が考えられた。そこで、本研究ではこれらの患者中の HBV 株の複製モデルコンストラクトを作製し、エンテカビルに対する感受性の評価を行った。

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 3 例を検討した。これらの症例の血清中の HBV 株全長を PCR で増幅し、その情報をもとにすべての ORF を含むような HBV ゲノム 1.4 倍長の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

1. エンテカビル耐性が疑われる症例の解析

エンテカビル耐性が疑われる3症例のRT領域のdirect sequenceの結果、既報のエンテカビル薬剤耐性変異以外の部位に変異を認めた。

(症例1)

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しその後も高値が持続し耐性が疑われた症例。この症例では、rtV173L, rtL180M, rtM204Vのラミブジン耐性変異のみ認めた。

(症例2)

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一過性に再上昇しその後自然の経過で陰性化した症例。この症例では、rtV191Iのアミノ酸変異を認めた。

(症例3)

エンテカビル投与開始後1年以上経過後も十分なHBV-DNA量の低下が見られず、HBV-DNA陽性のまま経過した症例。この症例では、rtI122L, rtN123Hの変異を認めた。

2. 複製モデルコンストラクトによる検討

上記症例から得られたHBV株の配列を有するHBVゲノム1.4倍長の複製モデルコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトをHepG2細胞に導入し、エンテカビルで処理した後、HBVの複製をサザ

ンブロット法およびRTD-PCR法で評価した。症例1から得られたHBV株の検討において、同定されたラミブジン耐性変異(rtV173L, rtL180M, rtM204V)導入株は、これらの変異を持たない株に比べエンテカビルに対する反応性が不良であり、これらの変異はエンテカビル耐性にも関わっていると考えられた。症例2で得られたrtV191Iのアミノ酸変異を有するコンストラクトは、その変異を持たないコンストラクトに比べ培養細胞内での強い複製が観察された。明らかなエンテカビルに対する耐性は検出されなかった。症例3から得られたHBV株の検討においては、rtI122L, rtN123Hの変異を持つコンストラクトは症例1から得られたHBV株の変異を持つコンストラクトと同様に培養細胞内での強い複製が観察された。

D. 考察

エンテカビル耐性が疑われる変異を持つ複製モデルコンストラクトを作製し、これをHepG2細胞に導入した後にエンテカビルで処理することにより薬剤感受性の評価が可能であった。今回の検討により、これまでエンテカビルに対する耐性が報告されていなかったラミブジン耐性変異rtV173L, rtL180M, rtM204Vがエンテカビルに対しても耐性を示す事が明らかになった。また他の2症例で認めたrtV191I変異を導入したHBV株、rtI122L, rtN123H変異を導入したHBV株では細胞内でのHBV複製が増強される事でエンテカビル投与中の一過性ウイルス上昇や反応不良の原因となっている可能性が示唆された。

E. 結論

本研究で同定された変異は、エンテカビル投与中の反応不良やHBV-DNA再上昇に関与していると考えられた。これらの新規エンテカビル耐性変異の情報は、今後増加が予想されるエンテカビル治療抵抗性

を示す患者を同定するために重要である。また、患者由来 HBV 株の配列を用いた HBV 複製モデルコンストラクトを用いた検討は、核酸アナログなど薬剤感受性の評価に有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection. World J Gastroenterol, in press.

2. 学会発表

1) 山田典栄, 四柳宏, 池田裕喜, 小林稔, 奥瀬千晃, 森屋恭爾, 安田清美, 鈴木通博, 伊東文生, 加藤孝宣, 脇田隆宇, 小池和彦. 国内感染と考えられる B 型急性肝炎 genotype H の一例. 第 17 回日本肝臓学会大会. 2013 年 10 月 9-10 日、東京.

2) 山田典栄, 加藤孝宣, 四柳宏. B 型急性肝炎症例における HBV S 領域のアミノ酸変異の検討. 第 40 回日本肝臓学会西部会. ワークショップ 4 ; 急性 B 型肝炎. 2013 年 12 月 6-7 日、岐阜.

3) Yamada N, Sugiyama R, Yotsuyanagi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Amino acid polymorphisms of S region of hepatitis B virus in acute hepatitis B patients in Japan. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 1-5, 2013. Washington DC, USA.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

B型肝炎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：岡本 徹 大阪大学微生物病研究所 助教

分担研究課題：HBx タンパク質と相互作用する細胞側因子の同定

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HBxの機能は不明が多い。そこで、HBxの宿主細胞における機能を明らかにすることを目的として、HBxと相互作用する分子を質量分析で網羅的に解析した。同定されたタンパク質の一部をクローニングし、HBxタンパク質との相互作用を検討したところ、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タンパク質と直接結合し、B型肝炎ウイルスの粒子産生に影響することが示唆された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は肝癌を発症するウイルスであり、世界でも2億人もの感染者がいるとされている。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、また一生涯服用せねばならず、有効な治療法とは言い難い。HBVがコードしているHBxタンパク質は、HBVが引き起こす肝細胞癌の原因タンパク質であることがいわれており、さらにはHBVの効率の良い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タンパク質やHBxタンパク質が相互作用している宿主タンパク質を標的とする化合物ができれば、HBVの複製だけでなく、肝癌の抑制にもつながり有用な新規治療薬となると考えられる。本研究では、HBxタンパク質と相互作用する宿主タンパク質を同定し、その相互作用の意義を検討することで、新しいHBV治療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タンパク質を293T細胞に発現させ、ストレプトタグビーズを用いて、HBx結合タンパク質を精製し、質量分析によって、網羅的に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及び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によって検討を行った。また、HBx発現細胞でのJMJD5の細胞内局在を調べた。

(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、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

今回検討したJMJD5は免疫沈降法により、HBxと相互作用する新規のタンパク質として同定された。JMJD5はHBxと酵母内でも相互作用が確認され、HBxタンパク質の75-94アミノ酸で結合していることが明らかとなった。また、HBVの感染性粒子を発現しているHepG2.2.15細胞のJMJD5の発現をshRNAでノックダウンさせると、培養上