

201321004A

厚生労働省科学研究補助金

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25年度 総括・分担研究報告

研究代表者 上田 啓次

平成26 (2014) 年 3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. 感染誘導/非誘導した肝癌細胞を用いた差分解析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樹立と感染初期過程の解析

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複製抑制機構におけるトリプトファン代謝酵素 (IDO) の関与

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： B型肝炎ウイルス（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し、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の詳細を解明することを目指して研究を展開した。感染（分化）誘導したHepaRG細胞からHBV膜蛋白であるPreS1～HBsN末領域と相互作用する因子(HBV-RX1)を分離し、その発現によりHBV感染性が向上することを確認した。昨年HBV受容体として報告されたNTCPに関しては、その発現で単純にHBV感染が許容される訳ではないが、NTCP発現細胞をEDTA・トリプシン処理することで著しい感染性の上昇がみられ、このことは培養細胞におけるNTCP発現局在とHBV感染経路を示唆する重要な知見と考えられた。糖鎖関連では、HBV産生細胞でシアル酸やフコース残基もつ分岐型糖鎖が顕著に増加することが判明し、HBV産生が感染細胞内の糖鎖修飾機能に影響を与えることが示唆された。免疫抑制機構に関しては、B型慢性肝炎患者では抹消血中MDSC数が上昇すること、HBVの増殖増加に伴い逆に減少することから、HBVによるMDSCの誘導や機能に何らかの関連性があることが示唆された。またHBV感染による免疫抑制物質IDOはISGの産生と相関しながら、NK細胞、pDC、BDCA3DCら3者共存下でのみ誘導されること、HBV増殖が上昇する状態では、逆に産生が抑制されることから、NK細胞、DCはISGやIDOを誘導してHBV複製を抑制する方向にはたらくことが示唆された。またHBVpolのRT活性ドメインの発現、部分精製しDNAもしくはRNA依存性DNA合成活性の検出に成功した。

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、多くは抗HIV剤の流用であり、種々の変異体の出現も報告されている

(J. Antimicro. Chemother. 61:766)。HBVを制御するにはHBVの特性に基づいた新規薬

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) や EGFP、YFP などの蛍光蛋白遺伝子やルシフェラーゼ遺伝子を内在したリコンビナント HBV の作製に成功し、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、high-throughput 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 (H25 年度に着手した) 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 (HepaRG) を感染 (分化) 誘導し、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。
- 2) NTCP発現細胞を作製し、HBV感染能やBNC取込み能を検討した。
- 3) またPreS1に結合能によりNTCP発現細胞を分画し、NTCP高発現株を分離し、種々の感染法を検討した。

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HBVコア蛋白、ポリメラーゼ遺伝子を発現するパッケージング細胞を試みた。
- 2) YFPやルシフェラーゼ遺伝子 (GLuc) を内在するリコンビナントHBVゲノムとHBV膜タンパク発現ベクターをパッケージング細胞にトランスフェクションしリコンビナントHBV作製状態を検討した。
- 3) 作製されたリコンビナントHBVを分化誘導HepaRG、iPS細胞DotComから分化させた肝細胞を用いて感染能を検討した。

糖鎖関連研究では、

- 1) HBV 産生細胞 (HB611) における糖鎖修飾状態を検討した。
- 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⁺CD11b⁺CD14⁺HLA-DR⁻ 分画 (骨髄由来抑制性免疫細胞 ; MDSC) 細胞数を評価した。
- 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 法で測定することで免疫抑制物質 indoleamine-2, 3-dioxygenase (IDO) を定量した。
- 3) HBV 産生系 (HBV 発現ベクターのトランスフェクションによる) で、NK 細胞、pDC、BDCA3DC 共存下で、ISG の誘導、IDO 産生量を測定した。

HBV ポリメラーゼの発現・精製とアッセイ系の確立

- 1) HBV ポリメラーゼ逆転写ドメイン (RT) の大腸菌のコドン利用に則した GST 融合発現ベクターを構築し、発現・精製を行った。
- 2) グルタチオンセファロースTM 精製後、陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行い、DNA 或は RNA 依存性 DNA 合成活性を測定した。

(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~HBsN末領域と相互作用する因子、HBV-RX1を分離した (成果概要図上段左)。
- (2) HBV-RX1を肝癌由来培養細胞株で発現させることでHBV(リコンビナントHBV)の感染性が認められた (成果概要図上段右)。
- (3) NTCPのヒト肝癌培養細胞株ではHBVの感染性に著しい変化はなかった。

・研究分担者 (黒田俊一)

- (1) BNCがヘパラン硫酸依存的にHuH7細胞に結合する事を示した。
- (2) BNCのHuH7細胞とHuS-E/2細胞への結合量と侵入量に大差がない事が示された (感染初期観察にはHuH7細胞で充分である)。
- (3) NTCPを強制発現させたヒト肝癌培養細胞株Huh7とヒト胎児由来腎細胞株HEK293では、出芽酵母で作製したHBV表面抗原L粒子 (BNC) の取込みに大きな変動はみられなかった (成果概要図3段目左)
- (4) HBV様粒子であるBNCを用いた免疫沈降物のプロテアソーム解析を行い幾つか候補タンパク質を単離した。

・研究分担者 (森石恆司)

- (1) NTCPを発現させたHepG2細胞からPreS1ペプチドが特異的に結合する細胞集団を分離し、HBV感染性の条件検討を行った結果、EDTA-トリプシン処理が極めて有効に作用することが解った (成果概要図2段目左)。

- (2) 本方法ではHBVのlarge S蛋白の発現を確認できた。

・研究分担者（黒木和之）

- (1) ヒト肝癌由来細胞株HepG2、ヒト胎児由来腎細胞株HEK293でHBVコア蛋白、ポリメラーゼを発現するパッケージング細胞を樹立した。
- (2) 全長3.2kb程度に調整したDR1-ε-YFP或はG1uc)-DR2-DR1といった組換えHBVゲノムをパッケージング細胞で発現させ、培養上清中に組換えHBV粒子の産生を確認できた。

・研究分担者（岡本徹）

- (1) HBx蛋白質はCUL1蛋白質のドミナントネガティブ変異体を発現させる事でその分解が抑制された事から、HBx蛋白質はCUL1/SKP1とF-box蛋白質から成るSCF複合体により分解を受ける事が示唆された。
- (2) ゲノム修復技術を用いてFBXL5欠損細胞株を作製するとHBV複製はFBXL5欠損細胞で減弱した。

・研究分担者（三善英知）

- (1) HBVゲノム遺伝子をHuh6に安定的に組み込んだHB611細胞では、親株に比べ、コアフコースの増加とシアル酸の増加、およびE4-PHAとの結合性の低下を認めた。
- (2) HBVの疑似ウイルスとなるBNC (Bio-nanocapsule, 名古屋大学黒田教授から供与)の取り込みは、HB611ではHuh6に較べてBNCの取り込みが有意に上昇していた。(成果概要図下段左)。

・研究分担者（三崎亮）

- (1) HBVpp発現Huh7由来全糖タンパクからは、非感染Huh7では確認できなかったN-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、マンノース (Man)、フコース (Fuc) からなる分岐型糖鎖 $\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$ (1.3%)、 $\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$ (8.7%)、 $\text{Man}_2\text{FucGlcNAc}_2$ (2.0%) を顕著に認めた。

・研究分担者（竹原徹郎）

- (1) $\text{CD33}^+\text{CD11b}^+\text{HLA-DR}^{\text{low}}$ 分画をヒトMDSCと定義し、健康人ではMDSCの頻度は末梢血単核球の $5.8 \pm 2.5\%$ 、B型慢性肝炎患者では $6.8 \pm 4.9\%$ であったが、各群間に有意差はなかった。
- (2) B型肝炎患者での解析では、核酸アナログ製剤の投与に関わらず、HBV-DNAが $4 \log \text{ copy/ml}$ 以上の患者において有意にMDSCの頻度は低かった ($\text{HBV-DNA} < 4 : 7.9 \pm 5.3\% \text{ vs } \text{HBV-DNA} \geq 4 : 4.2 \pm 2.1\%$, $p < 0.01$) (成果概要図2段目右)。

・研究分担者（考藤達哉）

- (1) HBV感染によりIDOの誘導がかかることが判明した。
- (2) NK細胞はHBV-Huh7との共培養によってIFN- γ を産生し、HBV複製を抑制した。
- (3) NK活性はDCが共存することで、IFN- α 、IFN- λ 依存性に増強した。
- (4) HBV-Huh7におけるISG (IFIT1、Mx1など)はIFN依存性に誘導され、HBV複製と逆相関した。
- (5) NK、DCの共存下においてIDOが誘導された。

・研究分担者（大崎恵理子）

- (1) HBV polのRTドメイン（346-690aa）にGSTタグを付加したコンストラクト（GST-RT）を作製し、グルタチオンセファロースカラムによる精製後、陽イオン交換カラムを用いて精製した。
- (2) 溶出ピークフラクションに一致して、poly(dA)-oligo(dT)もしくはpoly(rA)-oligo(dT)を鋳型としてDNA依存性DNA合成活性、RNA依存性DNA合成活性を検出した。

D. 考察

- 1) HepaRG を分化誘導し、HBV 側リガンド領域（preS1～preS2 若しくは HBsN 端まで）に結合する因子 HBV-RX1 は受容体の一成分として機能していると思われた。
- 2) NTCP の HepG2 等ヒト肝癌由来培養細胞株における強制発現では HBV 感染を単純には許容しないものと思われた。
- 3) HepG2 において NTCP を強制発現し、preS1 ペプチド結合分画を分取、EDTA-トリプシン処理で感染性が著しく向上することから、HBV は NTCP の発現局在に一致した細胞間接着面からの感染が示唆された。
- 4) HBV 産生は宿主感染細胞に糖鎖修飾状態を変化させる（シアル酸、コアフコース）ことが示唆された。
- 4) また HBV 産生は宿主 NTCP の発現を上昇させると考えられた。
- 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- γ 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) 培養細胞における HBV 受容体の発現と HBV の感染様式に関し、細胞接着面を経由するなど興味深い結論が得られた。
- 2) NTCP は単独で HBV 受容体として機能しているのではなく、副因子の存在が示唆された。
- 3) HBV 感染による感染宿主細胞の糖鎖修飾状態が変化することが示され、病態との関連が示唆された。
- 4) HBV 感染による MDSC 機能の変化、IDO の誘導など免疫抑制機構の作動し、個体内における免疫機能が修飾されることが示唆された。特に、HBV 産生が起ると NK 細胞、pDC、BD3ADC の相互作用により IDO や ISG が誘導され、HBV 産生を調節していることが示唆された。
- 5) HBVpol の精製度を高めることが不可欠であるが、high-throughput 活性測定系への基盤が得られた。

II. 分担研究報告

感染誘導/非誘導した肝癌細胞を用いた差分解析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感染免疫医学講座ウイルス学 教授

研究要旨：2012年にNTCPがHBV感染受容体として報告されたが、NTCPのHBV受容体としての活性には様々な報告がみられ、他にも受容体として機能する分子の存在が示唆されている。本年度はヒト肝癌由来培養細胞株、HepaRGをDMSOで感染誘導処理/未処理細胞を用いた蛋白レベルの差分解析によりHBV膜タンパクpreS1からHBs蛋白N末領域(preS1～SSN)と相互作用する因子(HBV-RX1、HBR-RX2)を同定し、その受容体としての活性を検討した。HBV-RX1をヒト肝癌由来培養細胞株(HepG2、Huh6、HepaRG)へ発現導入することで、リコンビナントHBV(分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を内在するrcHBV-NL1.3neo)の感染性を確認した。このことはHBV-RX1がHBV受容体としての機能をもっていることを示唆している。

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HBVの特性に基づいた抗HBV剤の開発はされておらず、HBVの本質を理解した抗HBV剤の開発には、HBV感染受容体を分離・同定し、簡便な*in vitro*或は個体レベル(*in vivo*)での感染系を確立することが不可欠である。そして、感染系によるHBVの詳細な生活環や病態発症機構の解明を含めて、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

- 1) 肝癌培養細胞株(HepaRG)のDMSO未処理/処理細胞から蛋白を抽出した。
- 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) 分離した蛋白をMSで解析し同定した。
- 5) 同定した蛋白のORFをクローニングし、肝癌由来培養細胞株で発現させ、リコンビナントHBV(分泌型ルシフェラーゼ遺伝子を内在する

rcHBV-NL1.3neo) で受容体としての活性を評価した。

- 6) HBV 膜タンパクを被ったレトロウイルス (HBV pseudotype; HBVpp) を用いて感染性を評価した (genome equivalent of infection; GEI=10)。

(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) HBV-RX1 をヒト肝癌由来培養細胞株で発現させることにより、rcHBV-NL1.3neo の感染性を検出できた。
- 2) HBVpp による感染性は検出できなかった。

D. 考察

HBV-RX1 には HBV 感染受容体としての機能の一端を担っていると考えられたが、野生型 HBV や HBVpp による著しい感染性の上昇はなく、受容体としての機能を更に詳細に検討する必要があるものと思われた。またこのことは、HBV 感染受容体が幾つかのコンポーネントから成り立っていることを示唆しているものと思われた。

HBV 感染受容体の探索にあたっては、PreS1~HBs N 端部をプローブにするだけでなく、preS1 合成ペプチドを利用したより厳密な探索も必要と思われた。

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

1. 論文発表

- (1) Ueda, K. “Start or End?; one of the biggest mysteries is finally solved?” *Medical Microbiology and Diagnosis* dx.doi.org/10.4172/2165-7866.1000e101. doi.org/10.4172/2165-7831.1000e101.
- (2) 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)
- (3) 上田啓次. 「ウイルスの感染機構」 医学のための生命科学. 南山堂、2013 (編集中).
- (4) 上田啓次. 「HBV 遺伝子と関連抗原」 *Hepatology Practice*. pp2-9. 文光堂、2013.
- (5) 上田啓次. 「グルココルチコイド感受性領域」 *Hepatology Practice*. pp149-151. 文光堂、2013.

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 受容体発現細胞株の樹立と感染初期過程の解析

研究分担者 森石 恆司

山梨大学大学院医学工学総合研究部医学工学域微生物学 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として Sodium taurocholate cotransporting polypeptide（NTCP）が報告されている。しかし、NTCPを高発現させても原著論文（eLife, 2012, 1:e00049）で感染効率は10%前後と低い。本年度は、培養細胞感染系における感染効率について検討し、ウイルス培養細胞系確立を目指した。NTCPをHepG2に発現させたとき、少なくとも細胞接着面に多く発現していることが分かった。また、ミリストリル化したpreS1ペプチド（FAMラベル）を合成し、細胞表面への接着を解析したところ、NTCP発現に依存して結合した。しかしながら、接着状態の細胞に対する感染はNTCP発現に関係なくほとんど見られなかった。そこで、Trypsin-EDTA処理し、その後にウイルスをチャレンジすると感染が成立することがわかった。そのウイルスDNA、RNA、およびHBc抗原は感染七日から九日で検出され、NTCP発現に依存していた。しかしながら、非感染細胞や感染をチャレンジしたHepG2細胞で感染は成立しなかった。以上の結果から、HBV感染はNTCP発現に依存し、Trypsin-EDTA処理によって感染効率が上がることが分かった。これらの結果は、新規ワクチン開発や抗ウイルス剤開発に繋がると思われる。

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いる。高率のよいウイルス培養法が確立されておらず、新規抗HBV療法の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細胞表面への付着機構の詳細はわかっていない。HBVのエンベロープ蛋白質はS, M, Lの分子種があり、それぞれのC末端領域は共通で、S蛋白質である。L蛋白質のみにPreS1領域があり、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化されており、それが標的細胞へのウイルス粒子の付着に重要であることがわかっている。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。しかし、NTCPを高発現させても原著論文（eLife, 2012, 1:e00049）で感染効率は10%前後と低く、その低感染率である理由がよく分かっていない。

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樹立し、ワクチン開発や抗ウイルス開発につなげることを最終目標にあげている。本年度は、HBV受容体候補として報告されたNTCPをHepG2細胞に遺伝子導入し、感染許容細胞を作製することを目標とした。更に感染手法を改良し、より高率の培養感染細胞系樹立を目指し

た。

B. 研究方法

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。NTCP 発現 HepG2 細胞は、Puromycin で選択し、高発現細胞をクローニングした。ミリストリル化した N 末端 2-48 残基で構成された preS1 ペプチドを合成し、FAM でラベルした。PreS1 ペプチドの発現細胞への付着能を FACS によって評価した。HBc 抗原測定は、市販 ELISA キットを用いた。また、HBV の DNA および RNA は Real time PCR によって定量した。感染時、細胞を Trypsin-EDTA 処理し、遠心洗浄した後、Yan et al. (eLife, 2012, 1:e00049) の方法で HBV を感染させた。

(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した。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山梨大学医学部倫理委員会規程に従って承認を得た。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、個人情報等を厳格に管理、保存した。動物実験は、山梨大学動物実験規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。遺伝子組み換え実験は、山梨大学遺伝子組み換え実験安全管理規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。放射線及び放射性同位元素を扱う実験は、山梨大学総合分析実験センター放射線障害予防規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。

C. 研究結果

NTCP (C 末 FLAG タグ) を HepG2 細胞に発現させたとき、その発現は細胞接着面に高発現していた。NTCP (タグ無し) 遺伝

子を HepG2 細胞に導入し、real-time PCR によって mRNA 量を測定し、その表面への発現を preS1 ペプチドによる FACS で確認した。その細胞表面に発現している細胞株を選択した。細胞接着面に発現していることから、細胞を一度 Trypsin EDTA で剥がし、集塊したあと、HBV (遺伝子型 C) を感染させた。平面培養された HepG2 で 100mg/ml で感染させたとき感染が確認出来なかったが、Trypsin 処理細胞に対する感染方法で、ほぼすべての細胞への感染が免疫染色で認められた。また、細胞を EDTA のみで剥がして感染させたときと比べ、Trypsin-EDTA で剥がしたときのほうが高率に感染していた。

D. 考察

本研究により、HepG2 細胞で NTCP は細胞接着面 (ラテラル面) により強く発現することが分かり、細胞を一度剥がすことにより、感染効率が上がることが分かった。より高率にウイルス粒子が産生させる方法が確立されれば、新規ワクチン開発および抗ウイルス剤スクリーニング方法の確立へつながり、新規 B 型肝炎療法の開発に期待がもてる。

E. 結論

本研究結果から、感染時に感染許容細胞を Trypsin-EDTA 処理することによって NTCP 依存の感染の効率が上昇することがわかり、この手法が高率に感染する培養細胞系の開発に繋が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. Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K: Understanding the

- Biological Context of NS5A-Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach. *J. Proteome Res.*, 12: 2537-2551, 2013
2. Tani J, Shimamoto S, Mori K, Kato N, Moriishi K, Matsuura Y, Tokumitsu H, Tsuchiya M, Fujimoto T, Kato K, Miyoshi H, Masaki T, Kobayashi R: Ca(2+) /S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication. *Liver Int.*, 33: 1008-1018, 2013
 3. Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, Aoki R, Gee P, Yamashita A, Moriishi K, Yamasaki K, Koyanagi Y, Blauvelt A, Shimada S: Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells. *Cell Host Microbe*, 13: 77-86, 2013
 4. Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N: Deep-Sequencing Analysis of the Association between the Quasispecies Nature of the Hepatitis C Virus Core Region and Disease Progression. *J. Virol.*, 87: 12541-12551, 2013
 5. Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Takahashi M, Aoki R, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Blauvelt A, Shimada S: Oral administration of the CCR5 inhibitor, maraviroc, blocks HIV ex vivo infection of Langerhans cells within epithelium. *J. Invest. Dermatol.*, in press: 2013
 6. Hashimoto K, Yamada S, Katano H, Fukuchi S, Sato Y, Kato M, Yamaguchi T, Moriishi K, Inoue N: Effects of immunization of pregnant guinea pigs with guinea pig cytomegalovirus glycoprotein B on viral spread in the placenta. *Vaccine*, 31: 3199-3205, 2013
 7. Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, Moriishi K, Nishiyama Y, Shimada S: Mast Cells Play a Key Role in Host Defense against Herpes Simplex Virus Infection through TNF-alpha and IL-6 Production. *J. Invest. Dermatol.*, 133: 2170-2179, 2013
 8. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K: Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS one*, 8: e82299, 2013
2. 学会発表
1. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K. 20th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, October 6-10., 2013
 2. Moriishi K. Exploitation of host functions by hepatitis C virus. 2013 Italy-Japan Liver Workshop "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links", Trapani, Italy, October 20-21, 2013
 3. 葛西宏威、吉村健太郎、安本順、山下篤哉、

- 田中智久、竹田扇、森石恆司。Probe electrospray Ionization 質量分析法 (PESI-MS) を用いたHCV感染細胞内脂質組成の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日～12日、神戸
4. 山下篤哉、沈暉、田中智久、葛西宏威、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。第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日～12日、神戸
5. 安本順、葛西宏威、吉村健太郎、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司、B型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の超微形態変化の解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日～12日、神戸
6. 田中智久、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本産ウマの血清から分離した non-primate hepacivirus の性状解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日～12日、神戸
7. 森石恆司、教育セミナー：HCVに近縁なヘパシウイルスの構造と日本産ウマからの検出、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日～12日、神戸
8. 天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司、Tyrphostin とその類縁化合物によるC型肝炎ウイルス複製阻害、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸
- H. 知的所有権の出願・登録状況 特になし。

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：昨年度は、出芽酵母由来 HBV 表面抗原 L 粒子（バイオナノカプセル（BNC））が、HBV と同様の経路かつ同等の効率で、ヒト肝臓由来細胞株数種（含 初代培養細胞）において、低親和性（ヘパラン硫酸依存的）受容体と結合し、Pre-S1 特異的な高親和性受容体（実態不明）に移行し、エンドサイトーシスにより細胞内侵入する事を明らかにした（感染初期における BNC と HBV の類似性を証明）。また、BNC と結合する候補タンパク質を見出していた。今年度は、①BNC の HuH7 細胞と HuS-E/2 細胞への結合量と侵入量に大差がない事を示した（感染初期観察には HuH7 細胞で充分）。②BNC がヘパラン硫酸依存的に HuH7 細胞に結合する事を示した（昨年度成果を補強）。次に、③NTCP を過剰発現する非ヒト肝臓由来細胞は BNC と結合できない事、④HuH7 細胞において NTCP を過剰発現しても BNC の結合量と侵入量に無関係な事を示した（一方、HepG2 細胞においては NTCP 発現の効果ありという情報有。NTCP が高親和性受容体である可能性は微妙）。以上から、NTCP が HBV 高親和性受容体の本命でない可能性が高いと判断し、⑤HBV 様粒子である BNC を用いた免疫沈降物のプロテアソーム解析を行い幾つか候補タンパク質を単離し、その 1 つとして ApoB100 を単離した。また、⑥HuH7 細胞由来 cDNA ライブラリを発現する非ヒト肝臓由来細胞をセルアレイ化し、蛍光標識 BNC が結合する細胞を、我々が開発した全自動 1 細胞解析単離装置でスクリーニングしている。

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、ヒト肝細胞上の HBV 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、確定的な報告はなされていない。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同外皮 L タンパク質から構成されるサブウイルス粒子バイオナノカプセル（BNC）を、出芽酵母を用いて大量（mg 単位）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、BNC を HBV のモデルとする事で、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 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するために、昨年度は、BNC が HBV と同様の経路かつ同等の効率で、ヒト肝臓由来細胞株数種(含 初代培養細胞)において、低親和性 HBV 受容体と結合し、Pre-S1 特異的な高親和性 HBV 受容体に移行し(以降、「2段階 HBV 受容体説」と呼称)、エンドサイトーシスにより細胞内侵入する事を明らかにした(感染初期における BNC と HBV の類似性を証明)。そこで今年度は、低親和性 HBV 受容体の解析を生化学的に行い、昨年度登場してきた新規 HBV 受容体 (NTCP; Sodium taurocholate cotransporting polypeptide) の評価も行って、別個に我々が開発した全自動 1 細胞解析単離装置を用いてヒト肝細胞の高親和性 HBV 受容体のハイスループット機能スクリーニングを行ったので報告する。

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、CF633 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 (HuH7, HuS-E/2)、又は非ヒト肝臓由来細胞 (HEK293) への結合と侵入を共焦点顕微鏡により解析した。

(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

①BNC の HuS-E/2 細胞に対する親和性:

最近、HBV が感染してビリオン複製を行うことができるヒト肝臓由来ライン化細胞として HuS-E/2 細胞が使用されてきている。そこで、CF633 蛍光標識 BNC を 37 度で 1 時間コンタクトさせて、BNC が同細胞にどの程度結合して、内部に侵入できるかを共焦点顕微鏡下で評価した(図 1)。

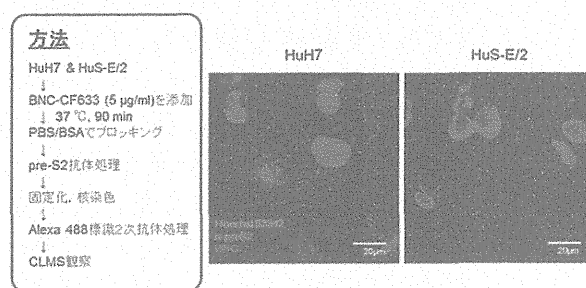


図1) HuH7 と HuS-E/2 の BNC 結合能の比較(方法)

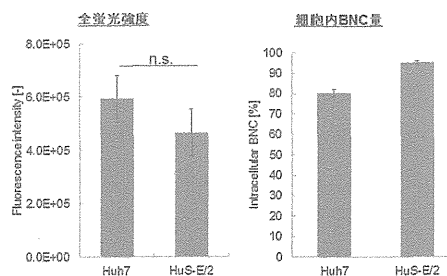


図2) HuH7 と HuS-E/2 は同等の BNC 結合能を有する

以前、我々(山田ら, J. Control. Release, 2012)は、一般的なヒト肝臓由来ライン化細胞が「2段階 HBV 受容体説」において、①低親和性 HBV 受容体の発現が多い細胞(例、HuH7 細胞)、②低親和性 HBV 受容体の発現が低く、相対的に高親和性 HBV 受容体の発現が多い細胞(例、HepG2 細胞)に大別されることを示した。そこで、細胞外周および細胞内の BNC 由来蛍光量を解析したところ、HuS-E/2 細胞は前者に属し、HuH7 細胞に酷似しており(図 2)、今後の BNC のヒト肝細胞感染機構の研究には HuH7 で

充分と考えられた。

②HuH7 細胞への低親和性HBV 受容体に関して：

今まで調べたヒト肝臓由来ライン化細胞の中でHuH7細胞の低親和性HBV受容体の発現量は極めて高かった。その発現レベルはヒト初代培養肝細胞と同等であった(山田ら, J. Control. Release, 2012)。「2段階HBV受容体説」を提唱するStephan Urbanらの研究によれば、同受容体は細胞表層のヘパラン硫酸量に依存するので、ヘパラン硫酸の生合成を抑制するNaClO₄でHuH7細胞を24時間処理した(細胞毒性を示さない50 mMまで)。そして、図1と同様にCF633蛍光標識BNCを37度で1時間コンタクトさせた(図3)。

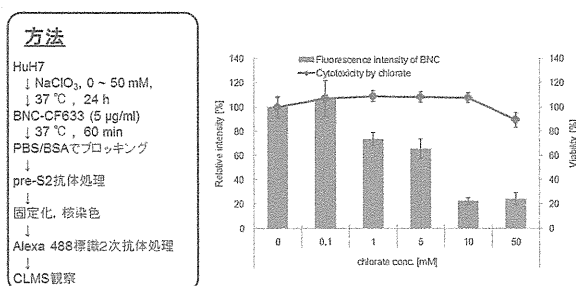


図3) ヘパラン硫酸発現を抑制したHuH7のBNC結合能

その結果、BNCのHuH7細胞への結合が著しく減少した。また、このBNC結合は低親和性HBV受容体の性質でもある酸処理感受性を示した。以上から、HuH7細胞を含む数多くのヒト肝臓由来ライン化細胞に観察される酸処理感受性の低親和性HBV受容体によるBNC結合は、ヘパラン硫酸依存的事実であることが判明した。つまり、BNCは「2段階HBV受容体説」の初期段階(ヘパラン硫酸依存性の低親和性HBV受容体への結合)を経ることが明らかになった。また、酸処理を経ても残存するBNC結合は、HBV感染機構における高親和性HBV受容体によるものである可能性が高くなった。

③NTCP 受容体に関して：

NTCP (Sodium taurocholate cotransporting polypeptide) は、ヒト肝

臓細胞に発現するHBV受容体であるとする研究成果が2012年の発見以降蓄積され始めている。そこで、ヒト肝臓由来cDNAライブラリよりNTCP遺伝子をPCRにより単離し、蛍光タンパク質mKateの遺伝子の5'末端側に融合して発現するベクターを構築した。そして、非ヒト肝臓由来細胞である293細胞に導入して、CF633蛍光標識BNCを37度で1時間コンタクトさせた。しかし、同細胞はBNC結合能を示さなかった(図4)。次に、mKateタンパク質をC末端に融合することがBNC結合に悪影響を与えている可能性を想定して、IRES(リボソームがmRNAの途中から結合

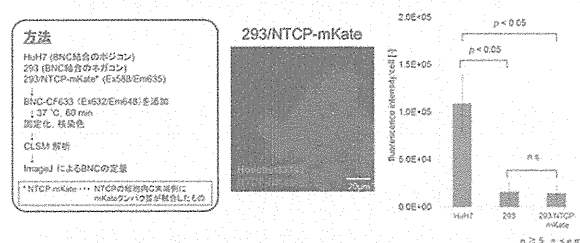


図4) NTCP-mKate融合タンパク質安定発現293細胞はBNCと結合しない

できる配列、複数の遺伝子を一本のmRNAでシストロニックに発現するために使用)を介してNTCPとEGFP(緑色蛍光タンパク質)を同時に発現するベクターを構築した(図5)。

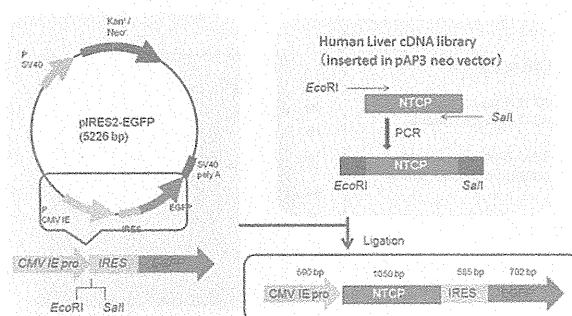


図5) NTCPとEGFPをIRESを介して発現するベクターの構築

本ベクターを293細胞およびHuH7細胞に導入し、2日後に、CF633蛍光標識BNCを37度で1時間コンタクトさせた。その結果、本来HBVもBNCも結合や感染することができない293細胞にNTCPを導入しても何ら変化が生じないことが判明した。また、

HBV や BNC が少なくとも結合できる HuH7 細胞に NTCP を導入しても、BNC の結合量や細胞内侵入量に大きな変化はなかった(図 6)。

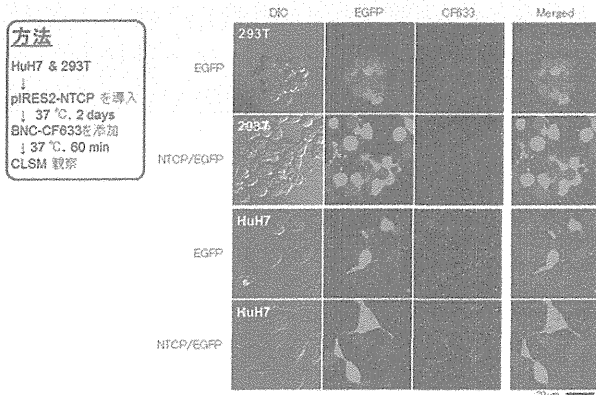


図6) NTCP発現293細胞はBNCと結合せず、NTCP発現はHuH7細胞のBNC結合能に影響を与えない

④BNC 固定化ビーズによるプルダウンアッセイ:

一部の研究者では NTCP が本命視されているが、今なお新規 HBV 受容体の探索することは重要である。今年度は、昨年度に引き続き、BNC 固定化ビーズを用いて HuH7 細胞抽出液に対してプルダウンアッセイを行い、1次元電気泳動を行い、CBB 染色を行った(図7)。特に、従来の研究者は pre-S1 ペプチドのみをプローブにしていたが、HBV に近い形状の BNC をプローブにする点は従来法とは一線を画している。

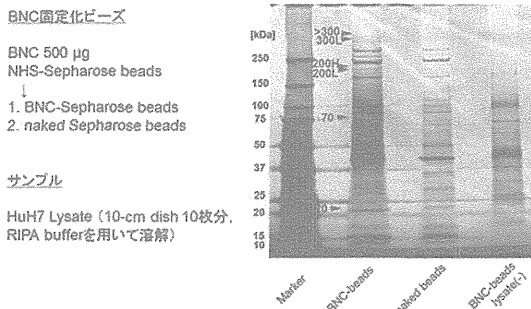


図7) BNC固定化ビーズによるプルダウン産物のプロテオミクス解析

その結果、最低5種類のBNC特異的なバンドが見出されたので、いずれもゲルの切り出しを行い、in gel 消化により内部ペプチドを遊離させ、ESI 法によりイオン化する TOF-MS 解析を行った。その結果、

>300-kDa バンドから ApoB100 タンパク質 (500 kDa) が検出された。同タンパク質は、様々なタンパク質と結合して血液中の脂質運搬を担う LDL を構成し、肝細胞等の LDLR (スカベンジャー受容体) により細胞内に取り込まえるのを助ける働きを有する。現在、他のバンドからのタンパク質抽出を行っており、幾つか揃えば異所的な発現により非ヒト肝臓細胞でも HBV や BNC が感染できるかどうか検討し、絞り込みを行う予定である。

⑤全自動1細胞解析単離装置による HBV 受容体のクローニング:

我々が開発して、昨年度市販化に成功した全自動1細胞解析単離装置 (良元ら、Scientific Reports

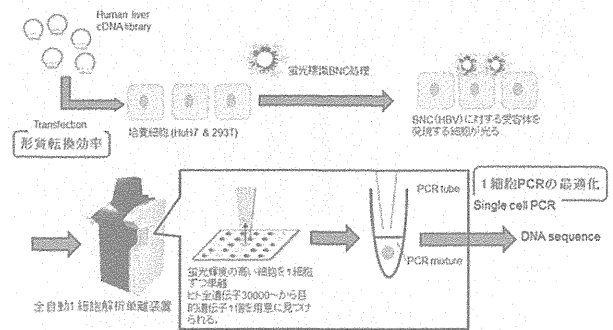


図8) 全自動1細胞解析単離装置によるHBV受容体スクリーニングの概要

2013) を用いて、HBV 受容体の単離を行っている。本機は、ヒト肝臓由来 cDNA を発現する 293T 細胞等をセルアレイ化して、蛍光標識 BNC とコンタクトさせ、蛍光ラベルされた細胞を自動的に回収するものである。FACS などとは異なり、陽性細胞含有率が 0.01%以下 (数万細胞中数個) でも確実に単離できるのが特長である (図 8)。

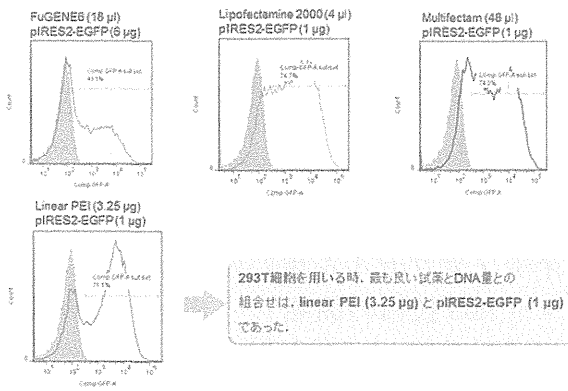


図9) 293T細胞の形質転換の検討

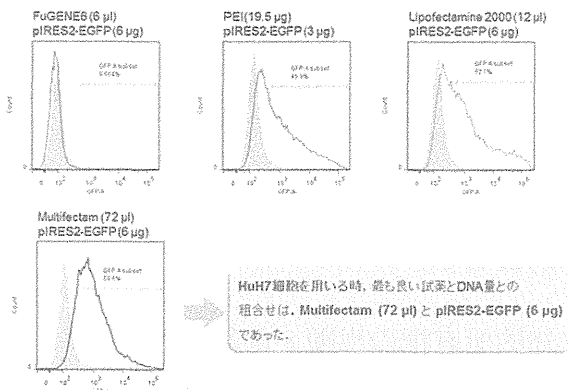


図10) HuH7細胞の形質転換の検討

今年度は、確実にスクリーニングを行うために条件の最適化を行った。まず、293T細胞およびHuH7細胞に対し、ヒト肝臓由来cDNAライブラリ(pAP3-neoベクター型)を効率よく遺伝子導入する方法を検討した(図9、10)。

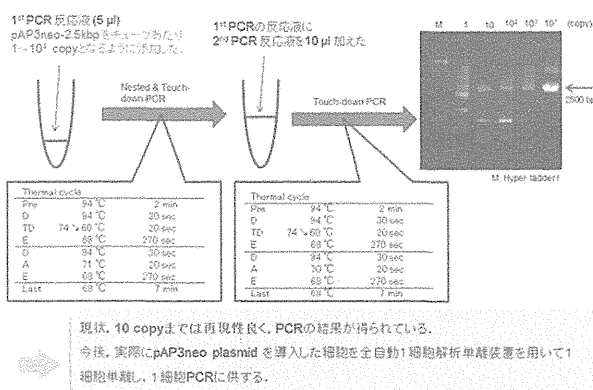


図11) 1細胞PCRの最適化

次に、1細胞単離したサンプルから、cDNAライブラリ部分を増幅するために1細胞PCRの条件検討も行い、最低10コピーの発現プラスミドを有する細胞が1個でも存在すれば、2.5-kbpのcDNA断片を確実に増幅

できるようになった。

D. 考察

我々は、酸処理耐性な高親和性HBV受容体(実態不明)によるBNC結合がpre-S1領域を介している事を確認しているので、pre-S1領域と高い親和性を示すことで単離されてきたNTCPは高親和性HBV受容体(少なくとも一部)であると考えている。しかし、現在までに多くの研究者が、本来HBVが感染できない細胞にNTCPを異所的に発現しても、HBVの感染効率は変化しないと報告しており、我々も前項③において同様な結果を得ている。これは、「2段階HBV受容体説」において、HBV(BNCも含む)が高親和性HBV受容体に結合するためには、一度低親和性HBV受容体に結合することが必要なのかもしれない。

一方で、HepG2細胞にNTCPを過剰発現させると、その発現量に応じてHBVの感染効率が上昇するという報告があり、我々の前項③の結果と一致しない。これは、①NTCPはHBV受容体として機能するには、HepG2には存在し、HuH7には存在しない細胞因子(共受容体)が必要であることを示しているか、②HBVとBNCの差をNTCPが見分けている可能性を示している。現在、NTCPを強制発現したHepG2細胞を複数用意してBNCとの結合を確認しているが、NTCP発現によりBNC結合が上昇する場合が散発的であり、まだ確定的な結論には至っていない。ただし、この結果は上記可能性の①が有力であり、②ではないことを示唆している。

E. 結論

「2段階HBV受容体説」に関しては、現在までのところ矛盾は生じておらず、今後も検討すべき課題と考えている。今回の結果から、感染初期段階の低親和性HBV受容体は、酸処理に対して感受性で、細胞側から供給されたヘパラン硫酸を介して結合していることが明らかとなった。次に、高親和性HBV受容体の最有力候補はNTCPである