

を GP64 との融合タンパク質として宿主細胞表面に提示させる実験も計画している。当該細胞にバキュロウイルスを感染することで、HBsAg-GP64 タンパク質を効率よく纏ったバキュロウイルスの生産が期待できる。

HB611 細胞の糖鎖プロファイル解析から、肝細胞が HBV ゲノム遺伝子を保持することで、フコースの付加した糖鎖構造の割合が顕著に増加することが分かった。この結果は、24 年度の研究結果から得られた「HBVpp を発現する細胞ではフコース結合型糖鎖が顕著に増加する」というデータを強く指示するものである。一方、今回は、細胞の全糖タンパク質糖鎖の構造を解析した。HBV は実際には感染に際して宿主細胞表面に結合する。このため、HBV が標的とする細胞膜表面の糖タンパク質を調製し、その糖鎖構造を解析する必要があると考える。

24 年度の解析結果から、HBVpp 発現細胞では α 1,6-フコース転移酵素をはじめとする分岐型糖鎖を合成する糖鎖修飾酵素の遺伝子発現量が増加していることが示唆されたため、HBVpp 発現細胞を調製し糖鎖修飾酵素遺伝子の発現量を定量的に分析した。しかしながら、qRT-PCR の結果からは野生型と比較して各糖転移酵素発現量に大きな違いは認められなかった。この結果を受けて、糖転移酵素の発現量ではなく基質供給に関わる糖ヌクレオチド合成酵素や糖ヌクレオチドトランスポーター合成酵素遺伝子の発現量が増加している可能性も考えられる。次段階として、糖転移酵素以外の糖鎖修飾関連酵素遺伝子の発現量についても調

査を行いたい。

E. 結論

24 年度のデータに加え HB611 細胞の糖鎖構造解析の結果から、HBV 感染下にある細胞では対照となる非感染細胞と比較して、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分かった。遺伝子レベルでの糖鎖修飾関連酵素発現レベルの解析を進める必要があるが、病態発症細胞の糖鎖構造の変化が見えてきた。一方で、ウイルス側の糖鎖構造が感染に及ぼす影響はまだ不明のままであるため、疑似ウイルスを利用した糖鎖構造改変は急務である。次年度以降で上記未解明の事象を明らかにし、治療薬開発を見据えた病態発症と糖鎖構造変動の関係を突き止める。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

HBV 感染による病態発症機構の解析

研究分担者 竹原 徹郎

大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 教授

研究要旨：B 型肝炎の病態の形成における骨髄由来抑制性免疫細胞 (Myeloid derived suppressor cell, MDSC) の意義を明らかにする目的で、健康成人 21 例、B 型慢性肝炎患者 54 例、B 型肝硬変患者 5 例、B 型肝炎患者 8 例より末梢血単核球を採取し、CD33⁺CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{-/low} 分画を MDSC と定義しフローサイトメトリーにて MDSC の頻度解析を行った。MDSC 頻度は健康成人で $5.8 \pm 2.5\%$ 、B 型慢性肝炎患者で $6.8 \pm 4.9\%$ 、B 型肝硬変患者で $5.7 \pm 3.1\%$ 、B 型肝炎患者で $8.8 \pm 5.4\%$ であり、各群間で有意差はなかった。ALT や HBs 抗原量との相関は認めなかったが、核酸アナログ製剤の投与に関わらず、HBV DNA $4 \log \text{ copy/ml}$ 以上の患者の方が、 $4 \log \text{ copy/ml}$ 未満の患者に比して MDSC 頻度が有意に低かった ($4.2 \pm 2.1\% \text{ vs } 7.9 \pm 5.3\%$, $p < 0.01$)。B 型肝炎患者は MDSC の頻度を増減させることで HBV に対する免疫反応の調整を行っている可能性が示唆された。

共同研究者

巽 智秀 大阪大学消化器内科学、助教
大西良輝 大阪大学消化器内科学 大学院生

A. 研究目的

我国の B 型肝炎ウイルス (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。B 型肝炎に対しては、エンテカビルなどの核酸アナログ製剤による HBV DNA の複製を阻害する治療が出現し、B 型肝炎の制御が可能となってきたが、肝内における cccDNA の残存があり、根治は難しい。また IFN により治療成績はセロコンバージョンが 30% 程度にとどまっている。HBV による

慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの病態の形成には宿主免疫応答が重要である。これまで、HBV に対する CTL や抗体産生等の獲得免疫や NK 細胞などの自然免疫については数多くの研究がなされてきており、B 型肝炎の病態への関与が明らかになりつつある。これら免疫応答の活性化は HBV の排除や、病態進展の制御、発癌コントロールに重要である。一方で宿主免疫の抑制により、B 型肝炎の病態が進展することが考えられる。近年、制御性 T 細胞や骨髄由来抑制性免疫細胞 (Myeloid derived suppressor cell, MDSC) が、免疫システムを抑制する免疫細胞として注目されている。制御性 T 細胞についてはすでに B 型肝炎において報告

が散見されるが、MDSCについては、未だ不明なままである。MDSCは、myeloid 前駆細胞および未熟 myeloid 細胞 (immature myeloid cells ; iMCs) から構成されるヘテロな細胞集団である。通常、造血幹細胞から分化した myeloid 前駆細胞は iMC を経て、成熟好中球、マクロファージまたは樹状細胞に分化する。MDSC は癌における増加で見出された細胞であるが、現在では細菌感染、寄生虫感染、急性および慢性炎症、外傷ストレス、敗血症、移植など様々な局面で自然免疫系および獲得免疫系を抑制し、免疫応答を制御することが明らかにされている。MDSC は Arginase-1 や NO、ROS を介して T 細胞の増殖抑制・機能抑制をしたり、NK 細胞機能抑制、樹状細胞の分化の阻害や機能抑制をおこすことが報告されている。また最近 B 細胞機能も抑制することがマウスの系で示されており、各種免疫応答を統合的に阻害することが示されている。また制御性 T 細胞の誘導も促進する。肝 MDSC については、肝細胞癌マウスモデルで NK 細胞機能の抑制がしめされ、ヒト肝細胞癌患者でも MDSC による制御性 T 細胞の誘導や NK 細胞機能の抑制が示されている。MDSC の B 型肝炎における意義についての報告は現在までないが、B 型肝炎の病態を形成する一因となっている可能性がある。本研究では、B 型肝炎の病態における MDSC の意義を明らかにすることで、新たな治療戦略の構築を目指すことを目的としている。

B. 研究方法

MDSC はフローサイトメトリーを用いて

細胞表面マーカーで同定される。マウスでは CD11b⁺Gr-1⁺細胞を MDSC としているが、ヒト MDSC では定まったマーカーは確立していない。ヒト MDSC では、CD33、HLA-DR、CD11b、CD14 を組み合わせて同定した報告が多く、本研究では、CD33⁺CD11b⁺CD14⁺HLA-DR^{-/low} 分画を MDSC と定義した(図1)。同分画は共培養にて T 細胞の IFN- γ の産生を抑制した。

大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会承認のプロトコルを用いて B 型肝炎患者末梢血単核球を採取し、フローサイトメトリーにて頻度解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究遂行にあたっては、事前に施設倫理委員会にて実験内容が承認され、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、採血し解析を行った。

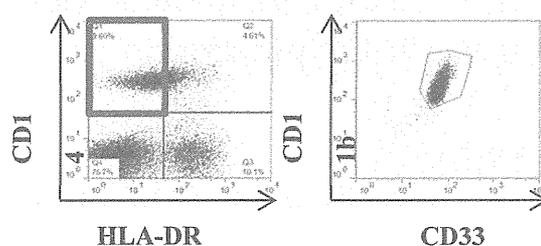


図1 B型肝炎患者における MDSC 同定

C. 研究結果

対象は健康成人 21 例、B 型慢性肝炎患者 54 例、B 型肝硬変患者 5 例、B 型肝癌患者 8 例である。各群年齢はそれぞれ平均 46 \pm 14 歳、52 \pm 15 歳、62 \pm 7 歳、63 \pm 7 歳であった。全対象者の年齢と MDSC の頻度の間には

弱い相関があり、加齢により MDSC 頻度が増加傾向にあった ($r=0.34$, $p<0.01$)。性別では差はなかった。MDSC 頻度は健常人で $5.8 \pm 2.5\%$ 、B 型慢性肝炎患者で $6.8 \pm 4.9\%$ 、B 型肝硬変患者で $5.7 \pm 3.1\%$ 、B 型肝炎患者で $8.8 \pm 5.4\%$ であり、B 型肝炎患者で多い傾向があったが、有意差はなかった (図 2)。B 型肝炎患者では様々な病態が含まれているためか、MDSC 頻度のばらつきが大きかった。

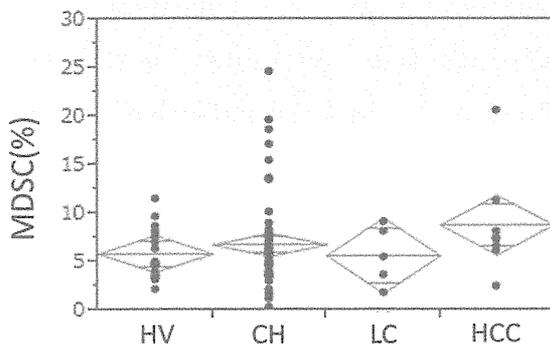


図 2 B 型肝炎疾患の各群での MDSC 頻度

B 型肝炎患者内での検討では、HBs 抗原や HBe 抗原の有無では両群間に有意差はなかった。HBV DNA $4 \log \text{ copy/ml}$ 以上の患者において、 $4 \log \text{ copy/ml}$ 未満の患者に比して MDSC 頻度が有意に低かった ($4.2 \pm 2.1\%$ vs $7.9 \pm 5.3\%$, $p<0.01$) (図 2)。核酸アナログを使用していない患者のみで同様の解析を行っても、HBV DNA $4 \log \text{ copy/ml}$ 以上の患者において、 $4 \log \text{ copy/ml}$ 未満の患者に比して MDSC 頻度が有意に低かった。HBV DNA $4 \log \text{ copy/ml}$ 未満の例では核酸アナログ使用例が多かったが、核酸アナログ製剤の有無による MDSC の頻度には有意差を認めなかった。以上より MDSC は、

核酸アナログ使用に関わらず、HBV DNA の増加により MDSC 頻度が低下することがあきらかとなった。

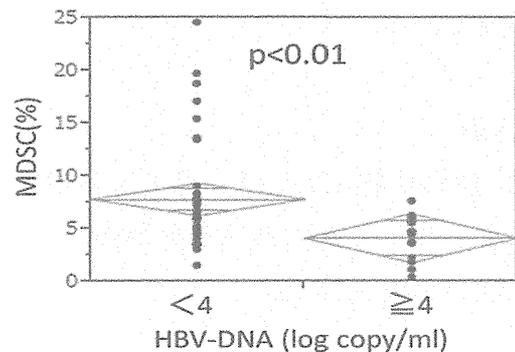


図 3 B 型肝炎患者における HBV-DNA $4 \log \text{ copy/ml}$ 未満と $4 \log \text{ copy/ml}$ 以上の患者での MDSC の頻度の比較

D. 考察

フローサイトメトリーにて $\text{CD}33^+\text{CD}11b^+\text{CD}14^+\text{HLA-DR}^{-/\text{low}}$ 分画の MDSC を同定することが可能であった。健康成人と B 型肝炎疾患患者において MDSC の頻度の差は認めなかったが、B 型肝炎疾患患者において MDSC の頻度のばらつきが大きかった。B 型肝炎の様々な病態を反映しているものと推察された。

HBV DNA 量が増加により MDSC の頻度は有意に低下した。HBV DNA 量が増えることで、宿主はウイルス排除を促進するために MDSC を低下させ、免疫を賦活化し HBV 排除を促進し、逆に HBV DNA 量が低下すれば、過度な炎症を抑制するために MDSC を増加させ免疫を抑制している可能性が示唆された。C 型肝炎では、MDSC の増加がウイルス量の増加と相関していることが報告されているが、B 型肝炎での MDSC の動態は C 型肝炎と大きく異なり、B 型肝炎

ウイルスによる MDSC の制御が、病態形成に関与していることが示唆された。MDSC 頻度を調節している因子については今後の検討が必要である。

E. 結論

HBV 感染状態において、宿主は MDSC を調節により HBV に対する免疫を調節している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nishida T, Hiramatsu N, Mizuki M, Nagatomo I, Kida H, Tazumi K, Shinzaki S, Miyazaki M, Yakushijin T, Tatsumi T, Iijima H, Kiso S, Kanto T, Tsujii M, Takehara T. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. *Hepatol Res* 43: 339-346, 2013
- 2) Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice. *J Hepatol* 59: 1239-1245, 2013
- 3) Aketa H, Tatsumi T, Kohga K, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Nawa T, Shigekawa M, Hikita H, Sakamori R, Hosui A, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. The combination therapy of α -galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect

synergistically against liver tumor in mice. *Int J Cancer* 133: 1126-1135, 2013.

- 4) Harada, N., Hiramatsu, N. Oze, T., Yamada, R., Kurokawa, M., Miyazaki, M., Yakushijin, T., Miyagi, T., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Oshita, M., Mita, E., Hagiwara, H, Inui, Y., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Imai, Y., Inoued, A., Hayashi, N., Takehara, T. Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels categorized by Japanese treatment guidelines. *J. Gastroenterol.* 48:535-543, 2013.

2. 学会発表

本年は本研究に基づく学会発表はなし

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

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

研究分担者 考藤 達哉

国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター 肝疾患先進医療研究室長

研究要旨：Indoleamine-2,3-dioxygenase（IDO）はトリプトファンをキヌレニンに代謝し、免疫抑制作用を発揮する。HBV複製肝癌細胞において、IDOはISGとして機能し、HBV複製を抑制することが報告されている。昨年度の検討により、B型慢性肝炎患者ではIDO活性が亢進していること、肝細胞におけるIDO活性の誘導には、HBV感染に加えて炎症の関与が必要であることが示された。

今年度は、HBV複製肝細胞におけるISG誘導の機序と、HBV複製への関与を明らかにすることを目標とした。1.4倍長HBVゲノムをHuh7に遺伝子導入した細胞（HBV-Huh7）を、非感染者より分離した樹状細胞（DC）、NK細胞と共培養し、I型、III型IFNの産生量、HBV複製能、HBV-Huh7でのISG、IDO誘導を評価した。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。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。HBV-Huh7におけるISG（IFIT1、PKRなど）はIFN依存性に誘導され、HBV複製と逆相関した。またNK、DCの共存下においてIDOが誘導された。以上の結果より、NK細胞、DCはHBV感染細胞を認識し、ISG、IDOなどの誘導を介してHBV複製を抑制することが示唆された。

A. 研究目的

樹状細胞（DC）はHBVのゲノム、蛋白などを感知し、I型、III型IFNを産生し、免疫系の活性化に関与する。またNK細胞はIFN- γ 産生を介してHBV感染細胞の障害やHBV複製抑制に関与する。肝臓における効率のよいISG誘導がHBV複製の抑制に重要であると考えられるが、その詳細は明らかでない。Indoleamine-2,3-dioxygenase（IDO）はト

リプトファンをキヌレニンに代謝し、免疫抑制作用を発揮する。IDOはIFN- γ で誘導される肝ISGの側面も持っており、HBV複製を抑制することが報告されている。本年度は、HBV発現肝細胞におけるIDO活性と、その誘導機序を検討し、抗HBV作用を介した治療標的としての可能性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

今年度は1.4倍長のHBVゲノムをHuh7

に遺伝子導入する系 (HBV-Huh7) を用いた。HBV に感染していない健康成人の PBMC からソーティングによって DC サブセット (PDC、MDC、BDCA3DC) と NK 細胞を採取した。HBV-Huh7 を、ヒト末梢血から分離した DC サブセットと NK 細胞と共培養し、I 型、II 型、III 型 IFN の産生と肝細胞 ISG の誘導と IDO の発現、及び HBV 複製抑制効果との関連性を検討した。
(倫理面への配慮)

本研究は国立国際医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える

C. 研究結果

NK 細胞は HBV-Huh7 との共培養で IFN- γ を産生し、HBV 複製を抑制した。PDC は HBV-Huh7 との共培養で IFN- α 、IFN- λ を産生し、NK の CD69 発現を亢進させ、HBV 複製抑制効果を増強した。この系に BDCA3DC を加えると、NK の活性化は更に増強した。IFN- α の産生量に依存して、HBV-Huh7 細胞内に ISG15、IFIT1、PKR などの抗ウイルス ISG が誘導された。また IFN- γ 産生量依存的に IDO が誘導され、ISG、IDO の誘導と HBV 複製抑制効果は正相関した。

D. 考察

NK 細胞、PDC は HBV を異なる機序で認識することで活性化し、IFN を産生する。NK 細胞と PDC の共存では IFN- α 、 γ 、 λ 産生量が増加したこと、NK、PDC、

BDCA3DC の共存により NK 活性化が更に増強したことより、NK-PDC-BDCA3DC 間には密接な相互作用が存在している。HBV の認識機構や NK-DC 相互作用の機序の解明は、治療標的の同定に繋がる可能性がある。

E. 結論

HBV の複製抑制に PDC、BDCA3DC と NK の相互活性化作用が関与しており、IFN の産生を介する肝細胞 ISG、IDO の誘導が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higashitani, K., Kanto, T., Kuroda, S., Yoshio, S., Matsubara, T., Kakita, N., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Mita, E., Imai, Y., Kasahara, A., Okuno, A., Takikawa, O., Hayashi, N. and Takehara, T., Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. *J Gastroenterol.* 2013. 48: 660-670.
- 2) Aketa, H., Tatsumi, T., Kohga, K., Tsunematsu, H., Aono, S., Shimizu, S., Kodama, T., Nawa, T., Shigekawa, M., Hikita, H., Sakamori, R., Hosui, A., Miyagi, T., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N. and Takehara, T., The combination therapy of alpha-galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically

against liver tumor in mice. *Int J Cancer* 2013.
133: 1126-1134.

2. 学会発表

1) Morishita N, Hiramatsu N, Oze T, Harada N, Yamada R, Miyazaki M, Yakushijin T, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kanto T, Takehara T. Efficacy of acoustic radiation force impulse in predicting the presence and assessing the risk of esophageal varices in patients with HCV-related cirrhosis.

The Liver Meeting AASLD 64th Annual Meeting and Postgraduate Course, Washington, DC, USA, 2013.

2) Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Mizokami M, Hayashi N, Takehara T. Human BDCA3+ DCs contribute to the induction of intrahepatic ISGs as a potent interferon- λ producer in HCV infection.

The Liver Meeting AASLD 64th Annual Meeting and Postgraduate Course, Washington, DC, USA, 2013

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

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 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

研究分担者 大崎恵理子

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 助教

研究要旨：本年度は HBV ポリメラーゼの *in vitro* 活性測定系を確立することを目的として，ポリメラーゼの効率的な発現・精製法の確立を試みた。ポリメラーゼの RT ドメインに GST タグを付加（GST-RT），あるいは可溶性を高めることを目的に SUMO タグを付加（SUMO-GST-RT）したコンストラクトを作製し，大腸菌発現システムを用いて発現・精製条件を検討した結果，部分精製に成功した。また，レトロウイルスベクターを用いて全長ポリメラーゼを 293 細胞で発現する系を構築し，発現・精製を試みたところ，発現量は少ないものの部分精製に成功した。大腸菌の発現システムにより精製したポリメラーゼ（GST-RT）を用いて今回構築した活性測定系により，ポリメラーゼ活性を検定した。その結果，タンパクの純度は不十分であるものの，精製分画の GST-RT タンパク量と相関した活性の検出に成功した。

A. 研究目的

HBV の持続感染者は，世界人口の約 5 % の 3 億 5 千万人存在すると考えられており，ワクチンが開発された現在もなお，抗ウイルス薬の新規開発は非常に重要な課題であると考えられる。新規抗ウイルス剤のスクリーニングにおいて，HBV ポリメラーゼを用いて *in vitro* 活性測定系を確立することが第一歩となるが，ポリメラーゼの大量精製が困難であることが一因となり，この系は未だに確立されていない。そこで，本研究課題では HBV ポリメラーゼの発現・精製法を確立し，*in vitro* 活性測定系を構築することを目指す。これによりポリメラーゼをターゲットにした薬剤候補のスクリーニン

グが可能となる。また，ポリメラーゼの結晶構造解析を行なうことにより，機能予測や相互作用因子の同定，薬剤耐性変異メカニズムの解明および *in silico* 創薬による新規抗ウイルス候補薬剤のスクリーニングを行なう。

B. 研究方法

ポリメラーゼの発現系として，大腸菌と哺乳類細胞の系を用いた。大腸菌の系では全長，TP ドメイン（RNA 結合に重要），RT ドメイン（ポリメラーゼ活性に重要）等の各コンストラクトについて発現・精製を試みた。大腸菌に適したコドンに置換した RT 遺伝子を GST 発現ベクターにクローニングし，最適な発現誘導条件を検討し

た。発現させた GST-RT をグルタチオンセファロースカラムにより精製後、陽イオン交換カラムで精製し、各溶出分画を用いて活性測定を試みた。今回構築した活性測定系において、ビオチンで標識した poly(dA)-oligo(dT) もしくは poly(rA)-oligo(dT) を使用することで DNA 依存性、RNA 依存性の活性を区別した。アニーリングした後、ビオチン標識テンプレートにストレプトアビジンでコートした 96 穴プレートに固定し、精製した GST-RT および DIG 標識 dUTP を加えて 37°C、80 分反応させ、抗 DIG ペルオキシダーゼにより新規合成 DNA/RNA を検出する方法を試みた。ポジティブコントロールとして T4 DNA ポリメラーゼ、あるいは AMV(トリ骨髄芽球症ウイルス)-RT、Superscript-RT などを用いた。

GST-RT とは別に、SUMO タグを付加した GST-RT 発現ベクターを新たに作製し、発現誘導条件を検討した。さらにレトロウイルスベクターによりスペーサードメインを GST に置換した全長ポリメラーゼ (Full-Pol-GST; N 末に Strep-tag, C 末に His-tag 付加) を 293 細胞に導入し、安定発現株を樹立し、Ni-NTA ビーズによる Full-Pol-GST の精製条件の検討を行なった。

(倫理面への配慮)

当研究機関の遺伝子組換え実験の倫理規定に従い、また「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号) を遵守して行なう。

C. 研究結果

GST-RT 発現ベクターを Rosetta gami 2 DE3 株に導入し、OD₆₀₀=0.6 まで前培養後、0.5 mM IPTG を加えて 18°C、8 時間処理する条件が最も発現効率が高かった。GST-RT を 2 段階精製する過程において、精製分画を用いて今回構築したアッセイ法によりポリメラーゼの活性測定を行なったところ、グルタチオンセファロースカラムによる部分精製 RT のタンパク量と、活性の増加に相関関係がみられた。DNA 依存性ポリメラーゼ活性において部分精製タンパク 10 μ g の活性はポジティブコントロールである T4 ポリメラーゼ 10 ユニットの 60% の活性を示した。RNA 依存性活性はポジティブコントロールである superscript-RT の 1.7 倍の活性を示した。次にグルタチオンセファロースカラム (1 段階精製)、および陽イオン交換クロマトグラフィー (2 段階精製) による精製分画の溶出ピークと、ポリメラーゼの活性ピークを比較したところ、1 段階精製、2 段階精製ともに溶出ピークと活性ピークが一致した。最も溶出ピークの高い精製分画において、RNA 依存性活性は AMV-RT の 4.7 倍の活性を示したことから、2 段階精製により純度が高くなったことによる活性の上昇が示唆された。しかし、目的タンパクの収量が低い点と、精製過程において標的タンパク質以外の低分子混在タンパクの除去が困難であった。これらは分解産物あるいはシャペロン等の可能性が考えられた。そこで、可溶性や発現量の増加、混在タンパクの除去、より純度の高い精製を期待して SUMO タグ発現システムを新たに構築し、

発現誘導条件を検討した。その結果、BL21 派生株である Shuffle T7 express lysY competent cell (NEB)を用いて 30°C, 4 時間の誘導条件で良好な発現結果を得た。現在精製条件を検討中である。

また、293 細胞に全長ポリメラーゼを安定発現させた細胞株を樹立し、Ni-NTA によりミニスケールで精製条件を検討した。その結果、不溶性分画にはほとんど検出されず、ほぼ可溶性分画に抽出されることが確認された。精製後、ウェスタンブロットにより、約 100kDa の目的タンパクが溶出分画において検出された。

D. 考察

大腸菌発現システムにおいて全長ポリメラーゼの発現は非常に困難であり、現時点で成功していない。TP, RT については発現、精製が可能な条件を見出したものの、さらに純度の高い精製が必要である。しかしながら今回、部分精製 RT を用いたにもかかわらず、精製タンパクの溶出パターン、およびタンパク量と活性の間に相関関係が見られたことから、構築したポリメラーゼ活性測定系は、迅速・簡便なアッセイ系として有効であることが期待される。今後は RT 活性に重要な活性中心 YMDD に変異を加えた変異型ポリメラーゼをコントロールに加え、より感度が高く再現性の高い活性測定条件を検討する必要がある。SUMO や GST タグは特異的なプロテアーゼにより切断可能であり、最終的にはタグを切断し、結晶構造解析に使用可能なレベルの純度をを目指す。ポリメラーゼの立体構造は HIV の RT の構造をもとにしたコンピュータ予測

によるのが現状であるが、コンピュータ予測ではなく実際の RT ドメインの立体構造が明らかになれば、既存の逆転写酵素阻害剤の薬剤耐性メカニズムや、新規薬剤開発に有効な基礎的知見が得られるものと期待される。

また、293 細胞での全長ポリメラーゼの可溶性分画での発現が確認されたが、その発現レベルは低いため、更なる検討が必要とされるものの、精製した全長ポリメラーゼが活性を持つかどうかを今回確立したアッセイ法により確認する予定である。

E. 結論

大腸菌発現システムにより GST-RT の発現・精製を行なったが、さらなる純度の向上が必要である。同じく大腸菌での SUMO-GST-RT の発現誘導が可能となったため、精製方法の条件ならびに活性の有無を検討し、GST-RT よりも良好な結果が得られれば今後大量精製、結晶構造解析を行なう。今回 96 穴プレートを用いたポリメラーゼアッセイシステムを構築し、検出感度や再現性を高めるための条件検討がさらに必要ではあるものの、部分精製した RT を用いて活性の検定に成功した。

F. 研究発表

- 1.論文発表
- 3) 該当なし
- 2.学会発表
- 3) 該当なし

G.知的所有権の出願・取得状況

- 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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
上田啓次	HBV遺伝子と関連抗原	田中栄司 竹原徹郎 持田 智	Hepatology Practice	文光堂	東京	2013	pp2-9
上田啓次	グルココルチコイド感受性領域	田中栄司 竹原徹郎 持田 智	Hepatology Practice	文光堂	東京	2013	pp149-151
良元伸男、 黒田俊一	バイオナノカプセル	中川晋作	DDSの人体・環境・ものづくりへの適用技術	NTS	東京	2013	118-126
良元伸男、 黒田俊一	バイオナノカプセルによる生体内ピンポイント薬物・遺伝子送達技術	名古屋大学最先端モデルエンジニアリング編集委員会	最先端メディカルエンジニアリング	一粒書房	東京	2014	不明

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ueda, K. (上田)	Start or End? ; one of the biggest mysteries is finally solved?	<i>Medical Microbiology and Diagnosis</i>	1	1000e101	2013
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, <u>Moriishi K.</u> (森石)	Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus	<i>PLoS on</i>	8	e82299	2013

Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, <u>Moriishi K</u> , Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K. (森石)	Understanding the Biological Context of NS5A-Host Interactions in HCV Infection: A Network-Based Approach	<i>J. Proteome Res.</i>	12	2537-2551	2013
Tani J, Shimamoto S, Mori K, Kato N, <u>Moriishi K</u> , Matsuura Y, Tokumitsu H, Tsuchiya M, Fujimoto T, Kato K, Miyoshi H, Masaki T, Kobayashi R. (森石)	Ca(2+) /S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication., 33: 1008-1018, 2013	<i>Liver Int.</i>	33	1008-1018	2013
Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, Aoki R, Gee P, Yamashita A, <u>Moriishi K</u> , Yamasaki K, Koyanagi Y, Blauvelt A, Shimada S. (森石)	Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells	<i>Cell Host Microbe</i>	13	77-86	2013
Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, <u>Moriishi K</u> , Enomoto N. (森石)	Deep-Sequencing Analysis of the Association between the Quasispecies Nature of the Hepatitis C Virus Core Region and Disease Progression	<i>J. Virol</i>	87	12541-12551	2013
Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Takahashi M, Aoki R, <u>Moriishi K</u> , Koyanagi Y, Gatanaga H, Blauvelt A, Shimada S. (森石)	Oral administration of the CCR5 inhibitor, maraviroc, blocks HIV ex vivo infection of Langerhans cells within epithelium.	<i>J. Invest. Dermatol.</i>	133	2803-2805	2013
Hashimoto K, Yamada S, Katano H, Fukuchi S, Sato Y, Kato M, Yamaguchi T, <u>Moriishi K</u> , Inoue N. (森石)	Effects of immunization of pregnant guinea pigs with guinea pig cytomegalovirus glycoprotein B on viral spread in the placenta	<i>Vaccine</i>	31	3199-3205	2013
Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, <u>Moriishi K</u> , Nishiyama Y, Shimada S. (森石)	Mast Cells Play a Key Role in Host Defense against Herpes Simplex Virus Infection through TNF-alpha and IL-6 Production	<i>J. Invest. Dermatol</i>	133	2170-2179	2013
Yoshimoto N., <u>Kuroda, S.</u> (黒田)	Single-cell-based breeding: Rational strategy for the establishment of cell lines from a single cell with the most favorable properties (REVIEW)	<i>J. Biosci. Bioeng.</i>	未定	http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.016	2014

Iijima, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and <u>Kuroda, S.</u> (黒田)	Nanocapsule-based probe for evaluating the orientation of antibodies immobilized on a solid phase	<i>Analyst</i>	138	3470-3477	2013
Iijima, M., Yamamoto, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and <u>Kuroda, S.</u> (黒田)	Bio-nanocapsules for signal enhancement of alkaline phosphatase-linked immunosorbent assays	<i>Biosci. Biotech. Biochem.</i>	77	843-846	2013
Yoshimoto, N., Kida, a., Jie, X., Kurokawa, K., Iijima, M., Niimi, T., Maturana, A.D., Nikaido, I., Ueda, H. R., Tatematsu, K., Tanizawa, K., Kondo, A., Fujii, I. and <u>Kuroda, S.</u> (黒田)	An automated system for high-throughput single cell-based breeding	<i>Scientific Reports</i>	3	1191; DOI:10.1038/srep01191	2013
Kida, A., Iijima, M., Niimi, T., Maturana, A.D., Yoshimoto, N., and <u>Kuroda, K.</u> (黒田)	Cell Surface-Fluorescence Immunosorbent Assay for Real-Time Detection of Hybridomas with Efficient Antibody Secretion at the Single-Cell Level	<i>Analytical Chemistry</i>	85	1753-1759	2013
曾宮正晴、良元伸男、 <u>黒田俊一.</u> (黒田)	バイオナノカプセル-リポソーム複合体の生体内ピンポイント薬剤送達への応用	ファイナケミカル	42	44-49	2013
松尾英典、良元伸男、 <u>黒田俊一</u> (黒田)	バイオナノカプセルを用いた生体内ピンポイント DDS 技術の開発	表面	50	207-218	2013
飯嶋益巳、 <u>黒田俊一.</u> (黒田)	バイオナノカプセルを用いるイムノセンシング分子の整列化技術	バイオサイエンスとバイオインダストリー	71	314-317	2013
Kelly GL, Grabow S, Glaser SP, Fitzsimmons L, Aubrey BJ, <u>Okamoto T</u> , Valente LJ, Robati M, Tai L, Fairlie WD, Lee EF, Lindstrom MS, Wiman KG, Huang DCS, Bouillet P, Rowe M, Rickinson AB, Herold MJ and Strasser A. (岡本)	Targetting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53	<i>Genes Dev</i>	28	58-70	2014
<u>Okamoto T</u> , Coultas L, Metcalf D, van Delft M, Glasser SP, Takiguchi M, Strasser A, Bouillet P, Adams JM, Hunag DCS. (岡本)	Enhanced Mcl1 stability can blunt stress-induced apoptosis, cause male sterility and promote tumorigenesis	<i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>	111	58-70	2014

Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, Lewis R, Lalaoui N, Metcalf D, Webb AI, Young SN, Varghese LN, Tannahill GM, Hatchell EC, Majewski IJ, <u>Okamoto T</u> , Dobson RC, Hilton DJ, Babon JJ, Nicola NA, Strasser A, Silke J, Alexander WS. (岡本)	The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism	<i>Immunity</i>	39	443-453	2013
Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, <u>Okamoto T</u> , Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, Takeda K. (岡本)	Ifit1 inhibits JEV replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA	<i>J. Virol.</i>	87	9997-10003	2013
Moujalled DM, Cook WD, <u>Okamoto T</u> , Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, Vaux DL. (岡本)	TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1.	<i>Cell Death Dis.</i>	17	e465	2013
<u>Okamoto T</u> , Zobel K, Fedorova A, Quan C, Yang H, Fairbrother WJ, Huang DC, Smith BJ, Deshayes K, Czabotar PE. (岡本)	Stabilizing the Pro-Apoptotic BimBH3 Helix (BimSAHB) Does Not Necessarily Enhance Affinity or Biological Activity.	<i>ACS Chem Biol.</i>	8	297-302	2013
Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kamada Y, Kobayashi T, Shibukawa N, Inoue T, Tsujii M, Takeishi S, Mizushima T, Ogata A, Naka T, Plevy SE, Takehara T, <u>Miyoshi E.</u> (三善)	Lectin-based immuno-assay for aberrant IgG glycosylation as the biomarker for Crohn's disease.	<i>Inflamm. Bowel Dis.</i>	19 (2)	321~331	2013
Kamada Y, Kinoshita N, Tsuchiya Y, Kobayashi K, Fujii H, Terao N, Kamihagi K, Koyama N, Yamada S, Daigo Y, Nakamura Y, Taniguchi N, <u>Miyoshi E.</u> (三善)	Reevaluation of a lectin antibody ELISA kit for measuring fucosylated haptoglobin in various conditions.	<i>Clin. Chim. Acta</i>	417	48~53	2013
Tanaka K, Moriwaki K, Yokoi S, Koyama K, <u>Miyoshi E</u> , Fukase K. (三善)	Whole-body imaging of tumor cells by aza-electrocyclization: Visualization of metastasis dependent on glycan structure.	<i>Bioorg. Med. Chem.</i>	21 (5)	1074~1077	2013

Kimura M, Masui Y, Shirai Y, Honda C, Moriwaki K, Imai T, Takagi U, Kiryu T, Kiso T, Murakami H, Nakano H, Kitahata S, <u>Miyoshi E</u> , Tanimoto T. (三善)	Preparation of branched cyclomaltoheptaose with 3-O-a-L-fucopyranosyl-a-D-mannopyranose and changes in fucosylation of HCT116 cells treated with the fucose-modified cyclomaltoheptaose.	<i>Carbohydrate Res.</i>	374	49~58	2013
Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, <u>Miyoshi E</u> , Shoda J. (三善)	Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder.	<i>J. Gastroenterol.</i>		In press	2013
Kamada Y, Fujii H, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Uozumi N, Mizutani K, Akita M, Sato M, Kida S, Kinoshita N, Maruyama N, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, <u>Miyoshi E</u> . (三善)	Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis.	<i>Proteomics Clin. Appl.</i>		In press	2013
Kamada Y, Akita M, Takeda Y, Yamada S, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Asazawa H, Nakayama K, Mizutani K, Fujii H, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, <u>Miyoshi E</u> . (三善)	Serum fucosylated haptoglobin as a novel diagnostic biomarker for predicting hepatocyte ballooning and nonalcoholic steatohepatitis.	<i>PLOS One</i>	8 (6)	e66328	2013
Nakayama K, Moriwaki K, Imai T, Shinzaki S, Kamada Y, Murata K, <u>Miyoshi E</u> . (三善)	Mutation of GDP-mannose-4,6-dehydratase in colorectal cancer metastasis.	<i>PLOS One</i>	8 (7)	e70298	2013
Azuma K, Shinzaki S, Asazawa H, Kuroki E, Kawamoto S, Kamada Y, Hayakawa K, <u>Miyoshi E</u> . (三善)	Twin studies on the effect of genetic factors on serum agalactosyl immunoglobulin G levels.	<i>Biomedical Reports</i>		In press	2013
Seto K, Uchida F, Baba O, Yamatoji M, Karube R, Warabi E, Sakai S, Hasegawa S, Yamagata K, Yanagawa T, Onizawa K, <u>Miyoshi E</u> , Shoda J, Bukawa H. (三善)	Negative expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis.	<i>Springerplus</i>	2	657	2013

Tanemura M, <u>Miyoshi E</u> , Nagano H, Eguchi H, Taniyama K, Kamiike W, Mori M, Doki Y. (三善)	Role of α -gal epitope/anti-Gal antibody reaction in immunotherapy and its clinical application in pancreatic cancer.	<i>Cnacer Sci.</i>	104 (3)	282~290	2013
寺尾尚子、奥戸久美子、森脇健太、 <u>三善英知</u> 。 (三善)	糖鎖を用いた肝癌幹細胞の単離とその生物学的特性	消化器内科	56 (3)	292~300	2013
<u>三善英知</u> 、鎌田佳宏、魚住尚史。 (三善)	糖鎖がんマーカー	実験医学	31 (10)	58~64	2013
Nishida T, Hiramatsu N, Mizuki M, Nagatomo I, Kida H, Tazumi K, Shinzaki S, Miyazaki M, Yakushijin T, Tatsumi T, Iijima H, Kiso S, Kanto T, Tsujii M, <u>Takehara T.</u> (竹原)	Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic.	<i>Hepatol Res</i>	43	339-346	2013
Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T, <u>Takehara T.</u> (竹原)	Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice.	<i>J Hepatol</i>	59	1239-1245	2013
Aketa H, Tatsumi T, Kohga K, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Nawa T, Shigekawa M, Hikita H, Sakamori R, Hosui A, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, <u>Takehara T.</u> (竹原)	The combination therapy of α -galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice.	<i>Int J Cancer</i>	133	1126-1135	2013
Harada, N., Hiramatsu, N. Oze, T., Yamada, R., Kurokawa, M., Miyazaki, M., Yakushijin, T., Miyagi, T., Tatsumi, T., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Oshita, M., Mita, E., Hagiwara, H, Inui, Y., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Imai, Y., Inoued, A., Hayashi, N., <u>Takehara, T.</u> (竹原)	Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels categorized by Japanese treatment guidelines.	<i>J. Gastroenterol.</i>	48	535-543	2013

Higashitani, K., Kanto, T., Kuroda, S., Yoshio, S., Matsubara, T., Kakita, N., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Mita, E., Imai, Y., Kasahara, A., Okuno, A., Takikawa, O., Hayashi, N. and Takehara, T. (考藤)	Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection.	<i>J Gastroente rol.</i>	48	660-670	2013
Aketa, H., Tatsumi, T., Kohga, K., Tsunematsu, H., Aono, S., Shimizu, S., Kodama, T., Nawa, T., Shigekawa, M., Hikita, H., Sakamori, R., Hosui, A., Miyagi, T., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N. and Takehara, T. (考藤)	The combination therapy of alpha-galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice.	<i>Int J Cancer</i>	133	1126-113 4.	2013