

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

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構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invitro、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

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）。

が

(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-
-YFP 或は Gluc) -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

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 GlcNAc₃Man₃FucGlcNAc₂ (1.3%)、Man₃FucGlcNAc₂ (8.7%)、Man₂FucGlcNAc₂ (2.0%) を顕著に認めた。

・研究分担者(竹原徹郎)

(1) CD33⁺CD11b⁺HLA-DR^{-/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 ± 2.5%、B 型慢性肝炎患者では 6.8 ± 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 copy/ml 以上の患者において有意に MDSC の頻度は低かった

(HBV-DNA < 4 : 7.9 ± 5.3% vs HBV-DNA ≥ 4 : 4.2 ± 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- γ 、IFN- α 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) B 型慢性肝炎患者の抹消血中の骨髓由

(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。

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

6) B 型慢性肝炎・肝癌患者の血清中キヌレニン濃度の有意な上昇や HBV 産生依存性に IFN- 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、細胞接着面を經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。