

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

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 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～HBsN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 .「グルコシ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

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 受容体発現細胞株の樹立と感染初期過程の解析

分担研究者 森石恆司 山梨大学医学部 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て、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は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 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 100mge 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H C V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。

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

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 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、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を示した（感染初期観察には HuH7 細胞で充分）。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（昨年度成果を補強）。次に、NTCP 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、HuH7 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、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、その 1 つとして ApoB100 を単離した。また、HuH7 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

BNC 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)。

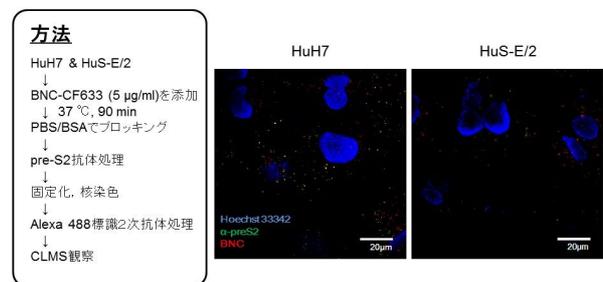


図1) HuH7 と HuS-E/2 の BNC 結合能の比較(方法)

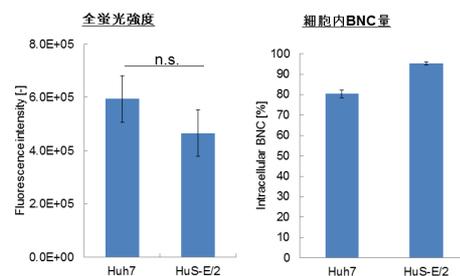


図2) HuH7 と HuS-E/2 は同等の BNC 結合能を有する

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、

低親和性 HBV 受容体の発現が多い細胞(例、HuH7 細胞) 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 のヒト肝臓細胞感染機構の研究には HuH7 で充分と考えられた。

HuH7 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)。

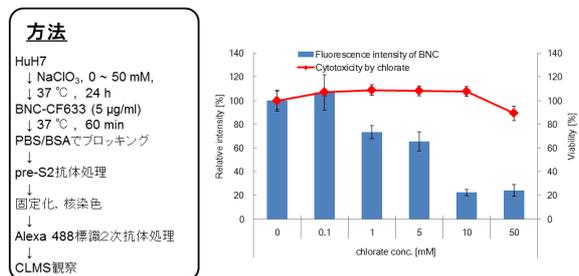


図3) ヘパラン硫酸発現を抑制したHuH7のBNC結合能

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 (ヘパラン硫酸依存的低親和性 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。

NTCP 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

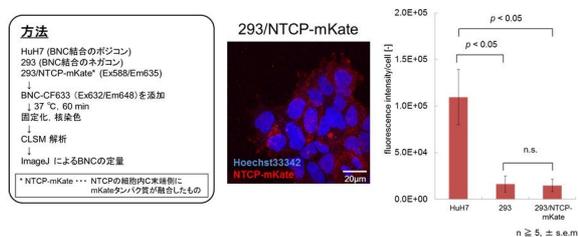


図4) NTCP-mKate融合タンパク質安定発現293細胞は BNCと結合しない

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)。

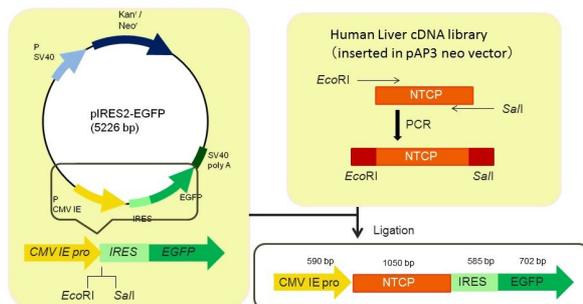


図5) NTCPとEGFPをIRESを介して発現するベクターの構築

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)。

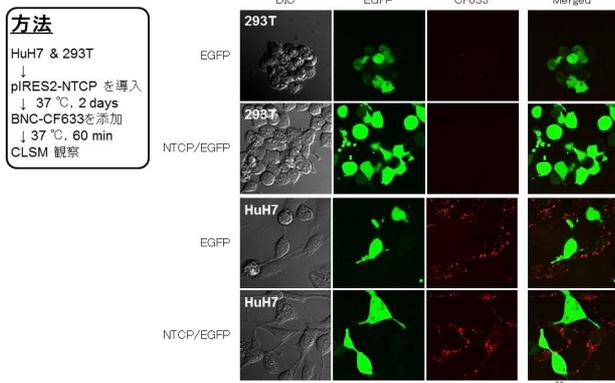


図6) NTCP発現293細胞はBNCと結合せず、NTCP発現はHuH7細胞のBNC結合能に影響を与えない

BNC 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。

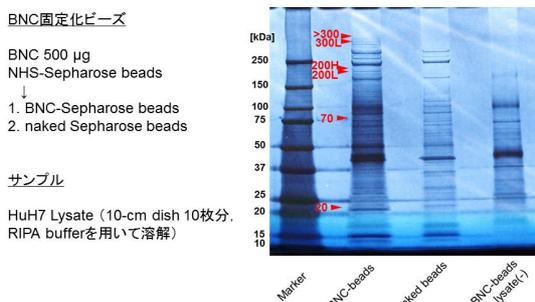


図7) BNC固定化ビーズによるプルダウン産物のプロテオミクス解析

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れ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。

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

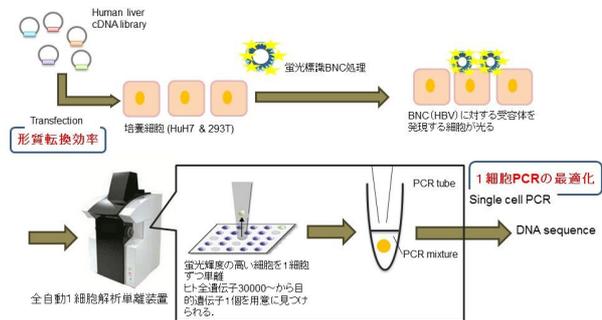


図8) 全自動1細胞解析単離装置によるHBV受容体スクリーニングの概要

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)。

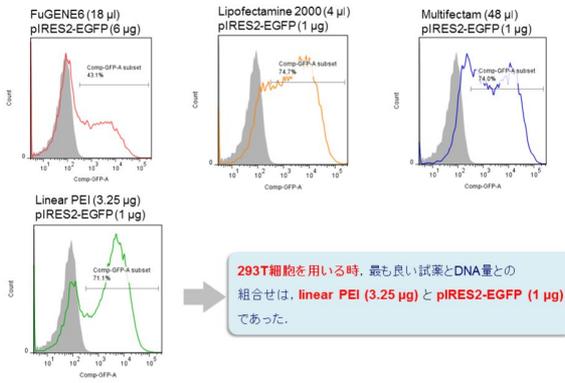


図9) 293T細胞の形質転換の検討

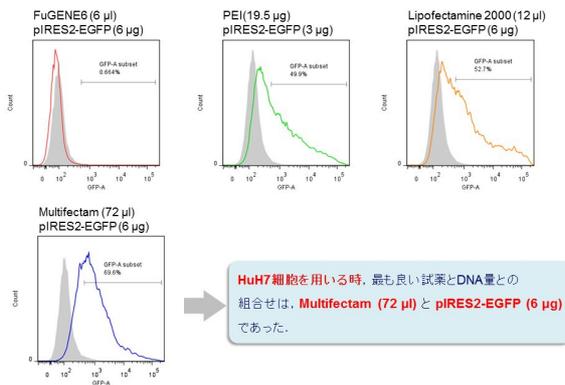
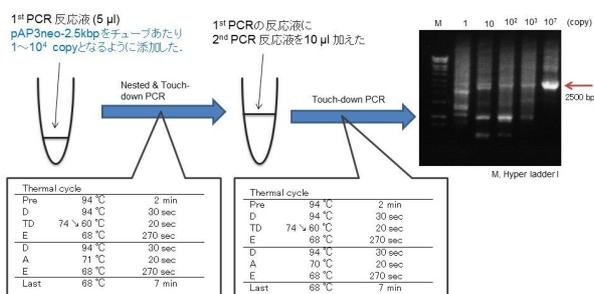


図10) HuH7細胞の形質転換の検討

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)。



現状、10 copyまでは再現性良く、PCRの結果が得られている。
 今後、実際にpAP3neo plasmidを導入した細胞を全自動1細胞解析単離装置を用いて1細胞単離し、1細胞PCRに供する。

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の条件検討も行き、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、我々の前項の結果と一致しない。これは、NTCP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性因子(共受容体)が必要であることを示しているか、HBV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有力であり、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

が、NTCP 単独で機能していないことが示唆されており、パートナー分子の同定が急務である。また、NTCP 以外の分子が関与している可能性も十分あり、我々が進めている BNC 固定化ビーズによるプルダウンアッセイ（従来のペプチド型プローブより HBV に近いので期待）や、全自動 1 細胞解析単離装置によるハイスループットスクリーニング（従来の FACS よりも低い陽性比率でも検出可能）も急ぎ行う予定である。

F. 研究発表 1. 論文発表

- 1) 良元伸男、黒田俊一：バイオナノカプセル（中川晋作監修）DDS の人体・環境・ものづくりへの適用技術(NTS・東京) 2013 年 118-126 頁
- 2) 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（名古屋大学最先端メディカ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 年 不明
- 3) Yoshimoto N., and Kuroda, S.: Single-cell-based breeding: Rational strategy for the establishment of cell lines from a single cell with the most favorable properties (REVIEW). J. Biosci. Bioeng. 未定(2014)
- 4) Iijima, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and Kuroda, S.: Nanocapsule-based probe for evaluating the orientation of antibodies immobilized on a solid phase. Analyst Vol. 138 pp.3470-3477 (2013)
- 5) Iijima, M., Yamamoto, M., Yoshimoto, N., Niimi, T., and Kuroda, S.: Bio-nanocapsules for signal enhancement of alkaline phosphatase-linked immunosorbent assays. Biosci. Biotech. Biochem. Vol. 77 pp.843-846 (2013)

- 6) 曾宮正晴、良元伸男、黒田俊一：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 ファインケミカル Vol.42 pp.44-49 (2013)
- 7) 松尾英典、良元伸男、黒田俊一：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 Vol.50 pp.207-218 (2013)
- 8) 飯嶋益巳、黒田俊一：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 Vol.71 pp.314-317 (2013)

2. 学会発表 該当なし

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

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

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、金沢大学がん進展制御研究所、准教授

研究要旨：HBV 感染に関わるウイルスレセプター等の宿主分子の探索・HBV 創薬研究に適した *in vitro* 感染系に利用可能な培養細胞を探索するため、HBV の感染成立を迅速・簡便に検出できるよう、自立的な増殖能を欠損し、かつマーカー遺伝子を組み込んだ組換え HBV ベクターを新たに作製し改良した。また、これら組換え HBV 産生用に HepG2 細胞および HEK293 由来のパッケージング細胞を樹立した。HBV 全蛋白質の発現を二つのレトロウイルス発現ベクターに分担させることにより HBV ゲノム間の相同組換えによる野生型 HBV の出現を強く抑制するパッケージング系を構築した。iPS 細胞より分化誘導した肝細胞では組換え HBV の感染が認められ *in vitro* 感染系として有用であることが示された。

A. 研究目的

本研究の目的は HBV 初期感染に関わるウイルスレセプターを含む宿主分子群の同定およびこれら分子と HBV の interaction を阻害する化合物の探索・創薬を通じて HBV の感染・増殖を阻止する方策を得ることにある。この目的のため昨年度に続き、HBV の感染成立を迅速・簡便に検出できるよう、自立的な増殖能を欠損しかつマーカー遺伝子を組み込んだ組換え HBV ベクターを構築し HBV *in vitro* 感染系に利用可能な培養細胞系を探索することとした。

B. 研究方法

組換え HBV ベクターの構築

HBV は genotype A を用いた。HBV 発現ベ

クターは CMV IE プロモーターより HBV pregenomic RNA を合成する pCSH4 プラスミドを用いた。組換え HBV ベクターでは、HBV ゲノムサイズが変化することのないよう GeneArt (ライフテクノロジーズ) を使ってマーカー遺伝子 (新たに Halo-tag、tdTomato 等対象 DNA を HBV ベクターの HBV S 遺伝子およびその近傍の部位と塩基数を合わせて置換した。さらに HBV ベクターの改良も行った。感染成立の検出感度を高めるためマーカー遺伝子の発現プロモーターを HBV S 遺伝子プロモーターから CMV IE プロモーターに置き換えること、また、より安全性を高めるため pregenomic RNA 合成を抑制することが知られている core 遺伝子プロモーター変異を導入すること、およ

び、全 HBV 遺伝子内へ変異 (stop codon) を導入することにより HBV ゲノム間の相同組換えによる野生型 HBV の出現をより強力に抑える対策を講じた。

組換え HBV パッケージング細胞の作製

HBV ベクター同様、細胞内での HBV ゲノム間の相同組換えによる野生型 HBV の出現の可能性をより低く抑えるため、HBV 複製ドメイン及び polyA シグナルを欠いた HBV core、polymerase、X 遺伝子発現用と HBV envelope 遺伝子発現用のコンストラクトをそれぞれレトロウイルスベクターを介して HepG2 細胞や HEK293 細胞に導入し HBV パッケージング用細胞を樹立した。

組換え HBV の産生と培養細胞への感染 組

換え HBV ベクタープラスミド DNA を安定に組み込んだパッケージング細胞の培養上清中の HBV を研究に用いた。HBV を各種培養条件のもと、4%PEG8000 存在下で感染実験を行った。感染成立は RT-PCR による HBV mRNA の検出、および HBV ベクターのマーカ遺伝子の発現により検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、HBV ベクターを用いた実験を行うことから文部科学省の定める省令「研究開発等に係わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止処置等を定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第 1 号)・組換え DNA 実験指針・金沢大学研究用微生物安全管理規程等に則り本学安全委員会等の承認を得て、その指示の下で研究は進められる。

C. 研究結果

組換え HBV ベクターの構築 感染成立の検出

感度を高めるためマーカ

ー遺伝子の発現プロモーターを HBV S 遺伝子プロモーターから CMV IE プロモーターに置き換えた HBV ベクターを作製した。これらベクターでは、sNanoLuc 等マーカ遺伝子の発現を従来に比べ 100 倍以上高めることができた。また、より安全性を高めるため pregenomic RNA 合成を抑制することが知られている core 遺伝子プロモーターへの変異を導入するとともに、全 HBV 遺伝子へ変異 (stop codon) を導入した HBV ベクターを構築した。これら HBV ベクターは $10^5 \sim 10^7$ /ml の HBV 粒子を培養液中に放出させており従来のものと同程度で低下することはなかった。この結果、HBV ベクターでは少なくとも全ゲノムの 43.1% (1,388 塩基) を外来 DNA と置換できることがわかった。

組換え HBV パッケージング細胞の作製

昨年度樹立した HepG2 由来のパッケージング細胞 HepG2PH は $\sim 10^6$ /ml の組換え HBV 粒子を産生することが示された。今回作製した HEK293 由来のパッケージング細胞 29392 は 10^7 /ml とより多くの組換え HBV を産生することができる。しかし、抗 HBs 抗体、抗 HBc 抗体を用いた免疫沈降法による解析から多くの未成熟 HBV 粒子の存在が示唆された。

HBV in vitro 感染系について

HBV レセプター候補 NTCP 遺伝子の安定発現株を HuH7 細胞および HepG2 細胞より樹立した。これら細胞への HBV 感染効率は低かった(全細胞の 0.1%以下と推定された)。iPS 細胞 Dotcom より分化誘導した細胞では

HBV-GLuc の感染実験からマーカー遺伝子 GLuc の発現がみられ感染成立が示唆され、現在詳細な解析を進めている。

D. 考察

HBV ベクターの改変について

組換え HBV のマーカー遺伝子の発現量を上げることは HBV 感染成立の検出感度をさらに高める上で重要である。マーカー遺伝子の発現に利用していた S 遺伝子プロモーターをより強力な CMV IE プロモーターと置き換えることによりマーカーの発現を高めることができ HBV 感染をより容易に高感度に検出できるようになる系を作り上げることができた。また、このような強力なプロモーターの HBV ゲノムへの導入が組換え HBV 産生に影響をあたえることはないことがわかった。ベクターとしてより安全性を高めるため全 HBV 遺伝子に stop codon 変異を導入した組換え HBV ベクターを構築したがこれらの変異導入も組換え HBV 産生に影響することは無かった。HBV 感染メカニズムや HBV 感染に關与する宿主因子の網羅的探索、HBV 感染を阻止する化合物の探索に有用なツールになると考えている。

組換え HBV のパッケージング細胞について

HepG2 細胞に加えて、遺伝子の導入・培養増殖の容易な HEK293 由来のパッケージング細胞 29392 を樹立した。この細胞は 10^7 /ml とより多くの組換え HBV を産生することができるが、抗 HBs 抗体、抗 HBc 抗体を用いた免疫沈降法による解析から多くの未成熟 HBV 粒子の存在が示唆された。さらに効率の良い HBV 産生系とするには不足し

ていると思われる HBV エンベロープ蛋白質の供給を増やす必要があると考えている。

HBV in vitro 感染系について

HuH7 細胞および HepG2 細胞由来の NTCP 安定発現細胞は HBV に感染可能となるが、HepaRG 細胞と比べると効率は低い。期待したほど感染効率が上がらないことから HBV 感染の分子メカニズムは複雑でこれら細胞には足りない複数の宿主因子が關与していることが予想される。現在、組換え HBV ベクターを使ってこれら宿主因子の網羅的探索を進める準備を行っている。iPS 細胞の分化誘導によって得られる肝細胞は肝臓特異的遺伝子の発現量等その特性が多様であることから HBV に対する感受性についても同様であると考えられる。さらに多種の iPS 細胞について肝細胞への分化誘導と HBV 感染能獲得について検討することで HBV 感染研究により適した in vitro 感染系が見いだされると考え進めている。

E. 結論

従来よりマーカー遺伝子の発現を 100 倍高め、HBV 感染を高感度に検出する HBV ベクターを構築でき、HBV 感染メカニズムや HBV 感染に關与する宿主因子の網羅的探索、HBV 感染を阻止する化合物の探索に有用なツールになると考えている。

HEK293 細胞を用いて 10^7 /ml の HBV を産生する効率の良い新たな HBV パッケージング系を作った。

iPS 細胞より分化誘導した肝細胞では HBV の感染が認められ、in vitro 感染の有用な系となる可能性を示唆した。

F. 研究発表 1.

論文発表

なし 2.学会発

表

黒木和之、久保周子：HBV ベクターの構築
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、神戸国際会議
場）

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 感染におけるリン酸化タンパク質の機能解析

分担研究者：岡本 徹 大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨：HBV の受容体であるヒト NTCP を発現するトランスジェニックマウスの作製を遂行するとともに、酵母ツーハイブリッドスクリーニングで、HBx 蛋白質と相互作用する分子として FBXL5 が同定した。FBXL5 は CUL1/SKP1 と複合体を形成し、HBx 蛋白質を特異的にユビキチン化し、プロテアソームによって分解する分子であ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。様々なウイルスは宿主細胞への感染を成立させるために、近年、HBV の受容体として同定された Na⁺ 依存的胆汁酸胆汁酸トランスポーター (NTCP) は、ヒト NTCP は HBV の受容体として機能するが、マウスの NTCP は機能しないことから、HBV が感染できる動物種を NTCP が規定している可能性が示唆された。そこで、ヒトの NTCP を発現するトランスジェニックマウスを作製し、HBV 感染を許容できるマウスができるかを検討する。また、HBV の複製や発癌に関与する HBx 蛋白質の機能解析を行うため、酵母ツーハイブリッド法により HBx 蛋白質と相互作用する宿主蛋白質の同定を行った。

B. 研究方法

HBV は効率の良く複製できる動物モデルがない。そのため、近年 HBV の受容体として同定されたヒト NTCP を発現するトランスジェニックマウスを作製し、HBV 感染に感受性を持つマウスができるかを検討する。HBx 蛋白質との相互作用する分子を同定す

るため、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行った。

（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、個人情報を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HBV の受容体候補であるヒト型 NTCP を発現するマウスを作製するため、肝臓特異的なプロモーターである、アルブミンプロモーターの下流にヒト NTCP の cDNA を挿入し、マウス胚へ導入し、ヒト NTCP 発現マウスを得た。

HBx 蛋白質と相互作用する新規分子として FBXL5 を同定した。FBXL5 は HBx と相互作用し、CUL1/SKP1 と複合体を形成し、HBx をユビキチン化しプロテアソーム依存的に分解することが明らかとなった。

D. 考察

得られたヒト NTCP 発現トランスジェニックマウスが HBV 感染を許容することができるかについて早急に検討する。

HBx 蛋白質の分解メカニズムを明らかにすることで、HBV 複製や病原性をコントロールできると考えられる。

E. 結論

ヒト NTCP を発現するトランスジェニックマウスを作製した。また、HBx 蛋白質が FBXL5 と相互作用し、ユビキチン化を受けて分解されていることを見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kelly GL, Grabow S, Glaser SP, Fitzsimmons L, Aubrey BJ, Okamoto T, 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. Targetting of MCL-1 kills MYC-driven mouse and human lymphomas even when they bear mutations in p53, *Genes Dev* 28(1):58-70 (2014)
2. Okamoto T, Coultas L, Metcalf D, van Delft M, Glasser SP, Takiguchi M, Strasser A, Bouillet P, Adams JM, Hunag DCS. Enhanced Mcl1 stability can blunt stress-induced apoptosis, cause male sterility and promote tumorigenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(1): 58-70 (2014)
3. 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, Okamoto T, Dobson RC, Hilton DJ, Babon JJ, Nicola NA, Strasser A, Silke J, Alexander WS. The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. *Immunity*. 39: 443-453 (2013)
4. Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, Takeda K. Ifit1 inhibits JEV replication through binding to 5' capped 2' -O unmethylated RNA. *J Virol*. 87(18): 9997-10003 (2013)
5. Moujalled DM, Cook WD, Okamoto T, Murphy J, Lawlor KE, Vince JE, Vaux DL. TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1. *Cell Death Dis*. Jan 17;4:e465 (2013)
6. Okamoto T, Zobel K, Fedorova A, Quan C, Yang H, Fairbrother WJ, Huang DC, Smith BJ, Deshayes K, Czabotar PE. Stabilizing

the Pro-Apoptotic BimBH3 Helix (BimSAHB) Does Not Necessarily Enhance Affinity or Biological Activity. *ACS Chem Biol*. 8(2): 297-302 (2013)

2. 学会発表

1. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV 感染により誘導されるオートファジーの性状，第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日，2013
2. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖，第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日，2013
3. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川舞、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割，第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日，2013
4. 山本聡美、福原崇介、塩川 舞、小野慎子、岡本 徹、松浦善治、B 型肝炎ウイルスの増殖に關与する宿主因子の解析，第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日，2013
5. 川岸崇裕、金井祐太、岡本 徹、松浦善治、小林剛、哺乳類オルソレオウイルスの腫瘍細胞溶解能の検討と遺伝子操作系の確立，第 61 回日本ウイルス学会学術集会、兵庫、11 月 10 日-12 日，2013
6. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Masami Wada, Chikako Ono, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 20th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, Australia, Oct 6th-10th, 2013
7. Toru Okamoto, Yukari Sugiyama, Chikako Ono, Sayaka Aizawa, Pham Duc Ngoc, Takahisa Kohwaki, Eiji Hirooka,

Takasuke Fukuhara, Masahiro Yamamoto, Yoshiharu Matsuura, Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV, 20th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, Australia, Oct 6th-10th, 2013

8. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells, 20th International Meeting on hepatitis C virus and related viruses, Australia, Oct 6th-10th, 2013
9. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Takashi Motomura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Role of

HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 32nd American Society for Virology, Annual Meeting, USA, JULY 20th-24th.

10. Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Akinori Ninomiya, Takasuke Fukuhara, Toru Okamoto, Takayuki Abe, and Yoshiharu Matsuura, Innate immune response induced by baculovirus suppresses transgene expression, 32nd American Society for Virology, Annual Meeting, USA, JULY 20th-24th.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他

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

細胞表面の糖鎖変化とHBV感染に関する研究

三善英知 大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学 教授

研究要旨：糖鎖は細胞表面の多くのタンパク質に結合し、その構造は炎症やがんに伴って変化することが知られている。本研究では、いくつかの糖鎖改変肝がん細胞とHBV感染細胞HB611を用いて、HBVの感染性の変化について検討した。そしていくつかの糖鎖変化の中でフコースによる糖鎖変化(フコシル化)とシアル酸による糖鎖変化(シアリル化)に注目し、糖鎖によるHBV感染性変化の分子機構に関して考察した。

A. 研究目的

HBV(B型肝炎ウイルス)には肝細胞特異的な受容体の存在が示唆されるが、今まで確実なものは同定されていない。しかし2012年末に中国のグループからNTCP(Sodium taurocholate cotransporting polypeptide)というトランスポーターがHBVの新しい受容体として報告された。恐らく、HCV受容体の場合と同様に、NTCPが単独で受容体として機能するものではなく、複数のタンパクの複合体として機能することが想定される。一般的に、多くの膜表面のタンパク質には糖鎖が存在し、その機能制御に関わることが知られてきた。NTCPにもN型糖鎖付加部位が2箇所存在し、NTCPと複合体を作るタンパク質も糖鎖を持つと想定される。本研究では、細胞表面の糖鎖構造を変化させることによって、HBVの感染性がどのように変化するかを検討することを手始めとして、その分子機

構の解明を目指す。

B. 研究方法 これまで長年研究を続けて来た3つの糖転移酵素 N-アセチルグルコサミン転移酵素 III, V (GnT-III, GnT-V) および α 1-6 フコース転移酵素(FUT8)を、遺伝子導入によりいくつかの肝がん細胞に過剰発現させた。そして得られたクローン間でのHBVの感染性を、名古屋大学の黒田俊一教授が作成したHBVの擬似粒子であるCy3標識のBionanocapsule (BNC)を用いて検討したところ、糖鎖変化とHBVの感染性に違いが認められた。平成24年度は、糖鎖構造解析法として主にレクチンを用いたが、平成25年度は本研究分担者の1人である三崎亮博士と共同でmass spectrometry (LCMS)による解析も行った。また、BNCの取り込みも平成24年度は蛍光顕微鏡による観察で行ったが、平成25年度は定量性をもって測

定できる flow cytometry 法 (FACS) で検討した。HBV genome を発現させた HB611 とその親株である Huh6 細胞において、著明な糖鎖構造の変化と BNC の感染性に違いを認めため、平成 25 年度は特にこの 2 種の細胞を中心として、BNC 取り込みに影響する糖鎖構造を同定するため、より詳細に検討することとし、実験を精力的に進めた。

(倫理面への配慮) 本研究は、培養細胞レベルの研究なので、臨床サンプルを扱う場合のような倫理面での問題はない。また、遺伝子改変細胞を扱うための、遺伝子組み換え実験の承認は得ている。HBV の細胞実験に関しては、P2 レベルの施設を使用するとともに、大臣承認の実験許可を文部科学省から得ている。

C. 研究結果

HB611 細胞と Huh6 細胞で BNC の取り込みを FACS で解析したところ、MFI (Mean Fluorescence Intensity) が 2 倍以上 HB611 細胞で上昇していた。そこでいくつかのレクチンを用いてこの 2 つの細胞の糖鎖解析を行ったところ、コア型フコースとシアル酸の増加、バイセクト型および β 1-6 結合 GlcNAc 糖鎖の減少が認められた。一方、ルイス型フコースや ConA 結合型糖鎖には差を認めなかった。バイセクト型糖鎖の減少は、1995 年の J. Biol. Chem. に既に報告している既知の知見のため、今回は増加の著しかったコアフコースとシアル酸に注目することとした。まず、フコシル化関連遺伝子の発現を real-time PCR で検討したところ、コアフコースを生合成する唯一の糖転移酵

素である *FUT8* の発現が 5 倍以上 HB611 細胞で高かった。次に、これらの糖鎖変化が HBV 感染によって誘導されたものか否か検討するために、HB611 細胞をインターフェロン α で処理したところ、濃度依存性に BNC の取り込みが抑制されるとともに、シアル酸とコアフコース量にも低下が認められた。これらの糖鎖変化が結果なのか原因なのかを知るため、HB611 細胞をシアリダーゼ処理して BNC の感染性を検討した。するとシアリダーゼ処理によって SSA (シアル酸認識レクチン) との結合性は 50% 低下し、BNC の取り込みも 20-25% 低下した。次にウイルスベクターを用いて HB611 細胞の *FUT8* 遺伝子をノックダウンしたところ、PhoSL (コアフコース認識レクチン) との結合性の低下とともに、BNC の取り込みも 10-15% 低下した。また preliminary な実験データではあるが、*FUT8* 遺伝子の発現量と HBV 受容体候補の NTCP の遺伝子発現の間に、相関が認められた。Mass spectrometry による HB611 と Huh6 の細胞表層の糖鎖構造解析結果に関しては、三崎先生の報告書をご参照いただきたい。

D. 考察

25 年度の研究結果から、HBV の感染には、コアフコースとシアル酸の関与が重要であることが考えられた。ノックダウンおよびシアリダーゼ処理による検討から、これらの糖鎖変化は Huh6 に HBV 遺伝子が導入された結果生じた変化というだけでなく、もっと能動的に HB611 細胞により BNC が取り込まれやすい原因となっている可能性

が推察された。インフルエンザの場合は、自らが産生するシアリダーゼによって感染した細胞から次の細胞へ感染する時に宿主となる細胞のシアル酸を除去する。このシアリダーゼの阻害薬こそがタミフルであり、実際のインフルエンザの治療薬に使われている。HBV が自らのウイルスを感染もしくは増殖させやすい環境に、宿主細胞の糖鎖改変という手段を利用することは十分考えられる。肝がん細胞の表面分子には多くのシアル酸をもつ糖タンパクが存在する。HBV 受容体は複合体であることが想定されるが、これらの中にシアル酸の標的分子が含まれる可能性は十分あり、その同定は、感染メカニズムの解明に非常に大きな一歩となることが予想される。今後の重要な課題である。一方、コアフコースは、ほとんどの膜受容体に存在すると想定されるが、その量の増減によって受容体自体の機能が影響され、下流の細胞内シグナルが変化し、糖鎖とは全く異なるタンパク質の遺伝子発現が誘導される場合がある。まだ preliminary な結果ではあるが、私たちが掴んだ HB611 と親株の Huh6 に見られた FUT8 遺伝子発現と NTCP 遺伝子発現の相関性は、複雑な経路によって NTCP の遺伝子発現が HB611 で増加した可能性も考えられる。26 年度はヒト NTCP 遺伝子をクローニングし、遺伝子工学的に 2 箇所の糖鎖付加部位をつぶしたものととの比較により、NTCP 自体の糖鎖機能についても検討を進める予定である。

E. 結論

HBV ゲノム遺伝子を導入した HB611 細胞では、親株の Huh6 細胞に較べてコアフコースとシアル酸の量が増加していた。特異的遺伝子のノックダウンやシアル酸消化による検討から、これらの糖(鎖)が疑似 HBV ウイルス粒子である BNC の取り込みに関与している可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, **Miyoshi E**. (2013) Lectin-based immunoassay for aberrant IgG glycosylation as the biomarker for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* **19** (2), 321-331.
2. Kamada Y, Kinoshita N, Tsuchiya Y, Kobayashi K, Fujii H, Terao N, Kamihagi K, Koyama N, Yamada S, Daigo Y, Nakamura Y, Taniguchi N, **Miyoshi E**. (2013) Reevaluation of a lectin antibody ELISA kit for measuring fucosylated haptoglobin in various conditions. *Clin. Chim. Acta* **417**, 48-53.
3. Tanaka K, Moriwaki K, Yokoi S, Koyama K, **Miyoshi E**, Fukase K. (2013) Whole-body imaging of tumor cells by

azaelectrocyclization: visualization of metastasis dependence on glycan structure. *Bioorg Med Chem.* **21** (5), 1074-1077.

4. Kimura M, Masui Y, Shirai Y, Honda C, Moriwaki K, Imai T, Takagi U, Kiryu T, Kiso T, Murakami H, Nakano H, Kitahata S, **Miyoshi E**, Tanimoto T. (2013) Preparation of branched cyclomaltoheptaose with 3-O- α -L-fucopyranosyl- α -D-mannopyranose and changes in fucosylation of HCT116 cells treated with the fucose-modified cyclomaltoheptaose. *Carbohydrate Res.* **374**, 49-58, 2013.
5. 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, **Miyoshi E**, Shoda J. (2013) Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *J Gastroenterol.* 2013 Apr 17 in press.
6. 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, **Miyoshi E**. (2013) Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis. *Proteomics Clin Appl* in press.
7. 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, **Miyoshi E**. (2013) Serum fucosylated haptoglobin as a novel diagnostic biomarker for predicting hepatocyte ballooning and nonalcoholic steatohepatitis. *PLOS One* **8** (6), e66328.
8. Nakayama K, Moriwaki K, Imai T, Shinzaki S, Kamada Y, Murata K, **Miyoshi E**. (2013) Mutation of GDP-mannose-4,6-dehydratase in colorectal cancer metastasis. *PLOS One* **8** (7), e70298.
9. Azuma K, Shinzaki S, Asazawa H, Kuroki E, Kawamoto S, Kamada Y, Hayakawa K, **Miyoshi E**. (2013) Twin studies on the effect of genetic factors on serum agalactosyl immunoglobulin G levels. *Biomedical Reports* in press.
10. Seto K, Uchida F, Baba O, Yamatoji M, Karube R, Warabi E, Sakai S, Hasegawa

S, Yamagata K, Yanagawa T, Onizawa K, Miyoshi E, Shoda J, Bukawa H. (2013) Negative expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in oral squamous cell carcinoma correlates with poor prognosis. *Springerplus*. 2013 Dec 6;2:657.

11. Tanemura M, Miyoshi E, Nagano H, Eguchi H, Taniyama K, Kamiike W, Mori M, Doki Y. (2013) Role of α -gal epitope/anti-Gal antibody reaction in immunotherapy and its clinical application in pancreatic cancer. *Cancer Sci*. **104** (3), 282–90. (review)

和文総説 糖鎖を用いた肝癌幹細胞の単離とその生物学的特性 寺尾尚子、奥戸久美子、森脇健太、三善英知 消化器内科 **56**(3), 292-300, 2013

糖鎖がんマーカー 三善英知、鎌田佳宏、魚住尚史、実験医学 **31**(10), 58-64, 2013

2.学会発表

第 103 回アメリカ癌学会 (AACR) April 6-10 in Washington DC, USA

Nakayama K, Moriwaki K, Shimomura M, Fujii H, Takamatsu S, Kamada Y, Murata K, Miyoshi E.

Clinical significance of GDP-mannose-4, 6-dehydratase mutation and loss of fucosylation in colorectal cancer. April 9 ポスター発表

Tanemura M, Miyoshi E, Tanida T, Nagano H, Eguchi H, Furukawa K, Nonaka Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Taniyama K, Kamiike W, Mori M, Doki Y. Significant protection against gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells with tumor lysate vaccine, engineered express α -gal epitopes April 10 ポスター発表

2013 アメリカ消化器病学会 May 18-21 in Florida, USA

Fujii H, Shinzaki S, Ishii M, Kamada Y, Iijima H, Tsujii M, Takehara T, Miyoshi E.

Deficiency of fucosylation as a protective role for intestinal inflammation

May 18 ポスター発表

2013 アメリカ糖鎖生物学会 November 17-20, 2013 St. Petersburg, Florida, USA

Miyoshi E, Asazawa H, Akita M, Takeda Y, Takamatsu S, Kamada Y.

Analysis of serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development .

11/20 ポスター発表

シンポジウム、招待講演

第 72 回 日本癌学会学術総会 平成 25 年 10 月 3-5 日 パシフィコ横浜

Miyoshi E, Takamatsu S, Kamada Y.

Fucosylated haptoglobin is a novel type of cancer biomarker: a possible implication for a diagnosis of hepatoma

国内学会

第 49 回日本肝臓学会総会 6/6-6/7 2013
京王プラザホテル(東京) 鎌田佳宏、藤
井英樹、澤井良之、土井喜宣、水谷佳代、
木下憲明、今井康陽、河田則文、竹原徹郎、
三善英知

血中 Mac-2 binding protein 値は新たな
NASH 鑑別、病期進展のマーカーである

第 32 回日本糖質学会年会 国際交流セ
ンター(大阪) 8/5-8/7

8/6 ポスター 寺尾尚子、高松真二、峰平
朋実、森脇健太、鎌田佳宏、三善英知
膵がんの Gemcitabine 耐性細胞とがん幹細
胞に共通する糖鎖構造の同定

高橋志郎、白井亮平、伊藤 潤、三善英知、
中堅三弥子 種々のがんにおける血清ハプ
トグロビンの 糖鎖構造解析

8/7 ポスター 東加奈子、奥戸久美子、寺
尾尚子、森脇健太、高松真二、鎌田佳宏、
世良田 総、
仲 哲治、三善英知 がん幹細胞に特徴的
な糖鎖のキャリア分子の同定

8/6 ワークショップ 4
三善英知 フコシル化のがん生物学

第 8 回臨床検査学教育学会 平成 25 年 8
月 26-28 日 大阪大学

水谷佳代、鎌田佳宏、藤井宏修、秋田真彩、
佐藤元哉、木田祥穂、高松真二、三善英知
8/27 口頭発表 非アルコール性脂肪性肝炎
の新たな血液診断マーカーとしての
Mac2-binding protein (Mac-2BP)

片岡直也、石井真悠子、新崎信一郎、藤井
宏修、竜中法佳、高松真二、鎌田佳宏、
三善英知 8/28 口頭発表

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V
(GnT-V)が炎症性腸疾患の病態に及ぼす影
響に関する検討

下村真由香、中山小太郎純友、寺尾尚子、
小林夕香、中堅三弥子、鎌田佳宏、村田
幸平、三善英知 8/28 口頭発表 コ
アフコース認識レクチン PhoSL を用いた
新規腫瘍マーカー測定法の開発

臨床検査学科目別分科会 三善英知、松尾
収二

第 86 回日本生化学会 2013 年 9 月 11-13
日 パシフィコ横浜 油谷美寿季、寺尾美
香、加藤亜里沙、室田 浩之、片山一朗、
三善英知 9/13 口頭発表

Oligosaccharide modification by
N-acetylglucosaminyltransferase-V promotes
skin sclerosis by inducing macrophages to shift
toward M2

秋田真彩、鎌田佳宏、水谷佳代、藤井宏修、
佐藤元哉、木田祥穂、浅澤瞳美、

中山小太郎純友、三善英知 9/13 口頭発表
非アルコール性脂肪性肝炎の鑑別診断にお
ける血中フコシル化ハプトグロビン測定の
有用性について

第 72 回 日本癌学会学術総会 平成 25 年
10 月 3-5 日 パシフィコ横浜 峰平朋実、
魚住尚史、浅澤瞳美、藤井宏修、高松真二、
鎌田佳宏、田中克典、深瀬浩一、三善英知
10/5 ポスター発表

CA19-9 の輸送に関わる新規膜複合体構成
蛋白質の機能解析

高松真二、大坪和明、藤井宏修、鎌田佳宏、
三善英知、谷口直之 10/5 口頭発表 糖
転移酵素 GnT-III 発現のレドックス制御
と貪食能に及ぼすメカニズムの解析

第 60 回日本臨床検査医学会学術総会 平
成 25 年 10 月 31 日～11 月 3 日 神戸国際
会議場 木田祥穂、鎌田佳宏、佐藤元哉、藤
井宏修、水谷佳代、秋田真彩、高松真二、
吉田雄一、竹原徹郎、三善英知

11/1 口頭発表

N-アセチルグルコサミン転移酵素(GnT-V)
の HDL 新生に及ぼす作用

東加奈子、寺尾尚子、山崎美佳、高松真二、
鎌田佳宏、三善英知 11/1 口頭発表 が
ん幹細胞に特徴的な糖鎖のキャリア分子
の同定

水谷佳代、鎌田佳宏、藤井宏修、秋田真彩、
佐藤元哉、木田祥穂、高松真二、三善英知

11/2 口頭発表

Mac-2 binding protein は非アルコール性脂
肪性肝炎の新たな血液診断バイオマーカー
である

第 40 回肝臓学会西部会 平成 25 年 11 月
6-7 日 長良川国際会議場 木田祥穂、鎌田
佳宏、佐藤元哉、藤井宏修、水谷佳代、秋
田真彩、高松真二、吉田雄一、竹原徹郎、
三善英知 11/7 口頭発表

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V
(GnT-V) の過剰発現は、肝臓での HDL
新生を促進する

佐藤元哉、鎌田佳宏、木田祥穂、藤井宏修、
石井真悠子、吉田雄一、竹原徹郎、三善英
知 11/6 口頭発表

N-アセチルグルコサミン転移酵素 V
(GnT-V) の Concanavalin A 誘導性肝炎に
おける役割

第 42 回日本免疫学会 平成 25 年 12 月 11
～13 日 幕張メッセ(千葉)

藤井宏修、新崎信一郎、飯島英樹、辻井正
彦、竹原徹郎、三善英知

12/12 ポスター発表

Altered Oligosaccharide Structures Reduce
Colitis Induction in Mice Defective in β -1,4-
Galactosyltransferase□

招待講演

第 72 回 日本癌学会学術総会シンポジウ
ム 平成 25 年 10 月 3 日 パシフィコ横浜
三善英知、高松真二、鎌田佳宏

新しい糖鎖がんマーカー、フコシル化ハプトグロビンの肝がん診断への可能性

第 11 回 糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 生活習慣病と糖鎖科学

平成 25 年 10 月 26 日 東北薬科大学（仙台）

三善英知 糖鎖科学による膵がんへの挑戦

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

第 14 回関西グライコサイエンスフォーラム優秀発表賞

東加奈子、奥戸久美子、寺尾尚子、森脇健太、鎌田佳宏、世良田総、仲 哲治、三善英知 糖鎖を用いたがん幹細胞の単離とその機能解析

社会貢献

第 66 回日本臨床化学会近畿支部例会 教育講演

三善英知 肝臓の病気と糖鎖 日時：6 月 1 日（土）午後 会場：宝塚大学 梅田キャンパス

第 24 回 大阪若手がんセミナー 主催者 三善英知、井上正宏、猪原秀典 平成 25

年 7 月 16 日 千里阪急ホテル クリスタルホール

北野高校キャリアガイダンス 平成 25 年 11 月 7 日 北野高校 医師と研究 三善英知

第 3 回グライコサイエンスセミナー 主催者 三善英知 革新的な抗体作成技術とその応用

東北大学大学院医学系研究科教授 加藤幸成 平成 25 年 11 月 27 日 大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻

HBV 感染機構に寄与する HBV 表面抗原由来糖鎖構造の解析

三崎 亮 大阪大学・生物工学国際交流センター・講師

研究要旨：これまでに、糖鎖はタンパク質の分解からの保護や生理活性に寄与するだけでなく、癌の悪性化など病態とも密接に関わることが分かってきた。いくつかのウイルス感染とも密接な関係にあることが指摘されており、HBV についてもその感染に糖鎖が必要であることが報告されている。しかし、実際にウイルスもしくは宿主細胞由来のどのような糖鎖構造がウイルス感染や病態発症機構に寄与するのかについては明らかにされていない。本研究課題では、「in vitro 糖鎖改変技術」「糖鎖構造解析技術」「タンパク質細胞内輸送経路解析技術」の3技術を駆使することで、ウイルスおよび宿主細胞由来糖鎖構造と HBV 病態発症機構との関係解明に迫り、「糖鎖を標的とした治療戦略の開発」を目指す。

A. 研究目的

本研究では、HBV 表面抗原糖鎖の改変と HBV 感染細胞の糖鎖修飾変動から HBV 病態発症機序の解明を行い、糖鎖を標的とした創薬を目指す。

研究代表者が開発した HBV 膜粒子を被覆した擬似 HBV (HBV pseudotype particle: HBVpp) が感染系の構築に有効な材料であるため、HBVpp 発現細胞の培養液中より HBVpp を大量精製し、in vitro にて糖鎖改変を目指す。HBVpp の作成が上手くいかない場合も考慮し、他研究分担者が酵母にて作成した HBV 表面抗原 (HBsAg) を表面に提示した精製済 baio-nanocapsule (BNC) を利用することも視野に入れる。また、当研究分担者サイドでも昆虫細胞・バキュロウイルス

発現系を利用して HBVpp の作成を行う。最終的に糖鎖構造を任意に改変した HBVpp の感染能力と細胞内での動態を解析する。

また、HBV 感染が宿主細胞の糖鎖分布および糖鎖修飾関連酵素の発現量にどのような影響を及ぼすのかを調査する。他研究分担者と共同して HBVpp 感染、非感染細胞の糖鎖プロファイルを作成し、ウイルス感染による糖鎖修飾の変動を追跡する。

B. 研究方法

HBVpp の構築と精製

HBVpp 発現用ベクターを 25 cm² フラスコ 10 mL の血清入り培地にて培養したヒト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細胞に形質導入した。形質導入 2 日後に、培地を

無血清培地 10 ml に変換し、更に 5 日間培養を行った。得られた培養液と細胞を遠心分離し、抗 HBsAg 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより両画分に含まれる HBVpp を検出した。HBVpp の生産が認められた培養液 5 ml について、225 cm² フラスコで培養したヒト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細胞培養液 100 ml に添加し、7 日間培養後、培養液から HBVpp の精製を試みた。

回収した培養液に対して、PEG8000 を 6% となるように加え 4 で 16 時間静置した。遠心分離により沈殿を回収し、5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) 中に沈殿を再懸濁した。再懸濁液を遠心分離し、得られた上清をフィルター濾過した。上記リン酸ナトリウム緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイトカラムに濾液を供し、同緩衝液でカラムを洗浄した。続いて、緩衝液濃度を 50 mM ずつ段階的に上げた溶出液を供し、目的 HBVpp の溶出を行った。

BNC については、糖鎖改変を行う前に実際にどのような糖鎖が付加されているのかを確かめる必要があるため、後述する方法に従って糖鎖構造解析を行った。

一方、昆虫細胞を利用した HBVpp の作成を試みた。バキュロウイルススタンパク質組換え生産系を利用するため、まず HBsAg 発現ベクターの構築を行った。次に、生産宿主として選抜した Sf9 細胞を 6 穴プレートにて血清入り培地で培養し、構築した発現ベクターを用いて形質導入を行った。3 日間培養を行った後、得られた培養液と細胞を遠心分離し、抗 HBsAg 抗体を用いたウエ

スタンブロッティングにより両画分に含まれる HBsAg を検出した。

糖鎖プロファイルの作成 (HBV ゲノム遺伝子を保持するヒト肝癌細胞 Huh6 (HB611) の糖鎖構造解析)

培養後の細胞を PBS で十分に洗浄し、アセトンを追加することで脱脂、脱水を行い糖タンパク質試料とした。乾燥後、糖タンパク質に N-グリコシダーゼ F を添加、37 で 24 時間インキュベートすることで糖鎖の切り出しを行った。セルロースカートリッジを利用して切り出した糖鎖を精製後、糖鎖に 2-アミノピリジンを付加し還元することで糖鎖のピリジルアミノ (PA) 化蛍光標識を行った。次に、試料をフェノール・クロロホルム抽出し、未反応 2-アミノピリジンを除去後、再度セルロースカートリッジに供し PA 化糖鎖を精製した。糖鎖構造の分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を用いた。上記において調製した PA 化糖鎖を陰イオン交換カラムを用いた HPLC に供した (酸性糖の分離・精製)。得られたピークを回収し乾燥後、続いてオクタデシルシリルカラムを用いた逆相 HPLC に供した (中性糖の分離・精製)。同様に得られたピークを回収し、アミノカラムを用いた LC/MS に供して糖鎖の分子量を決定した。更に、MS/MS を行うことで糖鎖構造を解析した。対象実験に野生型 Huh6 細胞を用いることで、糖鎖構造の比較を行った。

糖鎖プロファイルの作成 (BNC の糖鎖構造解析)

十分に乾燥した BNC に対して無水ヒドrazinを添加、100 °C で 10 時間インキュベートすることで糖鎖の切り出しを行った。過剰量のアセトンを追加し、遠心分離により得られた沈殿に対し、飽和炭酸水溶液および無水酢酸を添加することで、糖鎖の N-アセチル化を行った。陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびセルロースカートリッジを利用して糖鎖を精製した。2-アミノピリジンを用いた糖鎖の蛍光標識および HPLC、MS を利用した構造解析は上述した Huh6 細胞糖鎖構造解析の手順に従った。MS 分析については、糖鎖分子量が大きいためマトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS) も使用した。

HBVpp 発現細胞における糖鎖修飾酵素遺伝子の発現量の解析

HBVpp を発現したヒト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細胞より mRNA を抽出し、これを基に合成した cDNA を鋳型として定量 RT-PCR を行った。発現量解析の標的遺伝子として、分岐型糖鎖合成に関わる〈1,6-フコース転移酵素、N-アセチルグルコサミン転移酵素 III および V 各遺伝子を選抜した。

(倫理面への配慮) 本研究課題で使用する研究材料について

は、培養細胞等について一般的なものであり個人情報を含むものは無い。また、遺伝

子組換え実験の対象となるため、実験開始前に大阪大学に組換え実験計画書を提出、承認を得ている。よって、倫理面での問題は無い。

C. 研究結果

HBVpp の構築と精製 抗原認識部位の異なる数種の抗 HBsAg 抗

体を用いてウエスタンブロッティングを行った結果、ヒト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細胞を利用することで培地 1 ml あたり数十~数百 ng 程度の PreS1 および PreS2 領域を持つ HBVpp を生産できた。一方で、精製の課程での HBVpp 喪失量が大いことも判明した。

バキュロウイルスタンパク質組換え生産系では、発現ベクターを形質導入した宿主細胞内において PreS1 領域を保持する HBsAg の生産を認めたが、培地への分泌は確認できなかった。

糖鎖プロファイルの作成 (HBV ゲノム遺伝子を保持するヒト肝癌細胞 Huh6 の糖鎖構造解析)

HB611 と野生型 Huh6 細胞由来全糖タンパク質糖鎖の構造解析を行った。この結果、まず野生型 Huh6 細胞からは、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、マンノース (Man)、ガラクトース (Gal)、シアル酸 (Sia) から成る以下の糖鎖 $\text{Man}_{8-9}\text{GlcNAc}_2$ (71.6%)、 $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (6.8%)、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (1.6%)、 $\text{GalGlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ (1.9%)、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (11.6%)、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ (3.5%)、

Gal₃GlcNAc₃Man₅GlcNAc₂ (1.6%) 、
SiaGalGlcNAcMan₄GlcNAc₂ (1.3%) が得られ
た。これに対し HB611 細胞からは、フコー
ス (Fuc) 結合糖鎖を含む Man₅₋₉GlcNAc₂
(63.1%)、GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂ (1.1%)、
GalGlcNAcMan₅GlcNAc₂ (1.4%) 、
Man₃FucGlcNAc₂ (2.7%) 、
GalGlcNAcMan₃FucGlcNAc₂ (0.9%)、
GalGlcNAcMan₄FucGlcNAc₂ (4.6%)、
GalGlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (2.9%)、
Gal₂GlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (18.8%)、
SiaGal₂GlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (1.8%) が得
られた。HB611 細胞由来の糖鎖からは、Huh6
細胞では見られなかったフコース結合糖鎖
が全体の 31.7%を占める結果となった。

また、他研究分担者が構築した、分岐型
糖鎖を合成する酵素 N-アセチルグルコサ
ミン転移酵素 III および V を過剰生産する
ヒト肝癌細胞 Hep3B 株 (それぞれ
Hep3B-GnT-III および Hep3B-GnT-V)の糖鎖
構造解析を行った。Hep3B-GnT-III 細胞由
来の糖鎖からは、野生型 Hep3B 細胞では見
られなかった bisect 型糖鎖が全糖鎖構造
の中で 5.1%を占め、Hep3B-GnT-V 細胞由来
の糖鎖からは、Hep3B 細胞では僅かに 0.41%
を占めた tri-antenna 型糖鎖が 22.2%まで
増加していることが分かった。

糖鎖プロファイルの作成 (BNC の糖鎖構
造解析)

出芽酵母に見られる典型的なマンノース
を複数保持する糖鎖の存在が確認できた。
ヒトをはじめとするガラクトースやシアル
酸の付加した動物型の糖鎖の存在は認めら

れなかった。

HBVpp 発現細胞における糖鎖修飾酵素遺
伝子の発現量の解析

HBVpp を発現するヒト肝癌細胞由来ウイ
ルスパッケージング細胞から調製した
cDNA を用いて qRT-PCR を行ったところ、
〈1,6-フコース転移酵素、N-アセチルグル
コサミン転移酵素 III および V いずれの遺
伝子についても発現量は野生型細胞と比較
して大きな違いは見られなかった。

D. 考察

in vitro 糖鎖改変には mg オーダーの
HBVpp 量が必要であるため、昨年度よりヒ
ト肝癌細胞由来ウイルスパッケージング細
胞を用いて精製 HBVpp の確保に努めている
が、現状では必要量の調製に時間を有する
と判断した。

これに対して、BNC は酵母を宿主に生産
するためスケールアップが簡便であり、必
要量の確保が容易であると考えられる。BNC
の糖鎖構造を解析した結果、非還元末端に
多数のマンノースを持つ典型的な酵母型の
糖鎖構造を持つことがわかった。このよう
な糖鎖構造は in vitro での糖鎖構造改変が
可能である。以上を踏まえ、次年度以降は
BNC を中心に糖鎖構造の改変を行う予定で
ある。

バキュロウイルス生産系を利用した昆虫
細胞での HBVpp 生産については、HBsAg の
生産を確認できた。次のステップとして、
バキュロウイルス表面に HBsAg が提示され
ているかどうかを検証する。また、HBsAg

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、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

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±2.5%、B型慢性肝炎患者で6.8±4.9%、B型肝硬変患者で5.7±3.1%、B型肝炎患者で8.8±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 copy/ml以上の患者の方が、4 log copy/ml未滿の患者に比してMDSC頻度が有意に低かった(4.2±2.1% vs 7.9±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ールを用いて 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 ± 14 歳、52 ± 15 歳、62 ± 7 歳、63 ± 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 型肝癌患者で $8.8 \pm 5.4\%$ であり、B 型肝癌患者で多い傾向があったが、有意差はなかった (図 2)。B 型慢性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。

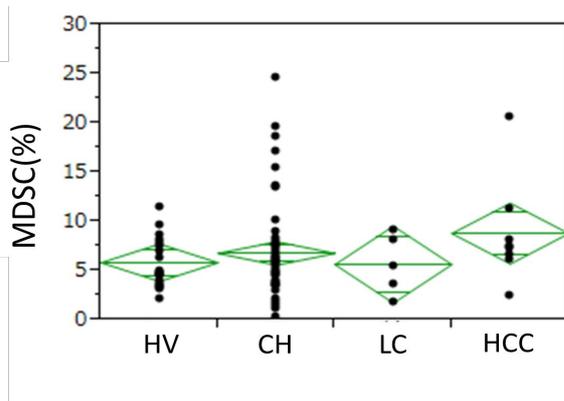


図 2 B 型慢性肝疾患の各群での MDSC 頻度

B 型慢性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。

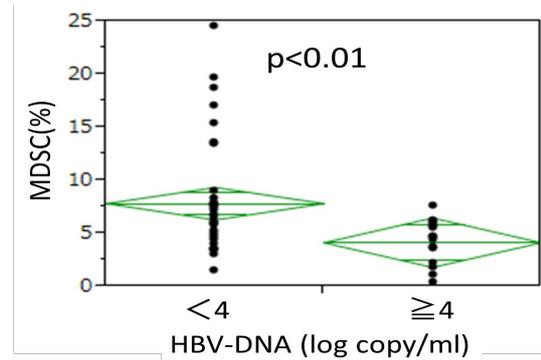


図 3 B 型慢性肝炎患者における HBV-DNA $4 \log \text{ copy/ml}$ 未満と $4 \log \text{ copy/ml}$ 以上の患者での MDSC の頻度の比較

D. 考察

フローサイトメトリーにて $\text{CD33}^+\text{CD11b}^+\text{CD14}^+\text{HLA-DR}^{-/\text{low}}$ 分画の MDSC を同定することが可能であった。健康成人と B 型慢性肝疾患患者において MDSC の頻度の差は認めなかったが、B 型慢性肝疾患患者において 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 型慢性肝炎では、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 型慢性肝炎での MDSC の動態は C 型慢性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 -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

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 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 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- γ 、IFN- α 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- α 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- γ 、IFN- α 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- γ 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- γ 、

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-
L 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

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 大阪大学大学院医学系研究科 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 タンパク量と関連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を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パーサドメインを 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 10µg 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