

201423031A

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

# B型肝炎ウイルスの感染複製機構の 解明に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成27（2015）年 3月

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

# B型肝炎ウイルスの感染複製機構の 解明に関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 脇田 隆字

平成27（2015）年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究の総括 . . . . . 3  
脇田 隆字

### II. 分担研究報告

1. B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明の総括 . . . . . 23  
脇田 隆字
2. HBV 起因性肝癌のゲノム変異と分子機構の解明 . . . . . 28  
朝比奈 靖浩
3. HBV ゲノムの核内維持機構の解析 . . . . . 32  
有海 康雄
4. 創薬を目指した HBV 感染による肝線維化メカニズムの解明 . . . . . 36  
五十川 正記
5. HBV preS 領域変異の解析 . . . . . 41  
榎本 信幸
6. HBx タンパク質と相互作用する細胞側因子の同定 . . . . . 44  
岡本 徹
7. 患者血清由来株を用いた HBV 複製系による薬剤感受性の評価 . . . . . 47  
加藤 孝宣
8. HBx の組込み様式とその機能解析 . . . . . 50  
加藤 直也
9. HBV タンパク質に結合する環状ペプチドの探索 . . . . . 54  
菅 裕明
10. HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析 . . . . . 56  
鈴木 哲朗

11. HBV の増殖機構におけるオートファジーの影響	59
巽 智秀	
12. B 型肝炎ウイルスの根治的排除を目指した iPS 細胞製剤の開発	63
谷口 英樹	
13. HBV ゲノムを誘導発現可能なマウスモデルの作成と解析	67
千葉 勉	
14. HBV 逆転写酵素の生化学的研究と阻害剤開発のためのハイスループットスクリーニング系の開発	72
豊田 哲哉	
15. ウイルスタンパク質および関与する宿主因子の構造解析	74
朴 三用	
16. カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬の同定と開発	77
馬場 昌範	
17. B型肝炎ウイルスタンパク質と相互作用する宿主タンパク質の構造と機能の解析	83
堀田 博	
18. HBV 肝炎により誘導される宿主因子の網羅的プロテオーム解析	90
森川 賢一	
19. HBV タンパク質の発現、酵素活性および結合因子の解析	94
梁 明秀	
20. 培養系および in vitro 系を用いた HBV 感染複製阻害剤の探索	98
渡士 幸一	
21. Mechanism underlying containment of HBV replication in chronic HBV-infection	106
Akbar Sheikhmohammadfazole	
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	<b>113</b>

# I . 総括研究報告

## B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究代表者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆字

研究要旨： B型肝炎は逆転写酵素阻害剤が臨床に導入されて抗ウイルス療法が可能となった。しかし、逆転写酵素阻害剤単剤の治療ではウイルス排除に向けた根治は困難で、ウイルス量の制御のために抗ウイルス薬を中止することも難しい。さらに薬剤耐性ウイルス出現のリスクがある。従って、多くのB型肝炎ウイルスキャリアの治療法開発、改善のために新たな抗B型肝炎ウイルス治療薬の開発が望まれている。しかし、B型肝炎の基礎研究は必ずしも進んでいない。

そこで本研究ではB型肝炎の新規治療薬開発に向けて、ウイルスの感染複製増殖機構の解明を目指す。B型肝炎ウイルスは標的細胞の表面に吸着した後、細胞内へ侵入し、そのヌクレオキャプシドが核へ運ばれる。核内でヌクレオキャプシド内の不完全二重鎖 DNA が完全二重鎖となり、いわゆる cccDNA となる。cccDNA からは複数のウイルス RNA が転写され、転写された RNA から翻訳されるコアタンパクが形成するキャプシドに pregenomic RNA が逆転写酵素と共にパッケージングされ、ヌクレオキャプシドを形成する。pregenomic RNA はキャプシド内でマイナス鎖 DNA に逆転写され、さらにプラス鎖 DNA が合成され不完全二重鎖 DNA となる。ヌクレオキャプシドは HBs 抗原を表面に持つエンベロープを被り、ウイルス粒子が完成して細胞外へ分泌される。このウイルスの生活環の各過程を詳細に検討し、関与する宿主因子の同定などを通じてそのメカニズムを解明する。さらに、各過程の解析から新たな抗ウイルス薬標的を同定する。本研究班はB型肝炎研究の基盤を支える若手研究者を育成し、他のB型肝炎創薬研究班との連携を進める。

研究分担者 朝比奈 靖浩  
東京医科歯科大学  
教授

研究分担者 有海 康雄  
熊本大学エイズ学研究センター  
准教授

研究分担者 五十川 正記  
名古屋市立大学  
特任助教

研究分担者 榎本 信幸  
山梨大学大学院  
教授

研究分担者 岡本 透  
大阪大学微生物研究所  
助教

研究分担者 加藤 孝宣  
国立感染症研究所  
室長

研究分担者 加藤 直也  
東京大学大学院  
准教授

研究分担者 菅 裕明  
東京大学大学院  
教授

研究分担者 鈴木 哲朗  
浜松医科大学医学部  
教授

研究分担者 巽 智秀  
大阪大学大学院  
講師

研究分担者 谷口 英樹  
横浜市立大学  
教授

研究分担者 千葉 勉  
京都大学大学院  
教授

研究分担者 豊田 哲也  
長寿医学研究所  
副所長

研究分担者 朴 三用  
横浜市立大学  
教授

研究分担者 馬場昌範  
鹿児島大学大学院  
教授

研究分担者 堀田 博  
神戸大学大学院  
教授

研究分担者 森川賢一  
北海道大学大学院  
助教

研究分担者 梁 明秀  
横浜市立大学医学部  
教授

研究分担者 渡士 幸一  
国立感染症研究所  
主任研究官

研究分担者 Akbar Sheikhmohammadfazole  
東芝病院研究部  
主任研究員

## A. 研究目的

HBV に対する新規治療薬開発に向けて、HBV 感染複製増殖機構の解明を目指す。ウイルスの生活環の各過程を網羅的かつ詳細に検討し、関与する宿主因子の同定などを通じてそのメカニズムを解明する。さらに、各過程の解析から新たな抗ウイルス薬標的を同定する。下記の研究項目について研究を進める。

1. ウイルス生活環各ステップを制御する因子の同定とその分子メカニズム解析、
2. 初期感染過程（ウイルス吸着から侵入、核への輸送）の解析、
3. cccDNA 転写機構、ウイルスゲノムインテグレーション機構、ウイルスゲノム複製機構の解析、
4. ウイルス構造蛋白質、逆転写酵素の発現、酵素活性、構造の解析、
5. ウイルス粒子形成および分泌機構の解析、
6. PreS 抗原、HBc 抗原、HBx 抗原の発現、機能、構造の解析、の研究を実施する。また、各分担研究者の研究を支援し、班内および他の班との共同研究を実施する。

## B. 研究方法

### 1. HBV cccDNA アッセイの構築（脇田）

テトラサイクリン誘導 HBV 発現細胞の Hep38.7-Tet 細胞 にテトラサイクリン非存在下で siRNA Library（約 1000 遺伝子：DNA damage response library、Epigenetic library、Nucleic acid binding library）を 6 日間処置後、テトラサイクリン添加培地に交換し、さらに 6 日間培養後の細胞外 HBeAg 量を ELISA 法（1<sup>st</sup> スクリーニング）により、細胞内 cccDNA 量を Real-time PCR 法（2<sup>nd</sup> スクリーニング）により解析した。

### 2. HBV 起因性肝癌のゲノム変異と分子機構の解明（朝比奈）

2001 年以降に肝細胞癌に対して手術を行い、臨床的背景因子、無再発生存期間、生存期間等の各種臨床データが明らかである 104 例を対象とした。腫瘍部および肝臓の非腫瘍部をペアとした DNA サンプルから癌関連 50 遺伝子の 2790 箇所の Hotspot をターゲットとした。HBs 抗原陽性 27 例の癌部における HBV integration についてヒトと HBV ゲノムの junction を含むデータを抽出した

### 3. HBV ゲノムの核内維持機構の解析（有海）

標的宿主因子をノックダウンした HBV 恒常的複製細胞 HepG2.2.15.7 細胞や HBV 感染レセプター-NTCP を発現させた HepG2-NTCP 細胞を用いて、細胞内 HBc 発現レベルを解析した。細胞内 HBV キャプシド内 HBV DNA 量を

定量解析した。培養上清中 HBs 抗原量、HBV DNA 量を解析した。293T 細胞に FLAG-HBc 及び HA-MOV10 発現プラスミドをコトランスフェクションし、48 時間後に細胞を固定後、HBc と MOV10 の細胞内局在を観察した。細胞を RIPA バッファーで可溶化した。

### 4. 創薬を目指した HBV 感染による肝線維化メカニズムの解明（五十川）

HepAD38 細胞を用いて、ウイルス複製が細胞内ストレス誘導するかを検討した。テトラサイクリン 除去後 6 日後から 10 日後まで細胞外 HBV DNA 量、HBe 抗原量、S 抗原量を測定し、細胞内 ER ストレス、ROS との関連が報告されている GRP78、IRE1、XBP、eIF2 $\alpha$ 、ATF4、AFT6 の発現を定量した。HBV 遺伝子型 A、B 及び C 由来の X 抗原もしくは S 抗原を発現するプラスミドを作製した。これらプラスミドを Huh-7 細胞に導入し、その 3 日後にストレス関連遺伝子の発現を定量し、X 抗原もしくは S 抗原の強制発現が ER ストレス、ROS を誘導するかを検討した。

### 5. HBV preS 領域変異の解析（榎本）

B 型肝炎のウイルス量が 4 未満で肝炎の活動性が臨床的に認められないキャリア群 (Inactive carrier)32 例、慢性肝炎群(CH)28 例、肝硬変・肝癌群(LC/HCC)36 例における血清から preS 領域の deep sequence を行い、HBs 抗原量、HBcr 抗原量を含めて、臨床的関連性について検討した。

### 6. HBx タンパク質と相互作用する細胞側因子の同定（岡本）

OSF タグを付加した HBx タンパク質を 293T 細胞に発現させ、ストレプトタグビーズを用いて、HBx 結合タンパク質を精製し、質量分析によって、網羅的にタンパク質を同定した。その中で、ヒストン脱メチル化に関与する JMJD5 に注目し、その結合を免疫沈降法及び酵母ツーハイブリッド法で確認した。さらに、JMJD5 ノックダウン細胞を作製し、培養上清中に放出される HBV のゲノム量を定量的 PCR によって検討を行った。また、HBx 発現細胞での JMJD5 の細胞内局在を調べた。

### 7. 患者血清由来株を用いた HBV 複製系による薬剤感受性の評価（加藤孝宣）

過去に核酸アナログ投与歴のない ETV 治療中の症例で、投与中に HBV DNA が再上昇した症例、投与開始から 1 年以上経過後も HBV DNA の陰性化が見られなかった症例、HBV DNA が一度陰性化したが一過性に上昇しその後自然の経過で陰性化した症例の 3 例



について検討を行った。同定された RT 領域の変異を有する 1.4 倍長の HBV ゲノム配列の複製モデルコンストラクトを作製した。作製したコンストラクトを HepG2 細胞に導入し、HBV 複製能と薬剤感受性の評価を行った。

8. HBx の組み込み様式とその機能解析 (加藤直也)

グローバルデータベースより HBV X 遺伝子シークエンスを抽出し、HBV X 遺伝子の肝癌関連変異の解析を行った。統計学手法としては  $\chi^2$  検定、ロジスティック回帰を用いた。

HBx を Huh7 細胞に発現させ、SRE、SRF、CRE、NF- $\kappa$ B、NF-AT、AP-1、Wnt/ $\beta$ -catenin 各シグナル伝達経路の活性化を検討した。

9. HBV タンパク質に結合する環状ペプチドの探索 (菅)

独自に開発した RaPID (Random non-standard Peptide Integrated Discovery) システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてる。

10. HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析 (鈴木)

HuH-7 細胞由来 total RNA から作製した cDNA を基に各 PRE 結合因子の cDNA を増幅しクローニングした。各 PRE 結合因子を発現するプラスミドを作製した。得られた発現プラスミドを、1.24 倍長の HBV ゲノム含プラスミドと同時に HuH-7 細胞へトランスフェクションし 72 時間後に細胞トータル RNA 及び細胞、上清タンパク質を回収した。pgRNA 量を RT-qPCR で評価、細胞及び上清中の HBs 抗原をウェスタンブロットにより検出した。PRE 結合因子の siRNA を HuH-7 細胞へ導入し、36 時間後に HBV ゲノムプラスミドを導入した。さらに 24 時間培養後、細胞からトータル RNA を抽出し pgRNA 量、HBs 抗原を上記のように解析した。

11. B 型肝炎ウイルスの増殖機構におけるオートファジーの影響 (巽 智秀)

HBV 感染によるオートファジーの変化を検討するため、HBV 感染可能 NTCP 強制発現 HpeG2 細胞株を作成した。また HBV がより効率よく持続感染する細胞として、ヒト肝細胞 TK-NOG マウスの初代培養肝細胞を単離し、使用した。感染材料として、HepG2.2.15 細胞の培養上清もしくは、HBV 遺伝子を 1.2-mer タンデムに繋いだ発現プラスミドを HepG2 細胞にトランスフェクした細胞の培養上清を濃縮することにより HBV を作成した。また、患者血清由来の HBV も使用した。

12. B 型肝炎ウイルスの根絶的排除を目指し

た iPS 細胞製剤の開発 (谷口)

肝発生の初期プロセスに必須である肝内胚葉細胞と未分化血管内皮細胞と間葉系幹細胞との細胞間相互作用に着目し、前腸からの肝芽の出芽を人為的に再現した。この手法によりヒト iPS 細胞から分化誘導した肝内胚葉細胞を血管内皮細胞および間葉系幹細胞と共培養することにより、iPS 肝芽の作成に成功した。平成 26 年度はヒト iPS 肝芽の移植部位を検討した。免疫不全マウスの頭蓋、腎被膜、遠位腸間膜、近位腸間膜への移植手技を確立する。各移植部位における iPS 肝芽の機能解析を主として分泌するヒトアルブミンを指標として行う。iPS 肝芽が生体内で成熟した肝組織に分化することを検証するため、移植前の分化誘導前の iPS 細胞、iPS 肝芽、移植後 40 日の iPS 肝芽、および成人肝組織の 4 群で microarray および RT-PCR を用いて比較検討を行う。ヒト iPS 細胞を対象とし、EGFP 遺伝子をターゲットとした TALEN 法の作動性検証を行う。

13. HBV ゲノムを誘導発現可能なマウスモデルの作成と解析 (千葉)

任意の時期に肝細胞に B 型肝炎ウイルス全タンパク質を発現し、肝炎としての免疫応答を惹起する新規モデルマウスの作成を行った。ウイルスタンパク質の発現誘導効率のよい 1 ラインを用いて肝組織における免疫応答遺伝子の発現プロファイル解析を行った。免疫応答の成熟した成体マウスの肝組織に HBV タンパク質を特異的に発現するモデルとして、マウス尾静脈からの hydrodynamic injection 法を利用したモデルの構築を行った。マウス肝細胞内でのプラスミドからの転写発現を効率的かつ長期間維持する目的で、人為的に CpG サイトを失活させた親ベクターに HBV タンパク質をコードする遺伝子配列を挿入した新しい発現誘導ベクターを構築し、野生型マウスへの hydrodynamic injection 投与を実施した。

14. HBV 逆転写酵素の生化学的研究と阻害剤開発のためのハイスループットスクリーニング系の開発 (豊田)

従来の RT、RNase H ドメインよりも長い N 末を持つ RT303RNaseH と RNaseH681 を作成した。HBV 逆転写酵素活性の解析では、pH、塩濃度(NaCl、MgCl<sub>2</sub>、MnCl<sub>2</sub>)、鋳型(DNA、RNA)、FITC-プライマー、FITC-基質の検討を行った。

15. ウウイルスタンパク質および関与する宿主因子の構造解析 (朴)

HBV DNA ポリメラーゼは機能ドメインとして TP(protein priming)、RT(Reverse Transcriptase)、RH(RNaseH)ドメインに分けることが出来る。各ドメインを TP200、RT、RH および RT と RH ドメインを結合した RTRH-303-784 とし、蛋白質発現用プラスミド pET28 に組み込んだ。

NTCP の遺伝子を増幅し、C 末端に TEV プロテアーゼサイトと His タグを持つようにした蛋白質発現用プラスミド pET28 に組み込んだ。同時に、大腸菌コドン最適化し全合成を行った NTCP を同様に pET28 に組み込み、蛋白質発現を試みた。大腸菌無細胞蛋白質発現系も行った。

HBV S 蛋白質の S-1-48 残基目までを HBV の遺伝子配列から増幅し、蛋白質発現用プラスミド pET28 に組み込んだ。同時に大腸菌コドン最適化を行った S-1-48 を組み込んだプラスミドも作成した。

16. カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬の同定と開発 (馬場)

*In silico* スクリーニングにより選抜したリード化合物は、HepG2.2.15.7 細胞を用いて、抗 HBV 効果について検討した。また、カプシド蛋白形成阻害効果について検討した。

17. B型肝炎ウイルスタンパク質と相互作用する宿主タンパク質の構造と機能の解析 (堀田)

Prdx1 及び SMYD3 の HBx との相互作用を解析した。両者の結合や細胞内共局在について、免疫共沈法、PLA 法及び免疫蛍光共焦点顕微鏡法を用いて解析した。Prdx1 のノックダウンあるいは過剰発現による影響を解析した。HBV 複製細胞における HBV pgRNA の発現量を、特異的プライマーを用いた定量 RT-PCR 法により測定した。また、HBV/HBx 依存的酸化ストレス応答に及ぼす Prdx1 の影響を解析した。HBx 及び SMYD3 の NF- $\kappa$ B 及び JNK 経路に及ぼす影響を解析した。

18. B型肝炎ウイルス肝炎により誘導される宿主因子の網羅的プロテオーム解析(森川)

HBV 蛋白発現調整細胞株を樹立する。HBV 蛋白非発現群と発現群を SILAC 法にて標識しプロテオーム解析により比較検討し、HBV により誘導される宿主因子を検討する。

19. B型肝炎ウイルスタンパク質の発現、酵素活性および結合因子の解析(梁)

HBV 産生過程における Tetherin の阻害活性を解析した。その細胞の電子顕微鏡観察を行った。Tetherin と HBs の相互作用を免疫沈降によ

って解析した。NF $\kappa$ B 活性化について解析した。

20. 培養系および *in vitro* 系を用いた HBV 感染複製阻害剤の探索(渡士)

AlphaScreen により NTCP-LHBs 結合阻害化合物を同定した。一次スクリーニングとして His-NTCP と bio-LHBs を用いた AlphaScreen、二次スクリーニングでは bio-His から定常的に発するシグナルを低下させる化合物を除いた。三次スクリーニングでは HepG2-hNTCP-C4 細胞と preS1 ペプチドとの吸着を評価した。さらに四次評価において HBV の HepG2-hNTCP-C4 細胞への感染を調べた。RAPID システムにより得られた NTCP 結合特殊環状ペプチドと化合物アレイにより得られた NTCP 結合化合物の HBV 感染抑制効果も同様に解析した。

21. Mechanism underlying containment of HBV replication in chronic HBV-infection (アケバル)

The study was conducted in patients with CHB expressing HBsAg in sera for more than 6 months, elevated ALT, and evidences of increased hepatic fibrosis compatible with chronic liver damages (confirmed by fibroscan). Patients with CHB were injected with therapeutic vaccines containing HBsAg/ HBcAg (100 micrograms of each antigen) 5 times by nasal route at an interval of 2 weeks. Another group of CHB patients received pegylated interferon (Peg-IFN), once a week for 48 consecutive weeks. Kinetics of HBV DNA and ALT were evaluated in the sera.

(倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究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、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

また、ヒト初代培養肝細胞は、京都大学附属病院移植外科においておこなわれた先天性代謝異常症患者への生体肝臓移植において切除された患者肝臓組織を用いて作成されたものである。この研究はあらかじめ京都

大学医学部医の倫理委員会に申請し、審査の後に承認されたものである。肝臓や血液提供者へのインフォームドコンセントや個人情報の管理は上記委員会の規定通りにおこなわれており、倫理面に関する問題はない。

### C. 研究結果

#### 1. HBV cccDNA アッセイの構築 (脇田)

siRNA Library の 1<sup>st</sup> スクリーニングより、HBsAg 分泌阻害が 50%以上を示した 42 遺伝子を見出した。次に細胞より抽出した HBV DNA を用いて cccDNA 合成阻害を qPCR 法で検討した結果、cccDNA 合成阻害が 40%以上を示した 21 遺伝子 (DNA damage response library から 1 遺伝子、Epigenetic library から 4 遺伝子、Nucleic acid binding library から 16 遺伝子) を選抜した。

#### 2. HBV 起因性肝癌のゲノム変異と分子機構の解明 (朝比奈)

検出された Hotspot 変異のうち肝臓の非腫瘍部に認められなかった変異を体細胞変異とした。93 検体中 9 遺伝子で変異を認め、TERT promoter 68 例(65%)、TP53 37 例(36%)、CTNNB1 31 例(35%)、PTEN 2 例(2%)、CDKN2A 2 例(2%)、HRAS 1 例(2%)、PIK3CA 1 例(2%)、STK11 1 例(2%)、GNAS 1 例(1%)、NFE2L2 1 例(1%)であった。TERT promoter 変異は高齢( $p=0.017$ )、HCV 感染( $p=0.0026$ )、non-HBV 感染( $P<0.0001$ )、TP53 変異は HBV 感染( $p=0.0026$ )、non-HCV 感染( $p=0.0014$ )、CTNNB1 変異は non-HBV 感染( $p=0.010$ )と有意に関連があった。さらに TERT promoter 変異は有意に無再発生存期間( $p=0.010$ )、生存期間( $p=0.048$ )が短かった。HBV integration は 27 例中 25 例(92.6%)78 か所で検出された。HBV 側では HBx 遺伝子が存在する領域の挿入が 34 例(44%)と多く、ヒト側では TERT 9 例、MLL4 2 例、MYO7A 2 例であった。HBV 感染患者において TERT プロモーターの hotspot 変異と TERT 領域への integration は相互排他的であり、HBV 感染において 18 例(64%)に TERT 領域の変化を認めた。さらに TERT 領域へ挿入された HBV の 78%(7/9)は HBx 遺伝子であった。

#### 3. HBV ゲノムの核内維持機構の解析 (有海)

HepG2-NTCP 細胞に TRIM11 と HBV 遺伝子を発現させると、コントロールに比べ、HBV capsid 結合 DNA が抑制した。TRIM11 をノックダウンした HepG2.2.15.7 細胞では、コントロール細胞に比べ、細胞内の HBV capsid 結合 DNA レベルが増加した。TRIM11 を発現させると HBV pgRNA レベルが減少した。さらに HBV コアタンパク質は TRIM11 を発現させて

も分解されないことが判明した。

HBV と 6 種の PML isoform の PML I~PML VI を共発現させると PML I、II、IV に強い抗 HBV 活性が確認された。

DDX3、DDX6、MOV10 RNA ヘリケース、APOBEC3G と HBV を共発現させると、MOV10 は細胞内の HBV capsid 結合 HBV DNA を抑制した。DDX3 及び APOBEC3G は HBV 複製レベルを抑制したが、DDX6 は HBV 複製レベルには影響を与えなかった。MOV10 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べて、細胞内 HBV capsid 結合 DNA レベルが増加した。さらに MOV10 と HBc を細胞に共発現させると、細胞質で共局在が観察された。また、免疫沈降法により、MOV10 は HBc と結合することが判明した。

#### 4. 創薬を目指した HBV 感染による肝線維化メカニズムの解明 (五十川)

HBV 複製の誘導に伴って ER stress 関連遺伝子である IRE1、Grp78、eIF2a の発現誘導が認められた。一方で、PERK、ATF6 の優位な発現上昇は認めず、ATF4、XBP1 では逆に HBV 複製誘導により発現の抑制が認められた。これらの結果は、HBV pgRNA 発現もしくはそれに伴う HBV DNA 複製により、細胞内ストレス、特に ER ストレスが誘導されるということを示唆している。しかし、HBV 由来 S 抗原、X 抗原の Huh-7 における発現ではストレス関連遺伝子の発現は認められなかった。

#### 5. HBV preS 領域変異の解析 (榎本)

LC/HCC 症例では HBs 抗原低値かつ HBcr 抗原高値であった。HBs 抗原低値 かつ HBcr 抗原高値となる乖離症例には preS 変異が有意に多く認められ、乖離における preS 変異の関与が示唆された。一方、非活動性キャリア(IC)では HBs 抗原、HBcr 抗原、preS 変異率ともに低値であり cccDNA 自体が減少していることが考えられた。

#### 6. HBx タンパク質と相互作用する細胞側因子の同定 (岡本)

JMJD5 が HBx と相互作用する新規のタンパク質として同定された。JMJD5 は HBx と酵母内でも相互作用が確認され、HBx タンパク質の 75-94 アミノ酸と結合した。HepG2.2.15 細胞の JMJD5 の発現を shRNA でノックダウンさせると、培養上清中のウイルスゲノム量が有意に低下することから、JMJD5 は HBx タンパク質と相互作用して HBV 複製に関与することが示唆された。また、HBx は主に細胞質に局在しているが、

JMJD5 は核に局在する。HBx 発現細胞では、JMJD5 は核から細胞質に局在を変えることが示された。

7. 患者血清由来株を用いた HBV 複製系による薬剤感受性の評価 (加藤孝宣)

RT 領域のダイレクトシーケンスの結果、3 症例とも既報の RT 領域の ETV 耐性変異は検出されなかったが、その他の部位に変異を認めた。(症例 1) rtV173L, rtL180M, rtM204V のラミブジン耐性変異。(症例 2) rtI122L, N123H の変異。(症例 3) rtV191I. ETV 感受性不良に関与している可能性がある変異を持つ 1.4 倍長のコンストラクトと、その変異を wild-type に戻した配列を持つコンストラクトを作製した。これらを HepG2 細胞に導入し、導入細胞を ETV で処理した後、サザンブロット法および RTD-PCR 法で評価した。

その結果、rtV173L, rtL180M, rtM204V の変異を有する株は ETV 感受性が不良であった。rtI122L, N123H の変異を有する株は複製能および ETV 感受性に差を認めなかった。rtV191I の変異を有する株は高い複製能を認めたが ETV に対する感受性は同等であった。

8. HBx の組み込み様式とその機能解析 (加藤直也)

グローバルデータベースから 5,956 の HBx シークエンスをダウンロードし、肝癌グループと非肝癌グループ間で有意に異なる 16 塩基を見出した。ロジスティック回帰分析により肝癌と関連する 7 塩基変異、A1383C、A1479C/T、C1485T、C1631T、C1653T、G1719T、T1800C を抽出した。7 塩基変異中、5 塩基変異はアミノ酸変異を伴うものである。肝癌リスクと関連した HBx の変異は、主に HBx の transactivation domain、ウイルスプロモーター、蛋白質/microRNA 結合領域、あるいは免疫エピトープに存在した。

HBx 発現 Huh7 細胞で SRE、SRF、CRE、NF- $\kappa$ B、NF-AT、AP-1、Wnt/ $\beta$ -catenin 各シグナル伝達経路の活性化を検討した HBx は NF- $\kappa$ B を約 3.2 倍と最も活性化した。そこで NF- $\kappa$ B レポーターを恒常的に保持する Huh7 細胞で HBx をテトラサイクリンで発現する細胞を樹立した。この細胞にテトラサイクリンを加え、NF- $\kappa$ B を活性化、そこに FDA 承認薬を添加し、HBx の NF- $\kappa$ B 転写活性化を抑制する薬剤を同定した。その一つは Dobutamine であった。Dobutamine は I $\kappa$ B を安定化して、NF- $\kappa$ B を抑制することが報告されている (Loop et al. Anesth Analg 2004)。したがって、Dobutamine の本作用は NF- $\kappa$ B 特異的で HBx 特異的ではな

いと考えられる。現在、HBV 複製・増殖や cccDNA への作用を検討中である。

9. HBV タンパク質に結合する環状ペプチドの探索 (菅)

NTCP タンパク質を標的とした特殊ペプチドの RaPID 探索を進めた。その結果、多数の結合リガンド特殊ペプチドの獲得に成功し、さらに個々のペプチドの NTCP への結合活性を RaPID システムで検討した結果、10 種類の候補化合物に絞り込んだ。それらを個別に化学合成し、共同研究者である脇田研究チームに提供し、その阻害活性を検討した結果、5 種類の特殊ペプチドにおいてポジティブコントロールのシクロスポリン A (CsA) に匹敵する活性を持っていることが判明した。さらに、副作用の原因となりうるトランスポーター阻害の有無を検討した結果、2 種類の特殊ペプチドはトランスポーター阻害を示さないことがわかった。

10. HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析 (鈴木)

これまでに、HBV の PRE RNA に結合する核タンパク質 23 種類を同定している。HBV 増殖に関与するかを HBV ゲノム複製細胞への siRNA 導入実験で調べ、ノックダウンによって HBV プレゲノム RNA レベルが有意に亢進する因子として AUF1 (AU-rich element binding factor 1)を見出した。また、AUF1 発現によってプレゲノム RNA の分解が促進されることが示された。in vitro で AUF1 及び PRE RNA をそれぞれ合成し、化学増幅型ルミネッセンスアッセイ Alpha によって相互作用解析を行った。AUF1 は PRE RNA と直接結合しうることが明らかとなった。

11. B型肝炎ウイルスの増殖機構におけるオートファジーの影響 (巽 智秀)

HepG2-hNTCP-C4 細胞株を用いて、1 細胞あたりを HBV 1000-20000 ゲノムコピー接種した。7 日後に cccDNA の検出とともに 20000 ゲノムコピーでは免疫染色では、ほぼすべての細胞で PreS1 が陽性となり HBV がほぼすべての細胞に感染していることを確認した。そこで、この細胞を用いて HBV 感染によるオートファジーの評価を行った。オートファゴゾームの指標となる LC3-II とオートファジー特異的に分解される p62 を検討した。HBV 接種後 7 日の細胞では、LC3-II が亢進した。また mRNA レベルで p62 は蛋白レベルで減少した。HBV 感染により肝細胞のオートファジーは亢進すると考えられた。

ヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスから単

離した初代培養肝細胞に、1細胞あたり500ゲノムコピーのHBVを接種した。上清中に持続してHBs及びHBe抗原を検出することができ、HBV-DNAの検出も1か月以上検出可能であった。HBV接種後16日後にsiRNAを投与しRubicon及びAtg7を抑制して、それぞれオートファジーを抑制促進もしくは抑制させた。siRNA投与後3日目にpregenome RNAはRubiconノックダウンにて低下し、Atg7ノックダウンにて増加した。また上清中のHBs抗原もRubiconノックダウンにて低下し、Atg7ノックダウンにて増加した。このことから、感染肝細胞のオートファジーの亢進によりHBV複製・増殖は抑制され、オートファジーの抑制によりHBV複製・増殖は亢進されると考えられた。

#### 12. B型肝炎ウイルスの根治的排除を目指したiPS細胞製剤の開発(谷口)

iPS肝芽を免疫不全マウスの頭蓋、腎被膜下、遠位腸間膜、近位腸間膜に移植し、それぞれ生着を確認した。各移植部位におけるヒトアルブミン分泌量を検討した。腎被膜および近位腸間膜に移植した際のヒトアルブミン分泌量が高いことが分かった。また、近位腸間膜に移植したiPS肝芽からは移植後40日程度まで分泌されるヒトアルブミンが漸増することから、*in vivo*においてもiPS肝芽が成熟肝組織に分化していることが考えられた。移植前のiPS肝芽、近位腸間膜に移植後40日のiPS肝芽および成人肝組織の3群の肝臓関連遺伝子群をmicroarrayにて網羅的に解析した。移植後40日のiPS肝芽の遺伝子発現パターンは移植前のiPS肝芽と比較してより成人の肝組織に類似したパターンとなっていた。いずれの遺伝子も移植前のiPS肝芽と比較して、移植後のiPS肝芽の遺伝子発現量が著明に高く、ほぼ成人の肝組織に匹敵した。これらの結果からiPS肝芽は生体内で分化誘導され、成熟した肝組織に近づいていくことが示唆された。ヒトiPS細胞を対象として、TALEN法の作動性検証を行った。ヒトにおいて恒常的に活性化を受けているとされるゲノム領域を標的として、EGFP遺伝子のノックインを実施したところ、選択的な遺伝子置換が確認された。遺伝子導入されたiPS細胞を肝細胞へと分化誘導し、分化誘導過程におけるEGFP発現の変化を検討したところ、iPS細胞を肝細胞に分化誘導してもEGFPの発現が持続されることが確認された。

#### 13. HBVゲノムを誘導発現可能なマウスモデルの作成と解析(千葉)

薬剤誘導性にHBV全タンパク質を肝細胞に発

現する肝炎モデルマウスとして3種類のF0マウスラインを確保し、1つのマウスラインで薬剤誘導によるHBV RNA発現がもっとも顕著に誘導された。しかし、HBVタンパク質発現誘導1週間~2週間後のマウス肝組織には明らかな炎症細胞浸潤を認めず、血液検査にても肝酵素の上昇は軽微であった。同じ肝組織には、HBV抗原タンパク質発現後、インターフェロン下流遺伝子の発現が誘導されていた。以上の結果から、肝細胞へのHBVタンパク質発現により惹起される自然免疫応答は非常に微弱であるものと推定された。そこで、あらかじめHBV抗原タンパク質による免疫刺激を行った同モデルマウスで同様の検討を行ったところ、肝細胞へのHBV抗原発現後に惹起される肝障害が顕在化する傾向にあった。HBV抗原発現前後の遺伝子発現プロファイル変化を検討する目的で、マイクロアレイ解析を実施した。HBVタンパク質発現への応答として、細胞障害性T細胞誘導に関連したケモカインとその受容体分子の発現が誘導された。

CpGサイトを失活させたベクターによりHBs抗原タンパク質発現ベクターを作製し、マウスにhydrodynamic injection投与を行った。経時的に血中HBs抗原量は、ベクター投与1週間後の血中に高いHBs抗原価が検出されていることがわかった。また、あらかじめHBs抗原タンパク質により免疫刺激を行ったマウスへHBs発現ベクターにhydrodynamic injection投与を行った場合には、HBs抗原刺激により血中のHBs抗体価が急上昇することが確認された。そこで、このHBs抗原の一過性発現モデルを用いて、肝組織に惹起される免疫応答遺伝子の発現プロファイル解析を、マイクロアレイを用いて行ったところ、薬剤誘導モデルと同様に、細胞障害性T細胞誘導に関連したケモカインネットワークの活性化が誘導された。

#### 14. HBV逆転写酵素の生化学的研究と阻害剤開発のためのハイスループットスクリーニング系の開発(豊田)

RT303RNaseHの逆転写反応の最適条件を決定した。HBV逆転写は塩基性、低塩濃度、Mg依存性であり、Mn非依存性であった。polyA 2 mg/mLを鋳型とした場合、蛍光プライマーFITC-dT15を用いても、dT20プライマーと蛍光基質FITC-dUTP (50 mM)を用いても、高分子逆転写物を検出した。なお、逆転写活性をノックアウトしたYMHDでは逆転写物は検出できなかった。また、DNA鋳

型依存性の DNA 合成も確認できた。TP、RT、RNaseH681 を 6M guanidine で可溶化し、HisTrap にて精製した。TP は 8 M urea→2 M urea→0.5 M NaCl と段階的に変性剤を除いた。RT、RNaseH681 は NV10 存在下で透析により変性剤を除いた。これらの酵素活性は極めて低かったが、結合する阻害薬のスクリーニングに用いることはできる。

#### 15. ウイルスタンパク質および関与する宿主因子の構造解析 (朴)

各種大腸菌、蛋白質発現条件で HBV DNA ポリメラーゼ発現は確認できたが、可溶性画分として得る事は出来なかった。不溶性画分に大量に目的蛋白質を得る事が出来たのでリフォールディングを試みた。不溶性画分をよく洗浄し 6M グアニジン塩酸塩で可溶化を行った。可溶化後サンプルに、リフォールディング試薬として、DDM、LDAO、NV-10 を添加し、6M→4M→2M→1M→0M グアニジン塩酸塩となるように段階的透析法でリフォールディングを行った。DDM および LDAO においては、段階的透析している際に白色沈殿として沈殿した。NV-10 に関しては、段階的透析法の間には白色沈殿は得られなかった。透析法で得られたサンプルをゲルろ過にかけたところ、分子量 100 kDa 以上の分子量を持つと計算された。

C 末端に TEV プロテアーゼサイトと His タグを持つようにした蛋白質発現用プラスミド pET28 に NTCP を組みこみ、培養を行い、Ni-NTA カラムを用いた粗精製を行ったが発現を確認する事が出来なかった。大腸菌コドン最適化を行った遺伝子でも同様に試したが、大腸菌を用いた蛋白質発現系では発現を確認できなかった。無細胞系蛋白質発現系では、MALDI-TOF マスによる分子量測定を行ったところ、NTCP の理論値に非常に近いピークを得られた事から、大腸菌系無細胞蛋白質発現系を用いた蛋白質発現において NTCP の発現を確認できた。

HBV の遺伝子配列の S-1-48 残基目までを挿入したプラスミドでは、全ての条件で蛋白質の発現は見られなかった。しかし、大腸菌コドン最適化を行った S-1-48 残基目までを挿入したプラスミドでは、発現を確認できた。粗精製後に MALDI-TOF マスで分子量を測定し、目的蛋白質を同定した。

#### 16. カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬の同定と開発 (馬場)

#289 の 7 周辺化合物について、それらの抗 HBV 効果を検討した。その結果、#289 より強い化合物の #799 を得る事に成功した。次に

#289 とは異なる化学構造を有する新規抗 HBV 薬の探索のために、*in silico* アッセイ系を用いて、再び薬剤ライブラリーのスクリーニングを行った。選別された 15 種類の薬剤について、それらの HepG2.2.15.7 細胞における抗 HBV 効果について調べた結果、15 薬剤のうち、3 薬剤に濃度依存的な抗 HBV 効果を認めた。その中でも抗 HBV 効果の強い #159 を選んで、その誘導体を 35 化合物入手し、それらの抗 HBV 効果について検討した。その結果、#159 より強い化合物の #832 を得る事に成功した。同定されたリード化合物の #799 及び #832 の細胞内カプシド蛋白形成阻害効果について検討した。その結果、同定されたリード化合物は、濃度依存的にカプシド蛋白の形成を阻害した。このことから、同定されたリード化合物である #799 及び #832 は、カプシド蛋白形成阻害剤である可能性が示唆された。

新規の核酸誘導体に強い抗 HBV 効果を同定し、これら新規核酸誘導体の作用機序の一部を明らかにした。同定された新規核酸誘導体は何れもアデノシン誘導体であり、また、アデノシルホモシステイナーゼ (SAHH) 阻害剤である neplanocin A を母骨格としている。そこで、同定された Nuc 1 及び Nuc 2 の SAHH 活性阻害効果について検討を行った。その結果、Nuc 1 及び Nuc 2 は SAHH 活性を阻害しなかった。このことから、これらの抗 HBV 効果は SAHH 阻害作用によるものではないことが明らかになった。

#### 17. B型肝炎ウイルスタンパク質と相互作用する宿主タンパク質の構造と機能の解析 (堀田)

HBx の欠失変異体を用いた解析により、Prdx1 との結合には HBx の N 末端近傍領域のアミノ酸残基(aa)16~20 位が重要であることがわかった。HBV 複製細胞や HBx 発現細胞では酸化ストレス応答遺伝子が強く誘導された。この酸化ストレス応答は、siRNA により Prdx1 をノックダウンすることにより有意に減弱した。Prdx1 の発現をノックダウンすると、HBV pgRNA の発現が有意に増加した。HBx と SMYD3 の様々な欠失変異体を用いて、両者の結合領域の解析を行った。その結果、HBx の C 末端領域(aa 131-154)と SMYD3 の C 末端領域(aa 269-288)が、両者の結合に関与した。全長 HBx と全長 SMYD3 は主として細胞質で共局在した。PLA 法によっても確認された。SMYD3 の発現をノックダウンした時、また、発現プラスミドにより過剰発現させた

時、HBV pgRNA の発現量は、変化しなかった。全長 HBx あるいは全長 SMYD3 を過剰発現させると、NF- $\kappa$ B 及び JNK 経路が軽度活性化される傾向が見られた。一方、全長 HBx と全長 SMYD3 を共発現させると、NF- $\kappa$ B 及び JNK 経路は有意に活性化された。

18. B 型肝炎ウイルス肝炎により誘導される宿主因子の網羅的プロテオーム解析(森川)

平成 26 年度は各遺伝子型 HBV プラスミドの構築と細胞株樹立を行った。樹立した遺伝子型 D の細胞株を用いて SILAC 法によるプロテオーム解析を行った。3828 蛋白を比較定量的に同定し、約 111 蛋白が HBV 蛋白発現時に有意に増減していた。ミトコンドリア関連蛋白の増加と小胞体関連蛋白の減少が、明らかな傾向として示された。HBV 蛋白発現時に細胞は、細胞周期や細胞分化が制御されている事が示唆された。HBV 蛋白発現時でも、アポトーシスや細胞死を引き起こす可能性のある酸化ストレスの指標や活性酸素の上昇は軽度であった。HBV genotype Ae, Bj-56, Bj-35, C, D 株の蛋白発現調整細胞株を樹立した。

19. B 型肝炎ウイルスタンパク質の発現、酵素活性および結合因子の解析(梁)

Tetherin は肝細胞において I 型 IFN 誘導性であること、また I 型 IFN のもつ抗 HBV 活性の一端を担う宿主防御因子であることが示唆された。また、Tetherin 発現細胞では HBV 粒子がエンドソーム膜に係留された。HBs の最も C 末端側の膜貫通領域 (TM4) が Tetherin の膜貫通領域と相互作用することが分かった。そこで HBs 抵抗性 Tetherin を作製すべく、Tetherin の膜貫通領域を置換したキメラ Tetherin (TFRTM, Mo-TM) を作製したところ、これらの変異体は HBs との相互作用が失われ、野生型 Tetherin よりも強い抗 HBV 活性を示した。Tetherin はウイルスを感知すると NF $\kappa$ B を活性化して IL6 などの炎症性サイトカインを分泌する。HBs と Tetherin を共発現させたところ、NF $\kappa$ B 活性化と IL6 mRNA 量の増加が見られた。一方、TM4 を欠失した HBs を Tetherin と共発現させたところ、NF $\kappa$ B 活性化は見られなかった。これらの結果から、Tetherin は細胞内で HBs を感知する細胞内ウイルスセンサーである可能性が示唆された。

20. 培養系および in vitro 系を用いた HBV 感染複製阻害剤の探索(渡士)

His-NTCP および bio-LHBs を用いた AlphaScreen 系を確立した。この系を用いて化合物スクリーニングを行い、AlphaScreen シグナルを 1/10 以下に低下させる 168 化合物を一

次ヒットとして得た。偽陽性を除くために、bio-His から定常的に発するシグナルを上記と同様に低下させる化合物をのぞき、二次ヒットとして 130 化合物を選別した。三次スクリーニングとして、preS1 ペプチドの HepG2-hNTCP-C4 細胞への吸着を阻害するものとして 27 化合物を得た。さらにこの中から HepG2-hNTCP-C4 細胞への HBV 感染を用量依存的に阻害するものとして 14 化合物を同定した。

RAPID システムによりリコンビナント His タグ付加 NTCP タンパク質に結合するものとして得られた 10 の特殊環状ペプチドの、preS1 binding assay に対する影響を評価した結果 100 mM においてはいずれのペプチドも、preS1 ペプチドの HepG2-hNTCP-C4 細胞への吸着を阻害した。また初代ヒト肝臓細胞への HBV 感染では、100 mM においてはいずれのペプチドでも阻害が認められた。NTCP による胆汁酸取り込みをトランスポーターアッセイで評価したところ、NTCP トランスポーター活性を顕著に阻害するものと大きな阻害効果を認めないものがあった。

29707 の固相化合物からなる化合物アレイを用いて、リコンビナント His タグ付加 NTCP タンパク質に結合するものとして得られた 74 化合物の preS1 binding assay に対する影響を評価した結果、8 化合物が preS1 ペプチドの HepG2-hNTCP-C4 細胞への吸着を阻害した。また HepG2-hNTCP-C4 細胞への HBV 感染では、5 化合物で HBV 感染阻害が認められた。

21. Mechanism underlying containment of HBV replication in chronic HBV-infection (アクバル)

HBsAg and HBcAg-specific immunity of PBMC and DC of CHB patients receiving HBsAg/HBcAg-based therapeutic vaccine and Peg IFN was almost comparable before commencement of therapy. Upregulation of cytokine production was documented in HBsAg/HBcAg-vaccinated CHB patients after 2 vaccinations before the decline of HBV DNA. Upregulation of HBsAg and HBcAg-specific immunity was detected in CHB patients receiving Peg IFN after 16 injections and following decrease of HBV DNA. HBsAg and HBcAg-specific immunity retained in HBsAg/HBcAg-vaccinated subjects at EOT, 24 and 48 weeks after EOT. HBsAg/HBcAg-specific immunity declined in Peg-IFN treated CHB patients 24 and 48 weeks after EOT.

#### D. 考察

これまでの肝炎対策研究によりHCVの基礎研究は飛躍的に進み、HCVキャリアに対する抗ウイルス療法は改善されてきた。しかし、HBVキャリアに対する治療法は未だに不十分であり、より良い治療法を提供することが必要である。HCV研究の経験からもウイルスの基礎研究の進展が効果的な新規抗ウイルス薬の開発に最も重要と考えられる。従って、B型肝炎に対する創薬研究を進めるためにHBVの感染複製増殖機構の解析はすべての研究の要となる。我が国におけるHBV研究のレベルを世界最高水準に引き上げることを目指す。また、B型肝炎創薬研究では研究班の間の連携が重要である。本研究の研究成果はウイルス培養系・動物モデル開発・創薬スクリーニングなどの研究班に提供する。また、肝炎ウイルス研究にかかわる若手研究者の育成をおこなう。肝炎研究基盤整備事業により感染研ウイルス第二部で実施している肝炎ウイルスセミナーやシンポジウムにも研究班の分担研究者の研究室に所属する若手研究者に参加を呼びかけた。

今年度も各分担研究者による研究は順調に進んでいる。各分担研究者の研究結果と考察の詳細については各分担研究報告書を参照されたい。

#### E. 結論

- ・cccDNA 産生に寄与する宿主遺伝子候補を見出した。

- ・ HBV 起因性肝癌は、TERT promoter 変異は低頻度で同領域への HBV integration とは相互排他的であった。HBV 発癌機構は他の肝癌とは異なる可能性があるため、その全容解明が創薬展開の知的基盤の確立に有用と考えられる。

- ・ TRIM11 コピキチン E3 リガーゼが HBV 複製を抑制することを見いだした。PML isoform 特異的な抗 HBV 活性を確認した。P-body 因子 MOV10 RNA ヘリケースが HBV 複製を抑制した。MOV10 は HBV コアタンパク質と細胞質で結合し共局在した。

- ・ HepAD38 細胞培養系において、HBV pgRNA 発現もしくは DNA 複製が ER ストレスを誘導する可能性が示された。

- ・ deep sequence による HBV の quasispecies 解析を行うことにより、肝病態の進展における preS 変異の意義が明らかとなった。

- ・ HBx と相互作用する新規分子として JMJD5 を同定した。JMJD5 は HBV の複製に関与していることが示唆された。

- ・ ETV 長期投与により誘導されるであろう

薬剤耐性変異の ETV 感受性評価が可能であり、個々の症例に適した治療戦略の決定に有用と考えられた。

- ・ 肝癌関連 HBx 変異を同定した。HBx のトランス転写活性化を阻害する薬剤のスクリーニング系を樹立し、HBx の NF- $\kappa$ B 活性化を阻害する薬剤を同定した。

- ・ RaPID システムを用いて、NTCPP タンパク質に結合する特殊ペプチドの獲得に成功した。活性に重要な役割を果たしていると考えられるペプチド配列を同定した。

- ・ HBV プレゲノム RNA に結合し同 RNA の分解促進に働き HBV 産生を抑制する因子として AUF1 を見出した。

- ・ 肝細胞に HBV が感染することで、肝細胞のオートファジーは亢進し、HBV 複製・増殖は抑制され、オートファジーの抑制により HBV 複製・増殖は亢進した。

- ・ ヒト iPS 細胞由来肝芽作製技術をもとに、肝芽の同所性移植による肝臓の再構築方法を確立していくことが今後の課題である。最新のゲノム編集操作を駆使して、HBV の再感染に関わる遺伝子を改変したヒト肝芽の作製を試みていく。

- ・ 肝細胞に HBV タンパク質を発現する 2 種類の新しいモデルマウス系を樹立した。今後、構築したマウスシステムを活用し、表現型の解析、ウイルス性肝炎を模倣した免疫応答の活性化法の探求を進めていく。

- ・ 従来より長い N 末を持つ RT、RNase H で、逆転写活性、RNase H 活性の至適条件を決定し、スクリーニングに用いる 50 mL の系を開発した。また、guanidine、NV10 を用いたタンパクの大量精製法を確立した。

- ・ NTCP の相互作用相手である S-1-48 残基目までの S 蛋白質は、大腸菌で発現及び精製が行えるため、NTCP の発現精製後、複合体構造を得る為に利用する予定である。

- ・ HBV のカプシド蛋白を標的とする薬剤の *in silico* アッセイ系を用いて、リード化合物となるような新規薬剤を同定することに成功した。また、同定されたリード化合物はカプシド蛋白形成阻害作用を有することを明らかにした。

- ・ HBV 複製細胞や HBx 発現細胞では酸化ストレス応答遺伝子が強く誘導されるが、この酸化ストレス応答に Prdx1 が大きく関与した。そして、Prdx1 が HBV ゲノムの転写・複製に対して抑制的に作用している可能性が示された。HBx と SMYD3 の共発現により、NF- $\kappa$ B 及び JNK 経路が有意に活性化された。



・ HBV 細胞モデルを構築し、HBV 蛋白発現下において誘導される宿主因子を網羅的にプロテオーム解析することにより、HBV により修飾を受ける細胞性因子の同定、異なる遺伝子型 HBV における複製増殖機構、病原性発現機構を分子レベルで解明し、新たな抗ウイルス薬開発の基盤形成を目指す。

・ IFN 誘導因子である Tetherin は HBV の粒子産生を負に制御する宿主因子であるが HBs によって拮抗される。HBs 抵抗性 Tetherin 変異体を細胞に導入することで、HBV 感染を制御できる可能性がある。

・ HBV 吸着・侵入を阻害する化合物は HBV 感染予防、肝移植後あるいは垂直感染の際のウイルス感染の広がりを抑止するのに有効であると考えられる。

・ This study about kinetic analysis of HBsAg and HBcAg-specific immunity in CHB patients provide initial idea about the mechanism of viral control by therapeutic vaccine versus Peg-IFN. Further studies have been planned to get more insights about these immunological events during therapy with therapeutic vaccine and Peg-IFN to develop an optimum regimen of therapy for CHB.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A. The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus. *Immunity*. 2015 Jan 20;42(1):123-32.

2) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. Dysregulation of Retinoic Acid Receptor Diminishes Hepatocyte Permissiveness to Hepatitis B Virus Infection through Modulation of NTCP Expression. *J Biol Chem*. 2014 Dec 30. pii: jbc.M114.602540. [Epub ahead of print]

3) Ogura N, Watashi K, Noguchi T, Wakita T. Formation of covalently closed circular DNA in Hep38.7-Tet cells, a tetracycline inducible hepatitis B virus expression cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 26;452(3):315-21.

4) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane

transporter NTCP. *Hepatology*. 2014 May;59(5):1726-37.

5) Isogawa M, Tanaka Y. The Immunobiology of Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology Res*. 2015 Jan;45(2): 179-89

6) Hamada-Tsutsumi S, Iio E, Watanabe T, Murakami S, Isogawa M, Iijima S, Inoue T, Matsunami K, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A, Joh T, Tanaka Y. Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection. *PLoS One*. 2015 Feb 18;10(2)

7) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection. *World J Gastroenterol*, 20(11), 3044-9, 2014.

8) Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, Koike K. Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget* 2014; 5: 5581-5590

9) Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Reactivation from occult HBV carrier status is characterized by low genetic heterogeneity with the wild-type or G1896A variant prevalence. *J Hepatology*. 2014. 61: 492-501.

10) Inuzuka T, Takahashi K, Chiba T, Marusawa H: Mouse models of hepatitis B virus infection comprising host-virus immunologic interactions. *Pathogens*. 2014. 3: 377-389.

11) Utsumi T, Wahyuni RM, Lusida MI, Yano Y, Priambada NP, Amin M, Purwono PB, Istimagfiroh A, Soetjipto, Brulé A, Hotta H, Hayashi Y. Full genome characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus in gibbons and a caretaker in Central Kalimantan, Indonesia. *Arch Virol*, 160: 685-692, 2015.

12) Utsumi T, Yano Y, Hotta H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Asia. *World J Med Genet*, 4(2): 19-26, 2014.

13) Utsumi T, Lusida MI, Yano Y, Purwono PB, Amin M, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Progress in the control of hepatitis B virus infection among children in Indonesia. *J Vaccines Vaccin*, 5(5): 1000247, 2014.

14) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A.: The RNA Sensor RIG-I

Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus. *Immunity* (in press)

15) Watashi K\*, Wakita T.: HBV/HDV entry, species specificity and tissue tropism. *Hepatitis B and Delta Virus* (Cold Spring Harbor Laboratory Press) (in press) (\* corresponding author)

16) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C.: Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Pathol* (in press)

17) Akbar SM, Al-Mahtab M, Hiasa Y. Designing Immune therapy for chronic hepatitis B. *J Clin Exp Hepat* 2014;4(3): 241-246

18) Al-Mahtab, Akbar SM, Uddin H, Khan SI, Rahman S. Early termination of immune tolerance state of hepatitis B virus infection explains liver damage. *World J Hepatol* 2014; 6(8):621-625

## 2. 学会発表および講演など

1) Watashi K, Iwamoto M, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Morishita R, Kwon ATJ, Suzuki H, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokamai M, Wakita T. Characterization of a culture system reproducing the NTCP-mediated HBV entry and ITS application to drug development. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014

2) Aly H, Watashi K, Wakita T, Chayama K. The identification of a new interferon-independent host mechanism suppressing hepatitis B virus replication. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014

3) Iwamoto M, Watashi K, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Koiwai O, Wakita T. Microtubule-dependent hepatitis B virus (HBV) replication revealed by chemical screening on an efficient HBV-replicating cell line. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014

4) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to HBV infection by modulating NTCP expression. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014

5) Matsunaga S, Miyakawa K, Watashi K, Wakita T, Ryo A. Wheat germ cell-free system-based production of hepatitis B virus X (HBx) protein for generation and characterization of monoclonal antibody. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014

6) Fukasawa M, Shimizu Y, Shirasago Y, Iwamoto M, Watashi K, Tanaka Y, Wakita T, Kondoh M, Yagi K, Hanada K. Efficient HBV infection system in cell cultured cells. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014

7) Akahori Y, Kato H, Fujita T, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Development of hepatitis B virus cell culture system using immortalized human hepatocytes producing exogenous Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide. 2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014

8) Wakita T, Ogura N, Hussein A, Watashi K. Novel target molecules for HBV drug development. The 11th JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Nov, 2014

9) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoic acid receptor plays an important role in mediating hepatitis B virus infection through regulation of NTCP expression. The 11th JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Nov, 2014

10) Aly H, Chayama K, Wakita T. SKIV2L helicase suppress HBV replication in interferon independent manner. The 11th JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Nov, 2014

11) Wakita T. HBV entry inhibitors, 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. Taipei(Taiwan), Jan, 2015

12) Hayashi S, Khan A, Simmons B, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y. Hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus genotype F in Alaska: A retrospective case-control study. Asian Pacific Association for The Study of the Liver. Mar. 12-15, 2014. Brisbane, Australia.

13) Isogawa M, Murata Y, Sheikh K, Tanaka Y, Chisari FV; Endogenous Antigen Presentation By Hepatocytes Plays an Essential Role in the Induction of HBV-Specific CD8<sup>+</sup> T cell responses. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep. 3-6, 2014, Los Angeles, USA. O-91

14) Hayashi S, Khan A, Simons BC,

- Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y: Carcinogenic Potential of Hepatitis B Virus Genotype F is Associated with Accumulation of Novel Core Mutations. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep. 3-6, 2014, Los Angeles, USA. O-104
- 15) Whitacre D, Peterson D, Sureau C, Milich D, Isogawa M: A VLP Based Therapeutic HBV Vaccine Designed to Inhibit Viral Spread: 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep. 3-6, 2014, Los Angeles, USA. P-144
- 16) Tsutsumi S, Watanabe T, Murakami S, Sayko I, Hayashi S, Omagari K, Isogawa M, Tanaka Y: Evaluating Hepatitis B Virus Lifecycle and Screening anti-Viral Drugs Using Primary Human Hepatocytes Isolated from Chimeric Mice. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep. 3-6, 2014, Los Angeles, USA. P-154
- 17) Inoue T, Shinkai M, Ohne K, Murakami S, Tsutsumi S, Tajiri K, Kishi H, Ogawa S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y; The Neutralizing Activity of Monoclonal HBs Antibodies Separated from Hepatitis B Vaccinated Recipients and the Influence of the titers by Different Measurement Methods. 2014 AASLD The Liver Meeting. Nov. 7-11, 2014, Boston, USA, P-1672
- 18) Watanabe T, Tsutsumi SH, Shinkai N, Iio E, Matsunami K, Iijima S, Murakami S, Omagari K, Isogawa M, Sugiura W, Tanaka Y; Pre- and Post-Exposure Prophylaxis against Hepatitis B Virus Infection by HBV-active Antiretroviral Therapy. 2014 AASLD The Liver Meeting. Nov. 7-11, 2014, Boston, USA, P-1685
- 19) Isogawa M, Murata Y, Sheikh K, Tanaka Y, Chisari FV; Cross-Presentation by Bone Marrow Derived Cells is Required, but not Sufficient, for the Induction of HBV-Specific CD8+ T Cell Responses. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov. 20-21, 2014, Hiroshima. DP-04
- 20) Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones CL, Homan C, McMahon BJ, Murakami S, Iijima S, Isogawa M, Watanabe T, Tanaka Y: Association between Hepatocellular Carcinoma and Accumulation of Novel Core Mutations in Hepatitis B Virus Genotype F. The 11th JSH Single Topic Conference. Nov. 20-21, 2014, Hiroshima. P-51
- 21) W Li, R Muroyama, K Goto, R Nakagawa, M Sato, N Kowatari, Q Li, M Omata, K Koike, N Kato. Mutations in Hepatitis B Virus (HBV) X region are Hepatocellular Carcinoma risk factors for HBV Genotype C infected patients. 23rd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Brisbane, Australia. 12-16 March, 2014
- 22) R Muroyama, K Goto, W Li, Y Matsubara, R Nakagawa, S Ito, N Kato. HBV induces an HBV-induced HCC associated gene MICA through transcriptional activation in SNPS dependent manner. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA. 3-6 September, 2014
- 23) Inuzuka T, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H. The viral characteristics of HBV reactivation from occult carrier status triggered by chemotherapy or immunosuppressive therapy. The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2015.3.12-15, Istanbul.
- 24) Inuzuka T, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H. Clinical and viral characteristics of HBV reactivation from occult carrier status triggered by chemotherapy or immunosuppressive therapy, The 11th JSH Single Topic Conferences, 2014.11.20, Hiroshima.
- 25) Deng L, Gan X, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. A tandem affinity purification analysis of HBx-interacting proteins and identification of two novel interactors Prdx1 and SMYD3. 2014 TAsL-Japan Hepatitis B workshop. Taipei, Taiwan, April 19-20, 2014.
- 26) Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I, Hotta H. Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- 27) Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- 28) Amin M, Hadikusumo A A, Juniastuti, Wahyuni R M, Magfiroh A I, Utsumi T, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H, Lusida M I. Serologic and genotype analysis of hepatitis B virus among mothers with HBsAg positive and their family. The 6th International Seminar of Indonesian Society for Microbiology. Padang, Indonesia, October 16-17, 2014.
- 29) Shimazaki T, Date T, Gouttenoire J, Quadroni M, Moradpour D and Morikawa K. THE HEPATITIS B VIRUS MODULATES CELLULAR FACTORS IN THE DIRECTION OF SLOWDOWN OR STOP CELL CYCLE

AND PROLIFERATION. The 11th JSH Single Topic Conference. Hiroshima, Japan, 20-21 Nov 2014.

30) S Matsunaga, K Miyakawa, K Watashi, T Wakita, A Ryo. Wheat germ cell-free system-based production of Hepatitis B virus X (HBx) protein for generation and characterization of monoclonal antibody. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA 2014.9.3.

31) Akbar SM, Chen S, Mahtab MA, Hiasa Y. Comparative immune modulatory capacities of HBsAg, HBcAg, and HBsAg/HBcAg and their utility for development of therapeutic vaccines. 23<sup>rd</sup> Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Brisbane, Australia, March 12-15, 2014

32) Akbar SM. HBV pathogenesis and evolving therapy. 21<sup>st</sup> Annual Meeting of Indian National Association for the Study of Liver, Jaipur, India, 28-30 March, 2014

33) Mahtab MA, Akbar SM, Rahman S. Therapeutic potential of a vaccine containing both HBsAg and HBcAg in patients with chronic hepatitis B - interim data from a recently concluded phase III trial in Bangladesh. 21st Annual Convention & Scientific Seminar of Bangladesh Gastroenterology Society, Dhaka, Bangladesh 2014

34) Mahtab MA, Akbar SM, Rahman S. Interim results of a recently concluded Phase-III clinical trial with a therapeutic vaccine for chronic hepatitis B in Bangladesh. 25th Annual Conference & Scientific Seminar of Association of Physicians of Bangladesh, Dhaka, Bangladesh 2014.

35) Akbar SM, Al-Mahtab M, Aguilar J, Hiasa Y. Immune modulatory antiviral drug versus HBV antigen-specific immune therapy in chronic hepatitis B: Lessons from laboratory benches and phase III clinical trials in patient's bedsides. The 2<sup>nd</sup> Japan-Italy Liver Workshop 'Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links, Miyajima, Japan, November 18-19, 2014

36) Akbar SM, Abe M, Al-Mahtab M, Hiasa Y, Chen S. Myeloid-derived suppressor cells, a new entity, capable of regulating antigen-specific and T-cell based immunity in chronic HBV infection. The 11<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference, Hiroshima, Japan, 20-21<sup>st</sup> November

37) 渡士幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字。B型肝炎ウイルス(HBV)Lタンパク質とNTCPの相互作用阻害による抗HBV戦略。第

24回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月

38) 外山政明、濱崎隆之、岡本実佳、渡士幸一、脇田隆字、馬場昌範。HBV capsidタンパク質を標的とした新規抗HBV薬の探索。第24回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月

39) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字。HBV感染受容体NTCPの発現調節機構の解析およびこれを阻害する低分子化合物の抗HBV効果。第24回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014年5月

40) 渡士幸一、相崎英樹、脇田隆字。培養系を用いた抗B型肝炎ウイルス化合物の同定と作用機序解析。第50回日本肝臓学会総会、東京、2014年5月

41) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、Hussein Aly、藤本陽、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、深澤征義、小祝修、楠原洋之。ヒトNTCP安定発現によるB型肝炎ウイルス(HBV)感染許容性の獲得とそれを用いたHBV侵入機構の解析。第22回肝病態生理研究会、東京、2014年5月

42) 櫻井文教、山本剛史、森大輔、山本達郎、渡士幸一、脇田隆字、飯島沙幸、田中靖人、立花雅史、小比賀聡、水口裕之。2',4'-BNA/LNA導入型アンチセンスオリゴヌクレオチドによるB型肝炎ウイルスの感染抑制。アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014、東京、9月、2014

43) 赤堀祐一、加藤博己、藤田尚志、渡士幸一、脇田隆字、土方誠。ヒトNTCP恒常発現不死化ヒト肝細胞を用いたB型肝炎ウイルス培養細胞感染系の構築。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月

44) 深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、岩本将士、渡士幸一、田中靖人、脇田隆字、近藤昌夫、八木清仁、花田賢太郎。効率的なHBV感染培養細胞系の構築に関する研究。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月

45) 安本順、葛西宏威、土橋香織、山下篤哉、渡士幸一、脇田隆字、田中智久、森石恆司。HBV感染による細胞内脂肪滴形成への影響。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月

46) 山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡士幸一、脇田隆字、前川伸哉、榎本信幸、田中淳一、森石恆司。