

海洋生物抽出物ライブラリーソースからの B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

47) 外山政明、濱崎隆之、岡本実佳、渡士幸一、脇田隆字、馬場昌範。新規 7-deazaneplanocin A 及び 7-deaza-8-azaneplanocin A 誘導体の抗 HBV 効果。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

48) 岩本将士、渡士幸一、杉山真也、鈴木亮介、相崎英樹、田中靖人、溝上雅史、大谷直子、小祝修、脇田隆字。効率的な B 型肝炎ウイルス (HBV) 複製評価系を用いた微小管依存的な HBV 複製機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

49) Hussein Aly、渡士幸一、茶山一彰、脇田隆字。The identification of a new interferon-independent host mechanism suppressing Hepatitis B virus replication. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

50) 宮川敬、松永智子、渡士幸一、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字、梁明秀。宿主防御因子 Tetherin-BST2 による B 型肝炎ウイルス感染抑制とその回避機構の解明。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

51) 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、杉山真也、田中靖人、溝上雅史、脇田隆字。レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

52) 土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡士幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司。トリプシン・EDTA による NTCP 依存 HBV 感染の増強。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

53) 松田麻未、鈴木亮介、嵯峨涼平、藤本陽、渡士幸一、相崎英樹、森石恆司、岡本徹、松浦善治、黒田俊一、脇田隆字。遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関与する宿主因子の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

54) 渡士幸一、Sluder Ann、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、Boroto-Esoda Katyna、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) large S タンパ

ク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

55) 山本達郎、櫻井文教、高山和雄、立花雅史、渡士幸一、脇田隆字、飯島沙幸、田中靖人、水口裕之。ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス感染評価系の開発。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月

56) 清原知子、石井孝司、脇田隆字。10-15 歳児における HBs 抗原保有率調査。第 18 回日本ワクチン学会学術集会、福岡、2014 年 12 月

57) 山本達郎、櫻井文教、高山和雄、立花雅史、渡士幸一、脇田隆字、飯島沙幸、田中靖人、水口裕之。ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の B 型肝炎ウイルス感染評価系への応用。日本薬学会第 135 年会、神戸、2015 年 3 月

58) 櫻井幸、朝比奈靖浩、渡辺守、パネルディスカッション B 型慢性肝疾患における核酸アナログ治療中の肝発癌危険因子の検討、第 40 回日本肝臓会東部会、東京、2014 年 11 月

59) 井津井康浩、朝比奈靖浩、渡辺守、ワークショップ ウイルス性急性肝炎および de novo B 型肝炎の動向第 40 回日本肝臓会東部会東京、2014 年 11 月

60) 堤進、渡邊綱正、村上周子、飯島沙幸、飯尾悦子、松波加代子、新海登、松浦健太郎、五十川正記、田中靖人: 大量調整可能なヒト肝細胞を用いた HBV in vitro 感染培養系を利用した創薬探索の可能性。第 50 回日本肝臓学会総会。平成 26 年 5 月 29 日—30 日。東京。WS3-2。

61) 五十川正記、村田泰洋、田中靖人: HBV 特異的エフェクター CD8+T 細胞応答誘導における樹状細胞の役割。第 50 回日本肝臓学会総会。平成 26 年 5 月 29 日—30 日。東京。WS10-4。

62) 林佐奈衣、五十川正記、村上周子、飯島沙幸、堤進、尾曲克己、渡邊綱正、田中靖人: B 型肝炎ウイルス Genotype F における肝細胞癌関連因子の検討。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。平成 26 年 11 月 10 日—12 日。横浜。O3-4-17。

63) 堤進、渡邊綱正、村上周子、飯島沙幸、林佐奈衣、尾曲克己、五十川正記、田中靖人: 初代ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス感染初期の宿主免疫応答とウイルス生活環の解析。第 62 回日本ウイル

ス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10 日—12 日, 横浜. O3-4-24

64) 五十川 正記, 村田 泰洋, 田中 靖人: HBV 特異的 CD8+T 細胞の増殖と細胞傷害能は肝細胞による内因性抗原提示に依存する. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10 日—12 日. 横浜. O3--26

65) 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関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

66) 室山良介, 後藤覚, 松田浩一, 田中靖人, 茶山一彰, 溝上雅史, 小俣政男, 小池和彦, 加藤直也. 腫瘍自然免疫を司る MICA の B 型および C 型肝炎における役割. 第 50 回日本肝臓学会総会. 2014 年 5 月 29-30 日

67) Wenwen Li, 室山良介, 後藤覚, 中川良, 松原康朗, 古渡礼恵, 李強, 加藤直也. Characteristic mutations in genotype C Hepatitis B virus X region of acute on chronic liver failure patients. 第 50 回日本肝臓学会総会. 2014 年 5 月 29-30 日

68) 中島謙治, 伊藤昌彦, 鈴木哲朗. hnRNPs による HBV プレゲノム RNA プロセッシング調節機構の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜. 2014 年 11 月.

69) 犬塚義, 上田佳秀, 千葉勉, 丸澤宏之. B 型肝炎ウイルス再活性化の早期発見と核酸アナログ早期治療の有用性. 第 102 回日本消化器病学会近畿支部例会. 2015.2.21 京都

70) 犬塚義, 丸澤宏之, 上田佳秀, 千葉勉. 化学療法・免疫抑制療法により惹起される HBV 再活性化例の臨床像とウイルス学的特徴. 第 24 回抗ウイルス療法研究会総会 2014.5.7-9 山梨

71) 犬塚義, 上田佳秀, 千葉勉, 丸澤宏之. 化学療法・免疫抑制療法により再活性化する HBV のウイルスゲノム解析. 第 10 回 広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム 2014.7.5 広島

72) 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 カプシドタンパク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, 2014 年 5 月 8 日, 富士吉田.

73) 外山政明, 濱崎隆之, 岡本実佳, 渡士幸一, 脇田隆字, 馬場昌範. In silico スクリーニングを用いたカプシド蛋白を標的とする抗 HBV 薬の探索. 第 51 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2014 年 9 月 6 日, 鹿児島.

74) 外山政明, 濱崎隆之, 岡本実佳, 渡

士幸一, 脇田隆字, 馬場昌範. 新規 7-deazaneplanocin A 及び 7-deaza-8-azaneplanocin A 誘導体の抗 HBV 効果. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10 日, 横浜.

75) DENG Lin, 甘 翔, 篠崎健太, 勝二郁夫, 堀田博. B 型肝炎ウイルス X タンパク質の新規結合因子抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン 1(Prdx1)の同定と機能解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月.

76) 林美和子, DENG Lin, 篠崎健太, 陳明, 勝二郁夫, 堀田博. B 型肝炎ウイルス X タンパク質とヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の相互作用の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月.

77) 宮川 敬, 松永智子, 渡士幸一, 杉山真也, 溝上雅史, 脇田隆字, 梁 明秀: 宿主防御因子 Tetherin/BST2 による B 型肝炎ウイルス感染抑制とその回避機構の解明, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 神奈川.

78) 山岡 悠太郎, 宮川 敬, 松永 智子, 宮本 摩由, 黒山 浩之, 千室 智之, 梁 明秀: B 型肝炎ウイルスのコアタンパク質 (HBc) に対するマウスモノクローナル抗体の作製と解析, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 神奈川.

79) 土橋 香織, 葛西 宏威, 田中智久, 陳 文家, 渡士 幸一, 脇田 隆字, 山下 篤哉, 梁 明秀, 岡本 徹, 松浦 善治, 森石 恆司: トリプシン・EDTA による NTCP 依存 HBV 感染の増強, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 神奈川.

80) Akbar SM, Al-Mahtab M, Hiasa Y. A phase III clinical trial with HBsAg/HBcAg-based therapeutic vaccine in patients with chronic hepatitis B, 24th Annual Meeting of the Japanese Association of Antiviral Therapy, Yamanishi, Japan, May 7-9, 2014

81) Akbar SM, Al-Mathab M, Hiasa Y. B型肝炎に対するHBs抗原およびHBc抗原ワクチン治療の第III相臨床試験ーペグインターフェロン治療との比較および免疫治療効果ー, 第50回日本肝臓学会総会, Tokyo, Japan, May 29-30, 2014.

82)

G.知的所有権の出願・登録状況
とくになし

Ⅱ. 分担研究報告

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（平成26年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

主任研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

分担研究課題：B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明の総括

研究要旨：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解析可能なアッセイ系を構築し、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。

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解析可能なアッセイ系を構築し、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。

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。

B. 研究方法

HBV cccDNA アッセイの構築

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 (1st スクリーニング) により、細胞内 cccDNA 量を Real-time PCR 法 (2nd スクリーニング) により解析した。

(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あるいは市販されている肝細胞

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、個人情報等を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

HBV cccDNA アッセイの構築

siRNA Library の 1st スクリーニングより、HBeAg 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。

D. 考察

cccDNA は HBV の持続感染に最も重要なウイルスゲノムの存在様式と考えられている。しかし、cccDNA が作られて、細胞核内で維持される機構についてはほとんど解明されていない。昨年度 cccDNA を効率よく検出するアッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて cccDNA 産生や維持に関与する宿主因子の同定を試みた。Relaxed circular DNA (RC-DNA) から cccDNA への変換が行われる際、宿主の DNA repair システムが使用されている可能性が報告されている。今回 DNA repair に関する因子がスクリーニングにより取得できたのは妥当であると考えられた。

E. 結論

cccDNA 産生に寄与する宿主遺伝子候補を見出した。

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, Kusuvara 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.

2. 学会発表

- 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, Mizokami 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⁺/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) 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
 - 13) 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カプシド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
 - 14) 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
 - 15) 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
 - 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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。海洋生物抽出物ライブラリーソースからの B 型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 22) 外山政明、濱崎隆之、岡本実佳、渡士幸一、脇田隆字、馬場昌範。新規 7-deazaneplanocin A 及び 7-deaza-8-azaneplanocin A 誘導体の抗 HBV 効果。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 23) 岩本将士、渡士幸一、杉山真也、鈴木亮介、相崎英樹、田中靖人、溝上雅史、大谷直子、小祝修、脇田隆字。効率的な B 型肝炎ウイルス (HBV) 複製評価系を用いた微小管依存的な HBV 複製機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 24) Hussein Aly、渡士幸一、茶山一彰、脇田隆字。The identification of a new interferon -independent host mechanism suppressing Hepatitis B virus replication. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 25) 宮川敬、松永智子、渡士幸一、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字、梁明秀。宿主防御因子 Tetherin-BST2 による B 型肝炎ウイルス感染抑制とその回避機構の解明。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 26) 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、杉山 真也、田中靖人、溝上雅史、脇田隆字。レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 27) 土橋香織、葛西宏威、田中智久、陳文家、渡士幸一、脇田隆字、山下篤哉、梁明秀、岡本徹、松浦善治、森石恆司。トリプシン・EDTA による NTCP 依存 HBV 感染の増強。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 28) 松田麻未、鈴木亮介、嗟峨涼平、藤本陽、渡士幸一、相崎英樹、森石恆司、岡本 徹、松浦善治、黒田俊一、脇田隆字。遺伝子組換え酵母由来 B 型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関する宿主因子の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 29) 渡士幸一、Sluder Ann、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、Borrito-Esoda Katyna、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) large S タンパク質と NTCP の相互作用阻害による

- 抗 HBV 戦略。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 30) 山本達郎、櫻井文教、高山和雄、立花雅史、渡士幸一、脇田隆宇、飯島沙幸、田中靖人、水口裕之。ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス感染評価系の開発。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 31) 清原知子、石井孝司、脇田隆宇。10-15 歳児における HBs 抗原保有率調査。第 18 回日本ワクチン学会学術集会、福岡、2014 年 12 月
- 32) 山本達郎、櫻井文教、高山和雄、立花雅史、渡士幸一、脇田隆宇、飯島沙幸、田中靖人、水口裕之。ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞の B 型肝炎ウイルス感染評価系への応用。日本薬学会第 135 年会、神戸、2015 年 3 月

G. 知的所得権の出願・登録状況

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（平成 26 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者：朝比奈靖浩 東京医科歯科大学 教授

分担研究課題：HBV 起因性肝癌のゲノム変異と分子機構の解明

研究要旨：【目的】HBV 起因性肝細胞癌の病態と関連する遺伝子を解明し、新たな治療標的を創出する目的で、臨床肝癌検体から半導体シーケンスを用いて癌関連遺伝子の網羅的解析を行った。【方法】各種臨床データが明らかである肝細胞癌手術例 104 例を対象とし、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 をターゲットとして deep または direct sequence を行った。また、このうち HBs 抗原陽性肝癌において HBV integration を次世代シーケンサーにて解析した。【結果】90%の症例で TERT promoter、TP53、または CTNNB1 の変異を認めた。TERT promoter 変異は、HCV など非 HBV 起因性肝癌に多いが、HBV 起因性肝癌では有意に少なく、TP53 変異が有意に高頻度で、TERT promoter 変異と HBV ゲノムの TERT 領域への integration とは相互排他的であった。挿入された HBV ゲノムは HB x 遺伝子が多かった。【考察】HBV 起因性肝癌では HB x 蛋白の TERT 領域への挿入が TERT promoter 変異とは異なる発癌機構に関与している可能性がある。【結論】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。

A. 研究目的

HBV 関連肝細胞癌は B 型慢性肝炎・肝硬変を背景として発生し、他の固形癌と同様に癌の進行に伴って遺伝子異常が蓄積すると考えられているが、治療反応性、再発の有無、生命予後など臨床病態と密接に関連する遺伝子異常は明らかになっていない。本研究では HBV 起因性肝細胞癌の病態と関連する遺伝子を解明し、新たな治療標的を創出する目的で、臨床肝癌検体から半導体シーケンスを用いて低頻度に存在する遺伝子変異も含めて網羅的検索を行った。

B. 研究方法

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。年齢中央値=70 歳、男/女=77/27 例、HBV / HCV / NBNC =

28 / 50 / 12 / 14 例、腫瘍径中央値=3.8cm、Child-Pugh grade A/B=95/9 例、高分化/中分化/低分化=33/51/20 例、再発あり=66 例。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 をターゲットとして Ion AmpliSeq Cancer Panel Kit v2 と ARID1A、ARID2、AXIN1、NFE2L2 をターゲットとした Ion Ampliseq Custom Panel を用い、Library を増幅、Template 作成後、Ion PGM Sequencer を用いて deep sequence を行った。データ解析は Torrent Suite v2.2 を用い標準ヒトゲノム hg19 をリファレンス配列とし、これらへのマッピングおよび SNP の検出を行った。また、TERT promoter 領域の 2 か所の hotspot に対して direct sequence を行った。HBs 抗原陽性 27 例の癌部における HBV integration について DNA と HBV genotype Aa、Ae、Ba、Bj、C のゲノム配列から作成したオリゴキャプチャライブラリ

とのハイブリダイゼーションによるライブラリ調整を行い Illumina Miseq を使用し Paired-End 法 300 塩基読み取りにより塩基配列データを取得しヒトと HBV ゲノムの junction を含むデータを抽出した。

(倫理面への配慮)

所属施設での倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

腫瘍部は平均 2024 リード、非腫瘍部は 1173 リード得られた。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。これらの遺伝子変異と臨床的背景因子の関連を解析したところ、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。

D. 考察

TERT promoter 変異は、HCV など非 HBV 起因性肝癌に多いが、HBV 起因性肝癌では有意に少なく、TP53

変異が有意に高頻度で、TERT promoter 変異と HBV ゲノムの TERT 領域への integration とは相互排他的であった。挿入された HBV ゲノムは HBx 遺伝子が多く、HBV 起因性肝癌では HBx 蛋白の TERT 領域への挿入が TERT promoter 変異とは異なる発癌機構に参与している可能性がある。HBV 肝癌の抑制には、非 HBV 起因性肝癌とは異なる創薬展開が必要である可能性が示唆された。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Murakawa M*, [Asahina Y*](#), Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kitazume-Kusano A, Watanabe T, Kawai-Kitabatake F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai N, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. *MM and YA contributed equally to this work. Impaired induction of IL28B and expression of IFN λ 4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2015 doi: 10.1111/jgh.12902.
2. Tsuchiya K*, [Asahina Y*](#), Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. * These authors contributed equally to this study. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2014; 120: 229–273.
3. Tsuchiya K, [Asahina Y](#), Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful radiofrequency ablation in patients with early stage hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2014; 20: 291–297.
4. Yasui Y, Kudo A, Kurosaki M, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Matsunaga K, Nakanishi H, Tsuchiya K, Itakura J, Takahashi Y, Tanaka S, [Asahina Y](#), Enomoto N, Arii S, Izumi N. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: A propensity score matching study.

Oncology 2014; 86: 53–62.

5. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Yoshimichi C, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatol Res* 2014 Sep 11. doi: 10.1111/hepr.12421.
 6. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One* 2014; 9: e86449.
 7. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, Izumi N. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: evaluation by near infrared spectroscopy. *Hepatol Res* 2014; 44: 319–326.
 8. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res* 2014; 44:1339-1346. doi: 10.1111/hepr.12309.
 9. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y, Izumi N. Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2014; 44: 720–727.
2. 学会発表
1. Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Kaneko S, Nagata H, Goto F, Otani S, Taniguchi M, Murakawa M, Nitta S, Watanabe T, Tasaka-Fujita M, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Enomoto N, Watanabe M. Gene alterations in β -catenin and p53/ cell cycle control pathway are closely associated with development and prognosis of hepatocellular carcinoma: Comprehensive analyses by next generation sequencing technology. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 2. Nakagawa M, Asahina Y, Taniguchi M, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Watanabe M. Impact of host and therapeutic factors and resistant associated variants on response to interferon based- direct acting antiviral treatment in difficult-to-treat chronic hepatitis C patients. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 3. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Taniguchi M, Watanabe T, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Expression of IFN/4 in liver and PBMC is closely associated with higher basal expression of ISGs and impaired induction of IL28B by interferon treatment in chronic hepatitis C non-responder patients. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 4. Watanabe T, Asahina Y, Nakagawa M, Kakinuma S, YItsui Y, Taniguchi T, Murakawa M, Nagata H, Miura M, Maekawa S, Enomoto E, Watanabe M. Emergence or selection of resistant associated variant immediately after initiation of the therapy is predictive for failure of direct acting antiviral therapy: ultra-deep sequencing analyses for serial time points. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 5. Otani S, Kakinuma S, Kamiya A, Goto F, Kaneko S, Azuma S, Asahina Y, Watanabe M. Matrix Metalloproteinase-14 regulates the maturation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 6. Tsuchiya K, Yasui Y, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Clinical outcomes in patients who develop hepatocellular carcinoma after hepatitis C viral eradication by antiviral therapy. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 7. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Yamamoto K, Sasazuki T, Sugiyama M, Seto W, Yuen M, Poovorawan Y, Ahn SH, Han K, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang J, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. Associations of HLA-DPB1 with CHB infection and HBV related HCC in Asia. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 8. Asahina Y, Murakawa M, NittaS, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired

- IL28B gene induction and expression of IFN λ 4 influenced by the polymorphisms near IL28B gene are closely associated with a non-response to interferon in chronic hepatitis C patients. **The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.**
9. Tsuchiya K, Yasui Y, Takada N, Nakakuki S, Matsuda S, Kaneko S, Muraoka M, Yamashita N, Hattori N, Tamaki N, Osaki S, Suzuki T, Hosokawa K, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriaminepentaacetic acid magnetic resonance imaging and contrast enhanced ultrasonography with sonazoid as part of therapeutic strategies for small nonhypervascular hepatic nodular lesions. **The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.**
 10. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
シンポジウム 難治性C型慢性肝炎に対するプロテアーゼ3剤併用療法の治療効果とDAA耐性変異の検討
第40回日本肝臓会東部会
東京, 2014年11月
 11. 朝比奈靖浩, 中川美奈, 渡辺 守
シンポジウム NS3およびNS5A阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレビル3剤併用療法の治療効果
第50回日本肝臓会総会
東京, 2014年5月
 12. 朝比奈靖浩
公聴会 NS3およびNS5A阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレビル3剤併用療法の治療効果
第50回日本肝臓会総会
東京, 2014年5月
 13. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
パネルディスカッション C型慢性肝炎に対するインターフェロンをベースとしたプロテアーゼ3剤併用療法の治療効果とDAA耐性変異の検討
第19回日本肝臓会大会
神戸, 2014年10月
 14. 櫻井幸, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
パネルディスカッション B型慢性肝疾患における核酸アナログ治療中の肝発癌危険因子の検討
第40回日本肝臓会東部会
東京, 2014年11月
 15. 井津井康浩, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
ワークショップ 高齢者C型慢性肝炎へのIFN治療後発癌と発癌に関与する因子の解析
第19回日本肝臓会大会
神戸, 2014年10月
 16. 井津井康浩, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
ワークショップ ウイルス性急性肝炎および de novo B型肝炎の動向
第40回日本肝臓会東部会
東京, 2014年11月
 17. 東正新, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
ワークショップ 肝細胞癌スクリーニング時における拡散強調画像陽性所見の重要性
第40回日本肝臓会東部会
東京, 2014年11月
 18. 村川美也子, 朝比奈靖浩, 中川美奈, 後藤文男, 大谷賢志, 河合富貴子, 谷口未樹, 新田沙由梨, 渡辺貴子, 櫻井幸, 井津井康浩, 東正新, 柿沼晴, 坂本直哉, 渡辺 守
ワークショップ C型慢性肝炎治療におけるIFN不応性に関わるIL28B近傍遺伝子多型(SNP)と血球内IFN λ 産生能の関連
第50回日本肝臓会総会
東京, 2014年5月
 19. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
ワークショップ インターフェロン治療後の線維化マーカーの推移と発癌リスクの検討
第50回日本肝臓会総会
東京, 2014年5月
 20. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守
ワークショップ 次世代プロテアーゼ阻害剤併用3剤治療の適応症例の検討
第100回日本消化器病学会総会
東京, 2014年4月
- G. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特許取得
特になし。
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
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（平成 26 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者：熊本大学エイズ学研究センター 有海 康雄 准教授
研究協力者：熊本大学エイズ学研究センター 木庭 獺達 厚労科研究員

分担研究課題：HBV ゲノムの核内維持機構の解析

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)は、長期間にわたり、核内においてエピソード的な covalently closed circular DNA (cccDNA)として維持され、慢性持続感染の要因となっている。また、HBV ゲノムはヒトゲノム内に組込まれる。そのため核内より HBV ゲノムの排除方法の確立が急務である。しかしながら、核内における HBVcccDNA の保持機構や HBV ゲノムの組込み機構については不明である。本年度は、宿主因子を分子標的とした創薬開発のため、新たに HBV 複製に関与する以下の宿主因子を同定し、その HBV 生活環における役割や HBV と宿主因子との相互作用について解析を行った。その結果、(1) TRIM11 ユビキチン E3 リガーゼが HBV 複製を抑制すること、(2) TRIM11 による HBV 抑制には、TRIM11 の RING ドメインと C 末端の SPRY ドメインの両方が必要であること、(3) PML isoform 特異的な抗 HBV 活性があること、(4) P-body 因子 MOV10 RNA ヘリケースが HBV 複製を抑制すること、そして (5) MOV10 と HBV コアタンパク質が細胞質で共局在し、両者が結合することを見いだした。今後、同定された宿主因子が核内において、HBV cccDNA 維持や HBV ゲノムのヒトゲノムへの組込みに関与するのか検討したい。

A. 研究目的

現在、B型肝炎ウイルス(HBV)の逆転写酵素阻害剤は、主要な抗 HBV 剤として、臨床の場で治療に用いられているが、完全に HBV を排除することが出来ない。そこで、HBV キャリアや慢性 B型肝炎患者より、HBV を効率良く排除するために新たな宿主因子を標的とした抗 HBV 剤の開発が急務とされている。さらに、HBV は、長期間にわたり、核内においてエピソード的な covalently closed circular DNA (cccDNA)として維持され、慢性持続感染の要因となっている。また、HBV ゲノムはヒトゲノム内に組込まれる。そのため核内より HBV ゲノムの排除方法の確立が急務である。しかしながら、核内における HBVcccDNA の保持機構や HBV ゲノムの組込み機構については不明である。そこで、HBVcccDNA ゲ

ノムの保持機構や HBV のヒトゲノムへの組込み機構に関与する宿主要因について明らかにし、新規抗 HBV 剤開発につなげたい。

B. 研究方法

(1) HBV 生活環における宿主因子の役割の解析
強制発現の系や宿主因子を標的とする shRNA を恒常的に発現するレンチウイルスベクター導入により、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 発現レベルをウエスタンブロット法により解析した。また、細胞内 HBV キャプシドに結合した HBV DNA 量をリアルタイム PCR 法により定量解析を行った。さらに、培養上清中に放出され

る HBs 抗原量を ELISA 法、そして上清中の HBV DNA 量をリアルタイム PCR 法により解析し、HBV 産生能についても検討を行った。尚、本研究に用いた HepG2.2.15.7 細胞及び NTCP-HepG2 細胞は国立感染症研究所ウイルス第二部の脇田隆宇先生、渡士幸一先生により分与された細胞を使用した。また、横浜市立大学医学部 梁明秀先生より、分与された抗 HBc 抗体を用いた。

(2) 細胞内局在の観察

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、抗 FLAG 抗体(M2; Sigma 社)及び抗 HA 抗体 (3F10; Roche 社) を反応させた後、Cy3 結合抗マウス抗体 (Jackson ImmunoResearch 社) 及び Alexa488 結合抗ラット抗体 (Molecular Probes、Life Technologies 社) を用いて可視化した。また、核は DAPI で染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡(FV1200、オリンパス社)を用いて細胞内局在を詳細に観察した。

(3)免疫沈降法

細胞を 50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 4mM EDTA, 0.2% NP-40,10mM NaF, 1mM DTT, 1mM PMSF を含む RIPA バッファーで可溶化した。細胞ライゼートは抗 HA 抗体(3F10, Roche 社)を加えインキュベートし、Protein G-Sepharose(GE)に吸着させ、免疫沈降した。免疫沈降物は、抗 HA 抗体 (HA-7; Sigma 社) あるいは抗 FLAG 抗体 (M2; Sigma 社)を用いたウェスタンブロット法により解析した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究には、動物実験やヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、本研究は「研究開発等に係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核酸防止処置等を定める省令」に基づき実施した。実験に使用した細胞、HBV 株、及び核酸については高圧蒸気滅菌を施した後に廃棄した。また、HBV 感染実験はバイオハザード BSL2 (P2)レベル実験室にて行い、感染防止対策を行った。

C. 研究結果

(1) TRIM11 ユビキチン E3 リガーゼの抗 HBV 効果

HBV 感染レセプター NTCP を発現させた HepG2-NTCP 細胞に TRIM11 発現プラスミドと全長 HBV 遺伝子型 C 株あるいは ayw 株をトランスフェクションし、3 日後に細胞内 HBV capsid 結合 HBV DNA レベルをリアルタイム PCR 法により定量した結果、コントロールに比べ、HBV capsid 結合 DNA レベルが顕著に抑制した。一方、ユビキチン活性に必要とされる RING ドメインや C 末端の SPRY ドメインを欠損させても抗 HBV 活性はみられなかった。逆に、TRIM11 をノックダウンした HBV 恒常的複製細胞 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 レベルの増加が観察された。TRIM11 の作用点を同定するために、細胞内の pregenomic (pg) RNA の発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法で解析を行うと、TRIM11 を発現させると HBV pgRNA レベルの減少が観察されたが、RING ドメインを欠損した TRIM11 変異体では HBV pgRNA レベルに変化しなかった。さらに TRIM11 の抗 HBV 効果がユビキチンシステムを介した HBV タンパク質の分解によるものか検討を行

うために、TRIM11 と HBV ayw 株の分子クローンを共発現させ、タンパク質の発現レベルを比較した。その結果、少なくとも 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。

(2) isoform 特異的な PML による抗 HBV 効果

HBV ayw 株分子クローンと 6 種の PML isoform (splicing variants) PML I~PML VI を共発現させ、細胞内の HBV capsid 結合 DNA レベルをリアルタイム PCR 法で定量解析を行った結果、PML I、PML II そして PML IV に強い抗 HBV 活性が確認された。一方、PML III、PML V、PML VI には抗 HBV 活性はなく、コントロールと同等レベルであった。

(3) MOV10 RNA ヘリケースと HBV との相互作用

P-body に局在する因子と HBV との相互作用を解析するため、DDX3、DDX6、MOV10 RNA ヘリケースそして、抗 HIV-1 因子であるシチジンデアミナーゼ APOBEC3G と HBV ayw 株分子クローンを共発現させると、MOV10 は細胞内の HBV capsid 結合 HBV DNA レベルを顕著に抑制した。同様にこれまでの報告と一致して、DDX3 及び APOBEC3G も顕著に HBV 複製レベルを抑制したが、DDX6 は強制発現させても HBV 複製レベルには影響を与えなかった。一方、MOV10 をノックダウンさせた細胞では、コントロール細胞に比べて、細胞内 HBV capsid 結合 DNA レベルの増加がみられた。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。

D. 考察

本研究において、新たに HBV 増殖制御に関与する宿主因子として、MOV10 及び PML isoform I, PML

II、PML IV が同定された。MOV10 は P-body に局在する RNA ヘリケースで、これまで、HIV-1 や LINE-1 など逆転写酵素を保持し、ヒトゲノム内に組込まれるレトロエレメントの宿主抑制因子として知られている。HBV も同じ逆転写酵素を保持し、ヒトゲノムに組込まれる特徴をもつレトロエレメントなので、APOBEC3G 同様、MOV10 がレトロエレメント共通の宿主抑制因子であることが示唆された。

一方、PML (TRIM19)は核内で PML nuclear body (PML-NB, POD)を形成し、宿主細胞の転写制御、アポトーシス、細胞増殖制御に関与している。また、PML はインターフェロンにより誘導され、ある種のウイルスに対しては抗ウイルス因子として機能する。このため、多くの DNA ウイルスが PML を標的として、PML nuclear body 形成阻害や細胞質へのトラップにより、PML の抗ウイルス作用より逃れている。PML はスプライシングにより、種々の isoform の存在が知られ、各々、生理活性の特異性が報告されている。本研究により、PML I、PML II そして PML IV に強い抗 HBV 活性が確認された。一方、PML III、PML V、PML VI には抗 HBV 活性はなく、コントロールと同等レベルであった。今後、HBV 感染に伴う PML nuclear body の変化についても詳細に観察する必要がある。さらに HBV ゲノムの核内維持機構やヒトゲノムへの組み込みに PML が関与しているのか HBV cccDNA レベルやインテグレーションへの影響について検討する必要がある。

最近、TRIM ファミリーが HBV の生活環に関与する報告がなされたが、我々も本研究により、TRIM11 が強力な抗 HBV 因子であることを確認した。しかしながら、TRIM11 の抗 HBV 作用メカニズムの詳細については不明である。興味深いことに N 末端に存在する RING ドメインを欠損すると抗 HBV 活性は消失するので、ユビキチン活性の関与が示唆される。TRIM11 が HBV のどのタンパク質と相互作用し、ユビキチン化するのか、今後の検討課題である。また、

C 末端に存在する SPRY ドメインを欠損させても抗 HBV 活性は消失する。抗 HIV-1 因子として有名な TRIM5a も C 末端の SPRY ドメインを介して、HIV-1 capsid タンパク質と結合して、ユビキチン-プロテアソーム系で HIV-1 capsid タンパク質を分解することが知られている。しかしながら、本研究により、HBV capsid(コアタンパク質)と TRIM11 のみを 293T 細胞に共発現させても HBV capsid タンパク質レベルに影響なかったため、HBV の場合、他の HBV タンパク質が標的である可能性も残る。一方、TRIM11 は HBV pgRNA 発現レベルも顕著に抑制したので、抗 HBV 活性の作用点は、HBV 転写レベルか転写後の段階である可能性も示唆された。今後、TRIM11 の HBV cccDNA 発現レベルや HBV ゲノムのヒトゲノムへの組込みへの影響についても解析する必要がある。

E. 結論

- (1) TRIM11 ユビキチン E3 リガーゼが HBV 複製を抑制することを見いだした。
- (2) TRIM11 による HBV 抑制には、TRIM11 の RING ドメインと C 末端の SPRY ドメインの両方が必要であることが判明した。
- (3) PML isoform 特異的な抗 HBV 活性を確認した。PML I、PML II、そして PML IV には抗 HBV 活性が認められたが、PML III、PML V 及び PML VI は HBV 複製に影響を与えなかった。
- (4) P-body 因子 MOV10 RNA ヘリケースが HBV 複製を抑制することを見い

だした。

- (5) MOV10 は HBV コアタンパク質と細胞質で共局在し、両者が結合することを見いだした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ariumi Y. Multiple functions of DDX3 RNA helicase in gene regulation, tumorigenesis, and viral infection. *Frontiers Genet.* 5:423, 2014

2. 学会発表

- (1) Yasuo Ariumi. Tumor suppressor proteins restrict LINE-1 retrotransposition. Cold Spring Harbor Retroviruses Meeting. Cold Spring Harbor, New York, USA, May 19-24, 2014
- (2) Yasuo Ariumi. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. 1st International Symposium on Stress-Associated RNA Granules in Human Disease and Viral Infection (RNA Granules 2014). June 8-10, 2014, Halifax, Nova Scotia, Canada
- (3) Yasuo Ariumi. HIV-1 Vpr and p21^{Waf1/Cip1} restrict the LINE-1 retrotransposition. 15th Kumamoto AIDS Seminar. October 1-3, 2014, Kumamoto, Japan
- (4) 有海康雄.LINE-1 の転移因子と宿主因子. 2014 年度国立遺伝学研究所研究集会 「転移因子と宿主の相互作用による生命進化」2015 年 2 月 26 日-27 日,三島市,静岡.

G. 知的所得権の出願・登録状況 特になし

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

分担研究者：五十川 正記 名古屋市立大学大学院 助教
研究協力者：飯島 沙幸

分担研究課題：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

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染者の約1割では肝線維化を引き起こし、肝硬変・肝癌へと進展する。本研究は、HBV感染によって肝線維化が誘導される機序を明らかにすることにより、肝線維化を抑制する創薬開発の基盤となる情報を得る事を目的とする。ヒト肝キメラマウスにHBVが長期間感染すると、Toll like receptor (TLR)4シグナル経路の活性化、Reactive oxygen species (ROS)の産生亢進がみられ、肝線維化が引き起こされる。これらの背景をもとに、当該年度では、HBV感染が細胞内ストレスを誘導し、TLR4シグナル伝達経路を活性化させるという仮説をたて、培養系を用いて研究を進めた。その結果、HBVのpregenomic RNA (pgRNA)とDNA複製を誘導することにより、いくつかのERストレス関連遺伝子の発現上昇が認められた。一方で、細胞内ストレスを誘導すると報告のあったS抗原、X抗原の一過性強制発現では、ERストレス、ROS関連遺伝子の誘導は認められず、これらの抗原発現によるストレス誘導には発現期間が重要である可能性が示唆された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染者の約1割では、慢性肝炎の状態が続くことにより肝線維化を引き起こし、年率約2%で肝硬変へ移行し、その後肝細胞癌に進展する。肝線維化は肝硬変・肝癌の前段階と考えられているが、その誘導機序はあまり明らかとなっていない。本研究は、HBV感染によって肝線維化が誘導される機序を明らかにすることを目的とする。この研究から得られる情報は、肝線維化を抑制する創薬開発の基盤となることが期待される。

肝実質細胞をヒト肝細胞で置換されたヒト肝キメラマウスにHBVを感染させることにより、肝線維化が誘導されることが報告されている。肝線維化に特徴的な遺伝子

の発現をマイクロアレイによって網羅的に解析したところ、Toll-like receptor (TLR)4に関わる経路の活性化が認められた。HBVに感染させたキメラマウスを持続的に抗マウスTLR4抗体で処理したところ線維化進行が抑制された。このことはマウス由来の非実質細胞上のTLR4が肝線維化に重要な役割を果たしていることを示唆している。また線維化した肝組織では顕著なReactive oxygen species (ROS)産生が確認された。

これらの背景を基に当該年度ではHBV感染による細胞内ストレスの誘導が、肝線維化のカスケードを開始するという仮説をたて、HBVのウイルス因子が細胞内ストレスを誘導するかを検討した。

B. 研究方法

1. ウイルス複製による細胞内ストレス誘導の検討: テトラサイクリンによって HBV の pregenomic RNA (pgRNA) の発現が制御出来る 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。通常はテトラサイクリンを添加することによりウイルス複製を抑制した状態で培養している HepAD38 細胞からテトラサイクリンを除き pgRNA 発現及び HBV 複製を誘導した。コントロールグループとして、テトラサイクリンを添加したまま培養した HepAD38 細胞を使用した。テトラサイクリン除去後 6 日後から 10 日後まで連日細胞外の 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 α , ATF4, ATF6 の発現を real time PCR により定量し、pgRNA 発現とそれに伴う DNA 複製の誘導が細胞内ストレスを誘導するかどうかを検討した。

2. HBV 由来蛋白強制発現による細胞内ストレス誘導の検討: 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肝細胞癌由来 Huh-7 にトランスフェクションし、その 3 日後に上記に示した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。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換えについては学内委員会の

審査を得た。

C. 研究結果

以下は全て当該年度に得られた研究結果である。

1. ウイルス複製による細胞内ストレス誘導の検討: HepAD38 細胞培養液からテトラサイクリンを除去することにより細胞外の HBV DNA 量が増加した。また HBe 抗原の発現も認められ、cccDNA の形成を示唆した。対照的に HBs 抗原はテトラサイクリンを加えることにより減少がみとめられたが、詳細な機序は不明である。興味深いことに、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。

2. HBV 由来蛋白強制発現による細胞内ストレス誘導の検討: 次に HBV 由来の S 抗原、X 抗原を Huh-7 に一過性に強制発現し、上記に示したストレス関連遺伝子の誘導を検討した。S 抗原、X 抗原の強制発現はそれぞれ ER ストレス、ROS を誘導することで知られるが、予想に反して、今回の実験ではこれらの HBV 由来抗原の一過性発現によって、HepAD38 で認められたようなストレス関連遺伝子の発現は認められなかった。

D. 考察

以上の結果から、HBV pgRNA 発現もしくはそれに伴う HBV DNA 複製により、細胞内ストレスが誘導されるということが示唆された。興味深いことに、ER ストレス関連遺伝子のなかでも誘導されるもの、誘導されないもの、抑制されるものが認められた。ER ストレスは3つの異なる経路が報告されており、HBV pgRNA 発現もしくはそれに伴う HBV DNA 複製が、特異的な ER ストレス誘導経路を刺激している可能性が示唆された。今回の実験ではコントロール群としてテトラサイクリンを添加したまま培養した HepAD38 細胞を使用しているため、これらストレス関連遺伝子発現におけるテトラサイクリンの影響も除外する必要がある。また、予想に反して、S 抗原、X 抗原の一過性強制発現系では、有意な細胞内ストレスの上昇を認めなかった。しかしながら、これらの結果は S 抗原、X 抗原の発現期間が不十分であったことを反映している可能性が大きく、必ずしもこれらのウイルス抗原の細胞内ストレス誘導への関与を否定するものではない。

来年度は、初代肝細胞に HBV を感染させ、細胞内ストレスが HepAD38 細胞だけでなく、実際の感染系で誘導されるかどうかを検討する。また、HBV 感染によって肝細胞内でストレスが誘導される機序を明らかにするため siRNA を用いて、HBV 生成に必要な4つの mRNA を抑制し、どのタンパク、もしくは RNA がストレス生成に関与しているかを検討する。さらに、HBV の複製が細胞ストレスを誘導している可能性を検討するため、HBV DNA 複製を核酸

アナログで阻害し、そのストレスに対する影響を検討する。一方で、HBV 感染により TLR4 pathway が活性化するメカニズムを解明するため、まず、HBV を感染させた肝細胞と、ヒト抹消血から単離した NK 細胞、樹状細胞、マクロファージ、好中球を共培養し、これら非実質細胞における TLR4 pathway の活性化を検討する。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Isogawa M, Tanaka Y. The Immunobiology of Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology Res.* 2015 Jan;45(2): 179-89
- 2) 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)
- 3) Guidotti LG, Inverso D, Sironi L, Lucia PD, Fioravanti J, Fiocchi, Vacca AM, Aiolfi R, Sammicheli S, Mainetti M, Ganzer L, Cataudella T, Raimondi A, Gonzalez-Asequinolaza G, Protzer U, Isogawa M, Ruggeri ZM, Sitia G, Chisari FV, and Iannacone M. Determinants of hepatic CD8+ T cell trafficking and effector

function. Cell. *In press*

2. 学会発表

1. 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.
2. 堤 進, 渡邊 綱正, 村上 周子, 飯島 沙幸, 飯尾 悦子, 松波 加代子, 新海 登, 松浦 健太郎, 五十川 正記, 田中 靖人: 大量調整可能なヒト肝細胞を用いた HBV in vitro 感染培養系を利用した創薬探索の可能性. 第 50 回日本肝臓学会総会. 平成 26 年 5 月 29 日-30 日. 東京. WS3-2.
3. 五十川 正記, 村田 泰洋, 田中 靖人: : HBV 特異的エフェクター CD8+ T 細胞応答誘導における樹状細胞の役割. 第 50 回日本肝臓学会総会. 平成 26 年 5 月 29 日-30 日. 東京. WS10-4.
4. 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+ T cell responses. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep. 3-6, 2014, Los Angeles, USA. O-91
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 林 佐奈衣, 五十川 正記, 村上 周子, 飯島 沙