

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.

11. 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

12. 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

13. 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

14. Hayashi S, Khan A, Simons BC, Jones CL, Homan C, McMahan 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

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
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(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:榎本 信幸 山梨大学医学部第一内科 教授
研究協力者:前川 伸哉 山梨大学医学部第一内科 講師

分担研究課題:HBV preS 領域変異の解析

研究要旨:本研究班において分担者はHBV のpreS領域に注目し、肝病態形成における同領域変異の意義を臨床的・基礎的解析を通じて詳細に明らかとし、創薬における標的分子を明らかにしてゆく。H25年度までにdeep sequenceを導入し、宿主内に存在する様々なpreS変異体を定量的に測定するシステムを構築、preS変異体の混在比がB型肝炎の進行と関連すること、PreS変異体混在比上昇に伴って、血中HBs抗原量が低下することを示してきた。そこでH26年度は、肝疾患病態形成におけるpreS変異の関与について、HBs抗原、あるいは肝細胞内cccDNAからのmRNA転写活性を反映するマーカーであるHBcr抗原等との詳細な関連解析を行うことにより、さらに明らかとすることを試みた。

その結果、LC/HCC症例ではHBs抗原低値かつ HBcr抗原高値となる乖離症例に多く、このような症例においてpreS変異が有意に多いことが示される一方、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ることが示された。すなわちpreS変異解析は各症例における肝疾患進行予測に有用な解析であり、さらにHBsAg、HBcr抗原を組み入れることによって、詳細な病態理解が可能になることが考えられた。

A. 研究目的

本研究班では B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染複製増殖機構を基礎的に明らかとすることによって、創薬における標的候補分子を同定し、新規治療薬開発を行ってゆくことが大きな目的である。

本研究班において分担者は臨床的側面から、高頻度に変異あるいは欠失が認められるHBV の preS 領域に注目し、肝病態形成における同領域の意義を臨床的・基礎的解析を通じて詳細に明らかとし、創薬における標的分子を明らかにしてゆく。

H25 年度までに分担者は HBV preS 領域をターゲットとした deep sequence を導入することにより、宿主内に存在する様々な preS 変異体を定量的に測定するシステムを構築し、B 型慢性肝疾患 72 症例に対し同システムを用いて preS 変異を解析、各症例における preS 変異体の混在比が B 型肝炎の進行と関連すること、さらに preS 変異体混在比上昇に伴って、血中 HBs 抗原量が低下することを示してきた。

そこで H26 年度は肝疾患病態形成における preS 変異の関与について、HBs 抗原、ある

いは肝細胞内 cccDNA からの mRNA 転写活性を反映するマーカーである HBcr 抗原等との詳細な関連解析を行うことにより明らかとすることを試みた。

B. 研究方法

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 領域をパイロシーケンサーをもちいて 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詳細に検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は山梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

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。

D. 考察

高感度な deep sequencing 解析により preS 変異は肝疾患進行および HBs 抗原低値と関連し、HBs 抗原低値かつ HBcr 抗原高値は肝疾患進行のハイリスクであることが明らかとなった。すなわち preS 変異解析は各症例における肝疾患進行予測に有用な

解析と考えられた。既存マーカーの HBV-DNA、HBsAg、HBeAg に加え、preS 変異・HBcr 抗原を組み入れることによって、詳細な病態理解が可能になることが考えられた。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsunami H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet.* 2015 Mar;134(3):279-89.
2. Itakura J, Kurosaki M, Takada H, Nakakuki N, Matsuda S, Gondou K, Asano Y, Hattori N, Itakura Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Takahashi Y, Maekawa S,

- Enomoto N, Izumi N. Naturally occurring, resistance-associated hepatitis C virus NS5A variants are linked to IL28B genotype and are sensitive to interferon-based therapy. *Hepatol Res.* 2015 Jan 6. doi: 10.1111/hepr.12474. [Epub ahead of print]
- 3 . Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K. Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepatitis virus. *J Virol.* 2014 Nov 15;88(22):13352-66.
- 4 . Tatsumi A, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Liver stiffness measurement for risk assessment of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2014 Jun 24. doi: 10.1111/hepr.12377. [Epub ahead of print]
- 5 . Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Deep sequencing analysis of variants resistant to the non-structural 5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatol Res.* 2014 Feb 25. doi: 10.1111/hepr.12316. [Epub ahead of print]
- 6 . 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 Dec;44(13):1339-1346.
- G. 知的所得権の出願・登録状況
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（平成26年度）

HBx タンパク質と相互作用する細胞側因子の同定

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：B型肝炎ウイルス(HBV)が持つHBxタンパク質は、HBV感染における発癌だけでなく、ウイルス複製にも関与することが知られているが、未だHBxの機能は不明が多い。そこで、HBxの宿主細胞における機能を明らかにすることを目的として、HBxと相互作用する分子を質量分析で網羅的に解析した。同定されたタンパク質の1部をクローニングし、HBxタンパク質との相互作用を検討したところ、ヒストンの脱メチル化に関与するJumonji Cドメインを持つJMJD5を同定した。JMJD5を欠損したHuh7細胞を作製し、HBV複製への影響を調べると、JMJD5欠損細胞と比較して、欠損細胞にJMJD5を発現させる事で顕著にHBV複製が上昇した事から、JMJD5はHBV複製に関与するHBx結合タンパク質であることが示唆された。HBxを翻訳できないHBV発現プラスミドを用いた解析により、JMJD5欠損細胞は、HBxタンパク質を発現させてもHBV複製を回復しなかった事から、HBxによるHBV複製亢進にはJMJD5が必須であることが分かった。

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。HBVがコードしているHBxタンパク質は、HBVが引き起こす肝細胞癌の原因タンパク質であることがいわれており、さらにはHBVの効率の良い複製にも関与していることが報告されている。したがって、HBxタンパク質やHBxタンパク質が相互作用している宿主タンパク質を標的とする化合物ができれば、HBVの複製だけでなく、肝癌の抑制にもつながり有用な新規治療薬となると考えられる。本研究では、HBxタンパク質と相互作用する宿主タンパク質を同定し、その相互作用の意義を検討することで、新しいHBV治療薬候補を同定することを目的とした。

B. 研究方法

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。

(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

今回検討したJMJD5は免疫沈降法により、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 アミノ酸で結合していることが明らかとなった。また、HBV の感染性粒子を発現している 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。

D. 考察

JMJD5 はヒストン脱メチル化に関与するタンパク質であり、JMJD5 が標的とする分子が HBV 複製に関与していることが考えられる。HBx はそれ自身に DNA 結合能はないが、様々な遺伝子発現を制御していることが報告されていることから、JMJD5 が HBx による遺伝子発現制御に関与していることが示唆できる。

E. 結論

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。

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. Brumatti G, Salmanidis M, Kok CH, Bilardi RA, Sandow JJ, Silke N, Mason K, Visser J, Jabbour AM, Glaser SP, Okamoto T,

Bouillet P, D'Andrea RJ, Ekert PG. HoxA9 regulated Bcl-2 expression mediates survival of myeloid progenitors and the severity of HoxA9-dependent leukemia. *Oncotarget*. 4(11) 1933-47 (2013)

4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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関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
 2. 実用新案登録
 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（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： 加藤孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
研究協力者： 山田典栄 国立感染症研究所ウイルス第二部

分担研究課題：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

研究要旨：B型慢性肝炎治療薬であるエンテカビルは耐性ウイルス出現頻度が低いが、投与の長期化に伴い薬剤耐性ウイルスが出現する例や反応不良例が存在する。このような症例から得られたHBV株の複製モデルコンストラクトを構築しHepG2細胞に導入した後に、サザンブロット法およびRTD-PCR法でHBVの複製とエンテカビル感受性について評価した。その結果、ラミブジン耐性として知られていた変異がエンテカビル感受性の低下にも関与していることが明らかとなった。また複製能の高いHBV株の出現が一過性ウイルス上昇の原因となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在、B型慢性肝炎に対する治療には主に核酸アナログ製剤が用いられている。核酸アナログ製剤は、強いウイルス増殖抑制作用をもつが、投与を中止するとウイルスが再上昇し病態悪化を生じるため、その投与は長期間に及ぶことが多い。そのため長期投与に伴う耐性ウイルスの出現は临床上、重要な問題である。エンテカビル(ETV)は耐性ウイルス出現頻度が4年で0.4%と低い。しかし、このETV投与症例の中でも投与の長期化に伴い、少数ではあるが薬剤耐性ウイルスが出現する例や反応不良例が存在する。本研究では、これら耐性ウイルスの存在が疑われる症例からHBV-DNAを分離し、そのゲノム中で既報のETV耐性変異や他の耐性変異となり得る変異の有無を確認した上で、培養細胞での薬剤感受性評価系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 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。これらの症例の治療開始前、開始後の複数ポイントの患者血清より HBV DNA を抽出し、ポリメラーゼの RT 領域を PCR で増幅し、ダイレクトシーケンス法にてその塩基配列を解析した。

(2) 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、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 法を用いて HBV 複製能と薬剤感受性の評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた慢性肝炎患者由来試料はインフォームド・コンセントを得て採取された検体であり、その使用については「臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)」に準拠し、国立感染症研究所の「ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」に申請し承認を得ている(申請番号377)。

C. 研究結果

(1) 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、下記のようにその他の部位に変異を認めた。(症例 1) ETV 投与により HBV-DNA が検出感度未満になったが投与中に再上昇しその後も高値が持続し耐性が疑われた症例。この症例では、rtV173L, rtL180M, rtM204V のラミブジン耐性変異のみ認めた。(症例 2) ETV 投与開始後 1 年以上経過後も十分な HBV-DNA 量の低下が見られず、HBV-DNA 陽性のまま経過した症例。この症例では、rtI122L, N123H の変異を認めた。(症例 3) ETV 投与により HBV-DNA が検出感度未満になったが投与中に一過性に再上昇しその後自然の経過で陰性化した症例。この症例では、rtV191I のアミノ酸変異を認めた。

(2) 患者から得られ 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、(症例 1) では、rtV173L, rtL180M, rtM204V の変異を有する株は ETV 感受性が不良であった。(症

例 2) では、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。(症例 3) では、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。

D. 考察

ETV 耐性が疑われる変異を含む 1.4 倍長のゲノム配列を持つ複製モデルコンストラクトを作製し、これを HepG2 細胞に導入することで複製をサザンブロット法で確認し得た。さらに導入細胞を ETV で処理し、HBV core 粒子内の HBV DNA を検討した結果、サザンブロット法で HBV 複製の低下を認め、この系により ETV の薬剤感受性が評価可能であった。同様に処理した検体を用い、より正確で鋭敏な評価が可能な RTD-PCR 法を用いて HBV DNA 量を測定したところ、サザンブロット法で得られたデータと同等の ETV による複製阻害が観察された。以上の結果は、core 粒子内の HBV DNA を抽出することによりサザンブロット法と RTD-PCR 法で一致した複製の評価が可能であることを示していると考えられた。この系を用いて、ETV 特有の耐性変異がないが LAM 耐性変異である rtV173L, rtL180M, rtM204V を導入することで、ETV の感受性が不良になることを示した。また、rtV191I の変異により薬剤感受性は変わらないが HBV 複製が増加することで ETV 投与中の一過性のウイルス上昇の原因となる可能性が示唆された。rtI122L, N123H の変異を有する株は複製能および ETV 感受性に差を認めず、ETV 感受性不良の原因として RT 領域以外の変異や宿主側因子の検討が必要と考えられた。

E. 結論

本研究で用いた薬剤感受性評価系で、他の薬剤に対する感受性も評価が可能である。他の症例も同様の解析を行うことで、新規薬剤耐性変異の同定が期

待できる。今後 ETV 投与長期化に伴い耐性例および反応不良例の増加が予測される。本研究で用いた系はこれら 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2. 学会発表

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

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：加藤 直也・東京大学 医科学研究所 先端ゲノム医学分野・准教授
分担研究課題：HBxの組み込み様式とその機能解析

研究要旨：1) B型肝炎ウイルス (HBV) のX蛋白 (HBx) は肝発癌と深い関連がある。公開されているデータベースを用いてジェノタイプCのHBxの肝癌関連変異を検討した。ロジスティック回帰により肝癌グループと非肝癌グループで有意に異なる7塩基変異 (5アミノ酸置換) を見出した。これらのアミノ酸変異は他のジェノタイプにて主たるシーケンスであるなどの特徴があった。2) HBxはトランス転写活性化能を有しており、この転写活性化能はHBxによるHBVの増殖促進作用に重要であり、cccDNAの維持にも関わっており、HBxの転写活性化能を阻害する薬剤は、HBVの複製を阻害する薬剤、ひいてはcccDNAを駆除する薬剤となる可能性がある。そこで、HBxの転写活性化能を指標としての薬剤スクリーニング系を確立し、HBxのNF- κ B活性化阻害薬同定した。

A. 研究目的

1) B型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) は肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma: HCC) の主要な病原因子の1つである。本邦においても肝細胞癌による死亡は年間3万人を超え、その10~20%にHBVが関与している。HBV遺伝子には4つのORF (S, P, X, C遺伝子) が存在しており、このうちX遺伝子より転写・翻訳されるX蛋白 (HBx) のトランスジェニックマウスでは発癌が認められることから、HBxは発癌と深い関連があるといわれている (Nature 1991)。

発癌に関連するHBV X遺伝子変異に関しては今までに多くの報告があるが、その結果は必ずしも同じ傾向にあるとは言い難く、ばらついている。そこで、われわれは①公開されているデータベースを用い、②発癌と最も関連していると言われ、日本に多いジェノタイプCに限定し、③病期が明らかなサンプルを選び、HBxの肝発癌に関わる変異を同定することを目的として研究を行った。

2) HBV X遺伝子はHBVの感染成立、維持に重要であることがわかっている。X遺伝子にストップコドンを導入し、HBxを作る

ことの出来ないHBVは極めて感染効率が悪く、増殖能も著しく劣っている。また、HBxはトランス転写活性化能を有しており、このトランス転写活性化能はHBxによるHBVの増殖促進作用に重要である。したがって、HBxの転写活性化能を阻害する薬剤は、HBVの複製を阻害する薬剤となる可能性がある。そこで、HBxの転写活性化能を指標として、HBxの転写活性化能を阻害する薬剤のハイスループットスクリーニング系を確立し、まずは米国食品医薬品局 (FDA) 承認薬剤を用いての一次スクリーニングを開始した。なお、HBxのトランス転写活性化能は、持続感染の維持、すなわち covalently closed circular (CCC) HBV DNAの維持にも関わっている可能性があり、HBxの転写活性化能を阻害する薬剤は、HBVの持続感染を阻止し得る可能性がある。

B. 研究方法

1) HBV X遺伝子のシーケンスはグローバルデータベースよりダウンロードした。これらデータベースから、①全長のHBV X遺伝子シーケンスであること、②ヒト血清より得られたものであること、③病期、

特に肝細胞癌の有無が明らかであること、を条件に 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 χ^2 検定、ロジスティック回帰を用いた。得られた肝癌関連変異につき、病期別の変異頻度を検討した。

2) まず、CAG プロモーター下に HBx (ジェノタイプ D) を発現するプラスミドを肝癌細胞である Huh7 細胞内に導入、HBx を発現させ、SRE、SRF、CRE、NF- κ B、NF-AT、AP-1、Wnt/ β -catenin 各シグナル伝達経路の活性化につきルシフェラーゼを用いたりポーターアッセイにより検討した。活性化が顕著に認められるシグナル伝達系である NF- κ B を選択し、Huh7 細胞を用いて、リポーターベクターの stable transfectant の樹立を試みた。Stable transfectant は TNF- α に対する反応性を指標として選択した。次に、複製可能なジェノタイプ C の HBV の 1.4 倍長ゲノムを含むプラスミドから X 遺伝子をテトラサイクリン存在下で発現するベクターにサブクローニングした。HBx には FLAG タグを付与した。本ベクターを前述のリポーターベクターの stable transfectant にトランスフェクションし、double stable transfectant を得て、FDA 承認薬剤を用いて HBx の転写活性化能を阻害する薬剤の一次スクリーニングを行った。

(倫理面への配慮)

1) 本研究では、B 型肝炎患者より得られた HBV の塩基配列情報は、公開された公的なデータベースより入手したものであり、倫理面の問題はないと判断される。東京大学医科学研究所研究倫理審査委員会にも打診し、倫理審査が不要である旨、確認済みである。

2) 本研究では、樹立された培養肝癌細胞以外にはヒト由来のサンプルを使用せず、かつ、すべて in vitro の実験であり、倫理面の問題はないと判断される。

C. 研究結果

1) 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、29 の地域に渡る全長の X 遺伝子領域を含む 1,115 シークエンス (肝癌グループの 161 シークエンス、非肝癌グループの 954 シークエンス) を解析対象とした。そのうち、ジェノタイプ C は非肝癌グループの 41% (387/954)、肝癌グループの 89% (144/161) を占めていた。

まず、核酸ベースで、 χ^2 検定を行ったところ、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。

これら 16 塩基につき、ロジスティック回帰分析を行ったところ、独立して肝癌と関連する 7 塩基変異、A1383C (OR: 2.32, 95%CI: 1.34-4.01)、A1479C/T (1.96, 1.05-3.64: 5.15, 2.53-10.48)、C1485T (2.40, 1.41-4.08)、C1631T (4.09, 1.41-11.85)、C1653T (2.58, 1.59-4.19)、G1719T (2.11, 1.19-3.73)、T1800C (23.59, 2.25-247.65) を抽出し得た。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。

これらの肝癌関連 7 塩基変異の中には、他のジェノタイプでは早期にメジャータイプとして存在しているものもあった。

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。

2) Huh7 細胞にジェノタイプ D の HBx を CAG プロモーター下に発現するプラスミドと、SRE、SRF、CRE、NF- κ B、NF-AT、AP-1、Wnt/ β -catenin の各シスエンハンサーエレメントをルシフェラーゼ遺伝子の上流にもつプラスミドを共トランスフェクションし、細胞内シグナル伝達系の活性化をリポーターアッセイにより検討した。HBx は NF- κ B を約 3.2 倍と最も活性化した。そこで NF- κ B レポーターベクターを恒常的に保持する Huh7 細胞を樹立した。バックグラウンドノイズが少なく、TNF- α による誘導が良好なクローンを選択し、

Huh7#2NFkB luc と名付けた。また、FLAG タグを持つジェノタイプ C の HBx を CMV プロモーターの下流にクローニングし、作成したベクターを Huh7#2NFkB luc にトランスフェクションし、NF-κB を約 3.9 倍まで活性化することを確認した。テトラサイクリンの存在下で発現するベクターを構築し、Huh7#2NFkB luc にトランスフェクションし、double stable transfectant 細胞を得た。この double stable transfectant 細胞にテトラサイクリンを加え、NF-κB を活性化、そこに FDA 承認薬を添加し、HBx の NF-κB 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 は合成カテコラミンの一種で、アドレナリン β 受容体作動薬である。今までにも IκB を安定化して、NF-κB 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-κB 特異的で HBx 特異的ではないと考えられるが、このシステムが機能していることの証明が出来た。現在、HBV 複製・増殖や cccDNA への作用を検討中である。

D. 考察

1) B 型肝炎における肝発癌と関連する HBx のアミノ酸変異を 5 か所同定した。これら 5 アミノ酸置換は、肝癌に関連しているが、慢性肝炎、肝硬変の状態から存在しており、肝癌に特異的な変異ではないことから、この変異と HBx の肝発癌における機能との関連については更なる検討が必要である。今後、HBx の様々な機能に及ぼす本アミノ酸置換の影響につき、検討を進める必要がある。

2) HBx のもつトランス転写活性化能を阻害する薬剤のスクリーニング系を確立し、実際に HBx の NF-κB 活性化を阻害する化合物を複数同定しつつある。これら薬剤は、B 型肝炎ウイルスの複製を阻害するのみならず、持続感染を阻止する可能性があると思われる。

E. 結論

1) 肝癌関連 HBx 変異を同定した。
2) 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-κB 活性化を阻害する薬剤を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto K, Kato N. MICA SNPs and the NKG2D system in virus-induced HCC. J Gastroenterol 2014 (epub ahead of print)
- 2) 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

2. 学会発表

- 1) Wenwen Li, Ryosuke Muroyama, Kaku Goto, Ryo Nakagawa, Masaya Sato, Norie Kowatari, Qiang Li, Masao Omata, Kazuhiko Koike, Naoya 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
- 2) 後藤覚、室山良介、加藤直也. GWAS により同定された肝癌感受性遺伝子 MICA の発現制御を介した肝発癌抑止戦略. 第 50 回日本肝臓学会総会. 2014 年 5 月 29-30 日
- 3) 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

- 4) 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
- 5) Ryosuke Muroyama, Kaku Goto, Wenwen Li, Yasuo Matsubara, Ryo Nakagawa, Sayaka Ito, Naoya 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

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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：菅 裕明 東京大学 教授

研究協力者：Passiaura Toby

分担研究課題：HBV タンパク質に結合する環状ペプチドの探索

研究要旨：本研究分担班は、独自に開発したRaPIDシステムを駆使し、B型肝炎ウイルス感染における新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指す。本研究期間に、NTCPPタンパク質等、疾患に関連した標的蛋白質に結合する特殊ペプチドを発見し、その生物活性について検討、薬剤開発への糧となるシーズを提供する。

A. 研究目的

本研究分担班は、独自に開発した RaPID システムを駆使し、B 型肝炎ウイルス感染における新規標的や疾患関連因子に対し、環状特殊ペプチド薬物リードを発見することを目指す。本研究期間に、NTCPP タンパク質に結合する特殊ペプチドを発見し、その生物活性について検討、薬剤開発への糧となるシーズを提供する。

B. 研究方法

当研究室で独自に開発した 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。

(倫理面への配慮)

本研究はヴィトロを中心としており、倫理面への配慮を特に必要ないが、全て P2 レベルで実験は行っている。また、共同研究者が行う動物個体を用いた実験については、所属機関のルールに則って行った。

C. 研究結果

NTCPP タンパク質は HBV がヒト細胞に感染する過程においてそのレセプターとなることが知られている。本年度の研究では、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。

D. 考察

上記の 5 種類の活性種の配列を比較した結果、4 種類の配列で類似配列があることがわかり、これらの配列が活性になんらかの重要な寄与をしていることが推測された。さらに、トランスポーター阻害を持たない 2 種類のペプチドはいずれも類似配列を共通してもつこともわかり、この配列モチーフが活性発現には重要であることが示唆された。

E. 結論

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。

さらに、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の同定にも成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

*責任著者を示す。

T. Passioura; H. Suga* "Reprogramming the genetic code in vitro" **Trends in Biochemical Sciences** 39, 400-408 (2014).

K. Torikai; H. Suga* "Ribosomal synthesis of an amphotericin-B inspired macrocycle" **Journal of the American Chemical Society** 136, 17359-17361 (2014).

N.K. Bashiruddin; H. Suga* "Construction and screening of vast libraries of natural product-like macrocyclic peptides using in vitro display technologies" **Current Opinion in Chemical Biology** 24C, 131-138 (2014)

R. Watanabe, N. Soga, D. Fujita, K.V. Tabata, L. Yamauchi, K.S. Hyeon, D. Asanuma, M. Kamiya, Y. Urano, H. Suga*, H. Noji "Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity" **Nature Communications** 5, 4519 (2014).

Y. Goto, Y. Ito, Y. Kato, S. Tsunoda, H. Suga* "One-pot synthesis of azoline-containing peptides in a cell-free translation system integrated with a posttranslational cyclodehydratase" **Chemistry & Biology** 21, 766-774 (2014).

N. Terasaka, G. Hayashi, T. Katoh, H. Suga* "An orthogonal ribosome-tRNAs pair via the engineering of peptidyl transferase center" **Nature Chemical Biology** 10, 555-557 (2014).

C.J. Hipolito, N.K. Bashiruddin, H. Suga* "Protein cocrystallization molecules originating from in vitro selected macrocyclic peptides" **Current Opinion in Structural Biology** 26, 24-31 (2014).

A. Kodan, T. Yamaguchi, T. Nakatsu, K. Sakiyama, C.J. Hipolito, A. Fujioka, R. Hirokane, K. Ikeguchi, B. Watanabe, J. Hiratake, Y. Kimura, H. Suga, K. Ueda, H. Kato. "Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog" **Pro. Nat. Acad. Sci.** 111, 4049-4054 (2014).

T. Passioura, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga* "Selection-based discovery of druglike macrocyclic peptides" **Annual Review in Biochemistry**, Feb. 12 (2014).

K. Yamagata, Y. Goto, H. Nishimasu, J. Morimoto, R. Ishitani, N. Dohmae, N. Takeda, R. Nagai, I.

Komuro, H. Suga*, O. Nureki "Structural Basis for Potent Inhibition of SIRT2 Deacetylase by a Macrocyclic Peptide Inducing Dynamic Structural Change" **Structure** 22, 345-352 (2014).

2. 学会発表

2014 American Association of Cancer Research, San Diego, 4/6, 2014.

Bachem symposium "Macrocycles and Constrained Peptides", Basel, Switzerland, 4/9, 2014.

Next Generation Protein Therapeutics Summit, San Francisco, USA, 6/5, 2014.

Japanese Society of Chemical Biology, Osaka, Japan, 6/11, 2014.

Chemical Biology meets Drug Discovery meeting, Royal Society of Chemistry, Surrey, UK, 6/12, 2014.

Pre-COST meeting "Innovation", Siena, Italy, 6/25, 2014

International Conference on Medicinal Chemistry 2014, Rouen, France, 7/1, 2014

The Origin 2014, Nara, Japan, 7/10, 2014

Soyaku (drug development) seminar, Yatsugatake, Japan, 7/23, 2014

Switzerland-Japan Chemical Biology Symposium, Bern, Switzerland, 8/1, 2014

Japanese Peptide Society Symposium, Akabori Memorial Award 2014 Lecture, Tokushima, Japan, 10/22, 2014

Development and Application of Naturel Products, Tokyo, Japan, 11/05, 2014

Cold Spring Harbor Asia "Synthetic Biology", Suzhou, China, 12/04, 2014

Joint symposium of the Institute of Convergent Technology at Seoul National University and the Research Center for Advanced Science and Technology at the University of Tokyo, Seoul, Korea, 11/28, 2014

Asian Chemical Biology Symposium, Singapore, 12/15, 2014

G. 知的所得権の出願・登録状況

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（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：鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授
研究協力者：中島 謙治 浜松医科大学感染症学講座 特任研究員

分担研究課題：HBV 遺伝子発現における転写後調節機構の解析

研究要旨：

HBV の遺伝子発現機構、特に転写後調節（RNA 分解、スプライシング、RNA 輸送）に働く宿主因子を探索した。プロテオーム解析で見出した HBV 転写後調節エレメント結合因子群のうち、ノックダウンまた強制発現解析から hnRNP の一種、AUF1 が HBV 複製を負に制御することを見出した。AUF1 は HBV プレゲノム RNA の cis-element として知られている PRE（post-transcriptional regulatory element）と直接結合し、同 RNA を不安定化することが明らかとなった。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）キャリアの数は、世界的には3億5000万人にのぼると推定される。HBV 感染症の対する治療薬として核酸アナログ製剤、インターフェロンなどが使われているが、ウイルス DNA の完全排除は困難なこと、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題があり、根治療法は確立されていない。現行の治療薬とは機序の異なる新規治療薬の開発が待望されており、そのために HBV の感染複製増殖機構の解明が重要である。

HBV の生活環において、転写後、プレゲノム RNA（pgRNA）は細胞質へ輸送されカプシドへパッケージングされる。pgRNA の核外輸送は HBV の複製増殖に必須と考えられ、HBV RNA 内に post-transcriptional regulatory element（PRE）が存在することは知られているが、関与する宿主因子とそ

の役割など調節機構は十分に解明されていない。また、pgRNA の一部はスプライシングされるが、その意義、調節機構は必ずしも明らかでない。本研究では、HBV 遺伝発現における転写後調節機構、特に、pgRNA の核外輸送、安定性制御またスプライシングの分子機構の解明を目指す。

B. 研究方法

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。これを pcDNA3.1（Invitrogen 社）にサブクローン化し、N 末端に FLAG タグを付加した形で各 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（遺伝子型 Ce）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 結合因子のノックダウン解析では、各 20nM siRNA (Invitrogen 社 Silencer siRNA) を Lipofectamine RNAiMAX で HuH-7 細胞へ導入し、36 時間後に HBV ゲノムプラスミド (前述) 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。

(倫理面への配慮) 株化細胞のみを用いた研究であり該当しない。

C. 研究結果

プロテオミクスの手法を利用して、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。この中には RNA の二次構造、二重鎖 RNA を認識するもの、mRNA の輸送、スプライシングに関与するものなどが含まれていた。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。

AUF1 を HBV 複製細胞で強制発現させると、プレゲノム RNA レベルは顕著に低下した。RNA 分解への AUF1 の影響を解析するため、HBV 複製細胞へアクチノマイシン D を添加して RNA 合成を止めた後、経時的にプレゲノム RNA 量を測定したところ、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。

AUF1 が PRE RNA に結合しうるかを調べるた

め、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 と直接結合しうるということが明らかとなった。

D. 考察

AUF1 は、RNA 結合能を持ち hnRNA と複合体を形成する hnRNP ファミリーの一員で、RNA の代謝や安定性の制御に関連することが知られている。mRNA の不安定化に働く AU-rich element (ARE) への結合し、これにより AUF1 は ARE を持った mRNA の不安定化に寄与することが多数報告されている。今回の解析で、HBV プレゲノム RNA は AUF1 との結合により不安定化が促進されることが見出された。AUF1 依存的なプレゲノム RNA 分解のメカニズム解析を進めることによって、新たな創薬標的を見出すことが期待される。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- α in Infectious Virus Production. J

- Virol.** 88: 7541-7555, 2014.
2. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. **J Virol.** 89: 2220-2232, 2015.
 3. Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuniyasu H, and Kondoh M. Monoclonal Antibodies against Extracellular Domains of Claudin-1 Block Hepatitis C Virus Infection in A Mouse Model. **J Virol.** (in press).
 4. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. **J Gen Virol.** 95: 2658-2667, 2014.
 5. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. **J Virol Methods** 207: 38-44, 2014.
 6. Lee J, Ahmed SR, Oh S, Kim J, Suzuki T, Parmar K, Park SS, Lee J, Park EY. A plasmon-assisted fluoro-immunoassay using gold nanoparticle-decorated carbon nanotubes for monitoring the influenza virus. **Biosens Bioelectron.** 64: 311-317, 2014.
 7. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. **Biosens Bioelectron.** 58:33-39, 2014.
2. 学会発表
 1. 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.
- G. 知的所得権の出願・登録状況
- なし
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（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：大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 巽 智秀
研究協力者：大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 中堀 輔
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 横山恵信
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 田中聡司
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 疋田隼人
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 宮城琢也
大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 竹原徹郎

分担研究課題：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

研究要旨：オートファジーとは、蛋白質をバルク的に分解する機構の1つである。しかしオートファジーのHBV感染・増殖に対する関与は未だ不明な点が多い。そこで、本研究ではHBV感染による肝細胞オートファジーの変化と、オートファジーの変化がHBV複製・増殖に与える影響を解析し、オートファジーの調節によりHBVの抑制・排除治療の可能性を検討することを目的とした。まず、HBV感染による肝細胞オートファジーの変化を検討するため、HBV感染が可能なNTCP強制発現細胞株の樹立を行った。しかし樹立した細胞に、1細胞あたり5000ゲノムのHBVDNAを接種しても、感染は成立したが極めて感染効率は悪かった。そこで国立感染症研究所の渡士先生らのグループが樹立したHepG2-hNTCP-C4細胞株を用いて、1細胞あたりをHBV1000から20000ゲノムコピーを接種した。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。このHepG2-hNTCP-C4細胞にHBVを感染させると、LC3-IIの亢進およびp62の蛋白レベルでの減少を認め、オートファジーは亢進したと考えられた。次にオートファジーの変化によってHBV持続感染がいかに変化するかを検討するため、長期にわたり安定してHBVが持続感染する細胞としてヒト肝細胞キメラTK-NOGマウスより単離した初代培養肝細胞を使用した。この細胞に1細胞あたり500ゲノムコピーのHBVを接種したところ、上清中に持続してHBs及びHBe抗原が検出され、HBV-DNAも1か月以上検出可能であった。この細胞に患者血清由来HBVを500ゲノム投与し、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亢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。以上より、HBV感染肝細胞のオートファジーの亢進はHBV複製・増殖を抑制し、オートファジーの抑制はHBV複製・増殖は亢進させると考えられた。今後オートファジーの変化がウイルスの複製・増殖・再感染の各ステップに与える影響、およびウイルス認識機構や細胞内免疫シグナルへの影響を個別に検討することで、オートファジーの調節によるHBV排除を目的とした創薬につながると考える。