

## A. 研究目的

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。2重の隔離膜で分解物を囲い込み、オートファゴソームが形成された後に、リソソームと融合しオートライソソームとなって内容物が分解される。オートファジーはオルガネラの分解によりアミノ酸を産生するため、飢餓に陥った時のエネルギー源として働くことが知られている。また、オートファジーは飢餓などで誘導されるだけではなく、常に一定のレベルで起こっている。この作用により、劣化したミトコンドリアや不良蛋白質は排除され、オートファジーは細胞の恒常性を保つ上でも重要な意義を持っていると考えられている。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。

## B. 研究方法

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HepG2細胞株を作成した。また、分担研究員である国立感染症研究所の渡士幸一研究員より同様に作成したHepG2-hNTCP-C4細胞株を提供いただいた。

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。

イノキュラムとして、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ト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。

遺伝子組み換えウイルス作成実験に該当する実験は、文部科学大臣の拡散防止措置の確認の受けたうえで、大阪大学遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行った。その

他の遺伝子組み換え実験は、大阪大学遺伝子組換え安全委員会の承認のもと行った。

(倫理面への配慮)

臨床検体を用いた実験は、大阪大学医学部附属病院の倫理委員会もしくは大阪大学医学部倫理委員会の承認もと、インフォームドコンセントを得た上で行った。すべての動物実験は、大阪大学医学部動物実験委員会承認のもとで、愛護的に行った。

## C. 研究結果

HBV感染によるオートファジーの評価を行うため、HBV感染が可能なNTCP強制発現細胞株の樹立を行った。樹立したNTCP強制発現細胞株の中で最もNTCPのmRNA発現が高かった細胞株に、1細胞あたり5000ゲノムのHBVDNAを接種した。イノキュラムとしてはHEPG2.2.15細胞で産生されるHBVの上清を濃縮して使用した。HBV接種9日後には上清中にHBs抗原を検出し、細胞免疫染色にてもHBs抗原陽性細胞は検出可能であった。しかし感染効率は極めて低く、持続的なHBs抗原産生は認めなかった。

そこで、すでにHBV感染の成立が報告されている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ゲノムコピー摂取した。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HepG2-hNTCP-C4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。オートファジーの評価としてオートファゴソームの指標となる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日経過した細胞では、LC3-IIの亢進を認め、オートファゴソームの増加が示唆された。またmRNAレベルでp62の減少は認めないが、蛋白レベルで減少し、これらの結果から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。

次にオートファジーの変化によってHBV

持続感染がどのように変化するかを検討するために、長期にわたって安定して HBV が持続感染する細胞としてヒト肝細胞キメラ TK-NOG マウスから単離した初代培養肝細胞を使用した。この肝細胞は 2 か月以上にわたって培養維持が可能であった。また、アルブミンの産生や CYP 3A4 などの CYP 活性も維持されていることを確認した。イノキュラムとして 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トした細胞の培養上清を濃縮して、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。そこで、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・増殖は亢進されることが考えられた。

#### D. 考察

研究遂行により、HBV ウイルスが肝細胞感染すると、肝細胞オートファジーが亢進することが明らかとなった。またオートファジーの亢進はウイルスの増殖・複製を抑制することから、HBV 感染による肝細胞オートファジーの亢進は生体防御機構として働いている可能性が示唆された。

今回の研究結果では、HBV ウイルスの感染実験が NTCP 強制発現細胞株、ヒト肝細胞キメラマウス由来の初代培養肝細胞という 2 つの細胞で可能であった。感染の成立には後者の細胞は少ないウイルス量でも感染が成立し、持続的な HBV 感染が可能であった。今後これらの細胞を用いて、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。

#### E. 結論

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た。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・増殖は亢進した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Makino Y, Saito Y, Tanaka S, Shimizu S, Sakamori R, Miyagi T, Wada H, Nagano H, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. Synthetic lethal interaction of combined CD26 and Bcl-xL inhibition is a powerful anticancer therapy against hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* (in press)

##### 2. 学会発表

4 月 23-26 日 第 100 回日本消化器病学会総会「NASH 病態形成におけるオートファジーとアポトーシスの意義」田中聡司、 疋田隼人、 牧野祐紀、 中堀輔、 齋藤義修、 阪森亮太郎、 宮城琢也、 巽智秀、 竹原徹郎。

5 月 29-30 日 第 50 回日本肝臓学会総会 WS9. 「肝障害における金属元素の役割」「肝細胞アポトーシスが惹起するミトコンドリア障害は、酸化ストレスを介して肝発癌を誘導する」疋田隼人 巽智秀 竹原徹郎。 「癌細胞における CD26 の発現とその意義」疋田隼人、 川口司、 阪森亮太郎、 宮城琢也、 和田浩志、 永野浩昭、 平松直樹、 巽智秀、 竹原徹郎。

11 月 7-11 日 The 65th Annual Meeting of the American Association for the study of

Liver Disease, Boston USA 「Activation of mitochondrial pathway of apoptosis in hepatocytes increases oxidative stress in hepatocytes leading to liver tumorigenesis」 Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Yoshinobu Saito, Satoshi Tanaka, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. 「Increased expression of Rubicon protein by high fat diet suppresses autophagic flux and induces apoptosis by increasing endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease.」 Satoshi Tanaka, Hayato Hikita, Yasutoshi Nozaki, Yugo Kai,

Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

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：谷口 英樹 横浜市立大学 教授  
研究協力者：武部 貴則、関根 圭輔、村田 聡一郎

分担研究課題：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

研究要旨：

本研究ではヒト iPS 細胞由来肝臓原基 (iPS 肝芽) 作製法ならびに最新のゲノム編集操作を駆使して、B型肝炎ウイルスへの再感染に関わる遺伝子を改変したヒト肝芽を作製し、患者の生体内において肝臓組織を再構成するという新たな治療コンセプトを確立することを最終目的とする。平成 26 年度は移植モデルを用いた iPS 肝芽の分化誘導に関する検討、iPS 細胞に対するゲノム編集の基盤技術の確立を試みた。まず、iPS 肝芽を免疫不全マウス体内へ移植し、血中ヒトタンパク質産生量を指標としたスクリーニングにより最適な移植部位の同定を試みた。その結果、移植を行ったさまざまな異所性部位の中でも近位腸間膜への移植群において、iPS 肝芽は高い機能性を獲得することが示唆された。さらに、当該部位に移植した肝芽細胞は、網羅的遺伝子発現解析の結果、生体内で成熟肝細胞へと分化誘導されることが明らかとなった。一方、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 iPS 細胞の標的ゲノム配列に EGFP 遺伝子をノックインし、EGFP を発現する iPS 細胞を得ることが出来ることが確認された。今後、iPS 肝芽の同所性移植によるヒト肝臓再構築方法を確立していくとともに、HBV への再感染に関わる遺伝子をゲノム編集したヒト肝芽の作製を試みる。

A. 研究目的

肝炎研究の推進により、C型肝炎に対する治療効果の改善はめざましいが、B型肝炎の基礎研究および治療開発はC型肝炎に比べて必ずしも進んでいないのが現状である。

近年の様々なグループによるB型肝炎ウイルス (HBV) 感染機構の研究から、HBV感染に関わるレセプターやウイルス複製に関わる候補分子などの宿主因子の抽出が進みつつある。これらの分子の機能を制御することにより、HBVの感染・複製を阻害することのできる新たな治療法の開発が期待されている。

これらの宿主因子の機能を制御する上では、宿主となるヒト肝細胞において当該分子群の発現を制御することが最も有効と考えられる。本研究室では、ヒトiPS細胞から肝臓原基 (肝芽) を創出する画期的な培養法を確立しており、創出したヒト肝芽が肝不全免疫不全マウスの肝臓内に生着することを明らかにしている (Takebe T, Taniguchi H et al, *Nature*, 2013)。すなわち、HBVの宿主因子の遺伝子改変を行ったヒトiPS細胞を樹立し、このiPS細胞から肝芽を創

出し、HBV患者の肝臓への移植法を確立することにより、HBV感染に抵抗性を持つ肝臓を再構成することが出来る可能性が示されている。

そこで、本研究では、ヒトiPS細胞を対象とした特異性の高いゲノム編集のための技術基盤を構築するとともに、ヒトiPS細胞からの肝臓原基 (iPS肝芽) の作製法について検討を行う。これにより、HBVへの再感染に関わる遺伝子を改変しiPS肝芽を作製し、患者の生体内において肝臓組織を再構成するという新たな治療コンセプトを確立することを最終目的とする。

本研究は我が国が強力に推進中である、「ヒト iPS 細胞を核とする新たな医療産業の構築」という国策 (行政施策) に大きく貢献することが出来る。これまでとは全く異なる治療コンセプトである iPS 細胞製剤の開発が HBV を対象として推進されることで、HBV 患者を大きく勇気付ける行政的施策と成り得る。

B. 研究方法

我々は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という、肝発生において極めて重要なイベント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 肝芽の移植部位の検討を行った。

- ①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。
- ②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。
- ③iPS 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。

遺伝子改変を行ったヒト iPS 細胞由来肝芽の安全性を担保する上では、ヒト iPS 細胞において、標的遺伝子領域への選択的かつ効率的な遺伝子置換技術を確立することが必須となる。今後 iPS 細胞に対してゲノム編集を行って全く新しい治療法を確立していくことを想定しており、平成26年度は以下の研究を行った。

- ④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。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては「動物の保護および管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)および「実験動物の飼育及び保管に関する基準」(昭和55年総理府公示第6号)の法律および基準の他、「大学等における実験動物について」(文部科学省国際学術局長通知、文学情第141号)の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮している。また当該研究機関の動物実験倫理委員会の承認を得た上で実施している。遺伝子組み換え実験においては「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号)を遵守して実施している。

C. 研究結果

①iPS 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。

②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。

③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図 1 のように microarray にて網羅的に解析した。

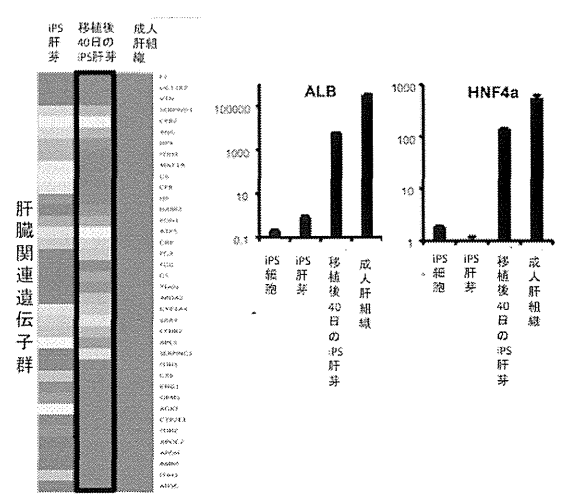


図 1 iPS 肝芽の遺伝子発現パターン

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る。代表的な肝臓特異的遺伝子としてアルブミンと HNF4a の RT-PCR の結果を提示する。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する。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。

④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、図 2 のごとく 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。

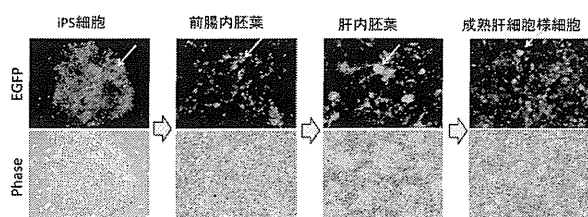


図 2 iPS 細胞および肝細胞への分化段階における EGFP の発現(矢印：EGFP 発現細胞)  
Sekine, Taniguchi et al, Transplantation Proceedings 2014

#### D. 考察

我々はヒト iPS 細胞から分化誘導し肝内胚葉細胞に間葉系幹細胞および、血管内皮細胞の 3 種類を混合して三次元培養を行うことにより、iPS 肝芽を再構成することに成功している。今年度はこの iPS 肝芽の移植部位の検討を主に肝外を中心に行い、ヒトアルブミンの分泌を確認した。移植前後の iPS 肝芽の遺伝子発現を microarray で比較検討すると、移植によって生体内でより成熟した肝組織に分化誘導されることが分かった。これらの成果を元に今後は肝臓内への移植法の確立と iPS 肝芽のさらなる生体内での分化誘導を目指す。

また、本年度の検討より TALEN 法を用いてヒト iPS 細胞において選択的な遺伝子置換が可能である事を確認した。構築したノックイン用ベクターコンストラクトが十分に作動することが確認できたことから、今後、他の遺伝子に対するノックインの至適化を進める上での指標を構築することが出来たと言える。この手法を発展させていくことで HBV 治療に有効な宿主因子の特定、並びに、安全性の高いゲノム編集を行うことが可能と考えられる。

#### E. 結論

今回確立したヒト 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。さらに最新のゲノム編集操作を駆使して、HBV へ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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Zhang RR, Zheng YW, Li B, Tsuchida T, Ueno Y, Nie YZ, Taniguchi H. Human hepatic stem cells transplanted into a fulminant hepatic failure Alb-TRECK/SCID mouse model exhibit liver reconstitution and drug metabolism capabilities. *Stem Cell Research&Therapy* (in press)
2. Takebe T, Taniguchi H. Human iPSC-derived miniature organs: a tool for drug studies. *Clin Pharmacol Ther* 96(3):310-313, 2014.
3. Koike H, Ouchi R, Ueno Y, Nakata S, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Isono K, Koseki H, Taniguchi H. Polycomb group protein Ezh2 regulates hepatic progenitor cell proliferation and differentiation in murine embryonic liver. *PLoS One* 9(8):e104776, 2014
4. Koike H, Ueno Y, Naito T, Shiina T, Nakata S, Ouchi R, Obana Y, Sekine K, Zheng YW, Takebe T, Isono K, Koseki H, Taniguchi H. Ring1B promotes hepatic stem/progenitor cell expansion through simultaneous suppression of Cdkn1a and Cdkn2a in mice. *Hepatology* 60(1):323-333, 2014
5. Takebe T, Koike N, Sekine K, Fujiwara R, Amiya T, Zheng YW, Taniguchi H. Engineering of human hepatic tissue with functional vascular networks. *Organogenesis* 10(2):260-267, 2014
6. Zheng YW, Tsuchida T, Shimao T, Li B, Takebe T, Zhang RR, Sakurai Y, Ueno Y, Sekine K, Ishibashi N, Imajima M, Tanaka T, and Taniguchi H: The CD133+CD44+ Precancerous Subpopulation of Oval Cells is a Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Stem Cells Dev* 23(18):2237-2249, 2014
7. Sekine K, Takebe T, Taniguchi H. Fluorescent labeling and visualization of human induced pluripotent stem cells with the use of transcription activator-like effector nucleases. *Transplant Proc* 46(4):1205-1207, 2014
8. Tsuchida T, Zheng YW, Zhang RR, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H. The development of humanized liver with Rag1

- knockout rats. *Transplant Proc*, 46(4): 1191-1193, 2014
9. Enomoto Y, Enomura M, Takebe T, Mitsuhashi Y, Kimura M, Yoshizawa E, Taniguchi H. Self-Formation of Vascularized Hepatic Tissue from Human Adult Hepatocyte. *Transplant Proc* 46(4):1243-1246, 2014
  10. Zhang R, Takebe T, Sekine K, Koike H, Zheng YW, Taniguchi H. Identification of Proliferating Human Hepatic Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Transplant Proc* 46(4):1201-1204, 2014
2. 学会発表
1. 谷口英樹：iPS 細胞を用いたヒト肝臓の再構成 日本人類遺伝学会第 59 回大会 招待講演 Nov.22, 2014 東京
  2. 谷口英樹：ヒト臓器の創出を目指す戦略的 iPS 細胞研究 第 50 回日本移植学会総会 招待講演(50 周年企画) Sep.12, 2014 東京
  3. 谷口英樹：iPS 細胞からヒト臓器を創る－如何にして器官発生を模倣するのか？－ 日本組織培養学会第 87 回大会 招待講演 May.29, 2014 東京
  4. Takebe T, Taniguchi H: Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. 7<sup>th</sup> Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research (PPSSC), 12-14th April, 2014, Taiwan
  5. 谷口英樹：iPS 細胞を用いたヒト器官原基創出法の開発 第 35 回日本炎症・再生医学会 シンポジウム Jul.1-4, 2014 沖縄
- 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： 千葉 勉（京都大学医学研究科消化器内科）

分担研究課題： HBV ゲノムを誘導発現可能なマウスモデルの作成と解析

研究要旨：

B型肝炎ウイルス(HBV)に対する新しい創薬をめざすためには、HBVにより惹起される自然免疫ならびに獲得免疫応答を模倣した *in vivo*モデルの樹立が急務である。本研究課題では、HBV感染が肝細胞に成立した病態を模倣し、肝炎ウイルスに対する特異的な免疫応答を誘導することができる新しいモデルマウスを樹立し、HBVに対する宿主免疫応答機構を明らかにすることを目的とする。本目標を達成するために、任意の時期に肝細胞に特異的にB型肝炎ウイルス全タンパク質を発現する誘導型トランスジェニックマウスを樹立し、その表現型の解析を行った。あらかじめHBV抗原分子により免疫誘導を行ったマウスでは、その後のウイルス抗原タンパク質の発現に呼応して、細胞障害性T細胞に関連した特定のケモカインネットワークが活性化されることが明らかとなり、これらのケモカインシグナルがHBVに対する獲得免疫応答で中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)感染により形成されるさまざまな臨床病態は、ウイルス側の要因と宿主側の免疫応答の両者の相互作用により形成されるものと推定されている。特にHBV感染に際しては、急性肝炎、劇症肝炎、慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌、無症候性キャリア、といった多様な病態が生じることが特徴であり、C型肝炎ウイルス感染とは大きく異なった病像を呈することが知られている。HBVによるこれらの多様な病態形成には、宿主側の免疫応答が中心的な役割を果たしており、肝細胞からのウイルス排除には自然免疫・獲得免疫の両者の関与が必要となる。すなわち、HBVに対する新しい創薬をめざすためには、これら多様な免疫応答により惹起される病態を

模倣した *in vivo*モデルの樹立が急務である。しかしながら、母子感染では免疫寛容が成立し無症候性キャリアとなるヒトの感染病態と同様に、マウスでも胎児期からわずかでもHBV抗原の提示が生じるとウイルスに対して免疫寛容状態となり、肝炎を模倣する免疫応答が生じないことが知られている。このため、HBV感染が肝細胞に成立することにより免疫応答が惹起されるB型肝炎の病態を模倣するモデルマウスはほとんどない。そこで、胎児期には厳密にウイルスタンパク質の発現を制御し、生後、任意の時期に薬剤誘導性にウイルスタンパク質を肝細胞に発現する新規B型肝炎モデルマウスを樹立し、HBV感染に起因した肝炎の病態解明と創薬ターゲット候補の絞り込むことを本研究課題の目的とする。



## B. 研究方法

### 1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

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。具体的には、アルブミンプロモーター下に tet-on システムを連結し、doxycycline 投与により repressor が離れる新規システムを応用し、薬剤誘導性に肝細胞に特異的に HBV 全タンパク質を発現するコンストラクトを作成した。作成したコンストラクトをマウス胚への injection を実施し、計 3 ラインの F0 マウスを確保し、その中でもっとも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。

### 2. 肝細胞への HBV ウイルスタンパクの一過性発現による肝炎免疫応答モデルの樹立；

免疫応答の成熟した成体マウスの肝組織に HBV ウイルス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も同時進行で行った。通常プラスミドを用いた hydrodynamic injection 投与では、肝組織へのプラスミド由来タンパク質の発現誘導が可能ではあるが、その発現期間はごく短期間のみ限定することが問題点としてあげられる。そこで、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 ウイルス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。

いずれのモデルにおいても、HBV に対する獲得免疫応答の詳細な解析を進めるため、肝細胞へのウイルス抗原発現前にあらかじめ HBV 抗原タンパク質による免疫刺激を行った系を樹立し、肝組織で惹起される免疫応答の解析を行った。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、「研究開発等に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸防止措置などを定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

動物実験に関しては、「動物の保護および管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年 6 月 1 日一部改正)に従った。また、当該所属機関の動物実験委員会に申請し承認を受けた後、実施した。

## C. 研究結果

### 1. 新規 B 型肝炎モデルマウスの作製；

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、doxycycline 投与前後でマウス肝組織中の HBV RNA の発現量を real-time RT-PCR で検討したところ、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ることが確認されたため、その後の検討はこのラインを用いて進めることとした。しかしながら、薬剤誘導による HBV タンパク質発現誘導 1 週間後、2 週間後のマウス肝組織は病理組織学的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ることがわかった。他方、同じ肝組織から抽出した RNA を用いた定量 RT-PCR 解析からは、ウイルス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ることが確認された。以上の結果から、肝細胞へのウイルス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、肝細胞へのウイルス抗原発現後に惹起される肝障害が顕在化する傾向にあることが示唆された。そこで、この HBV に対する獲得免疫応答の際に生じる遺伝子発現プロファイル変化を検討する目的で、doxycycline 投与後の肝組織を対象としてマイクロアレイ解析 (Agilent 社, 8X60K) を実施した。興味深いことに、獲得免疫の成立した個体における 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ているこ

とが明らかとなった。

2. 肝細胞への HBV ウィルスタンパク質の一過性発現による肝炎免疫応答モデルの解析；

CpG サイトを失活させた親ベクターに HBV の Surface 領域の遺伝子配列をクローニングし、HBs 抗原タンパク質発現ベクターを作製し、この HBs 発現ベクターを野生型マウスに hydrodynamic injection 投与を行った。経時的に血中 HBs 抗原の分泌量を ELISA 法により定量評価を行ったところ、HBs 抗原タンパク質発現ベクター投与を受けたマウスの 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 Surface 抗原タンパク質により免疫刺激を行った野生型マウスへの 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、ウイルス抗原の追加刺激による獲得免疫応答の増幅効果が反映された所見であるものと考えられた。そこで、この HBs 抗原の一過性発現モデルを用いて、薬剤誘導モデルと同様に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ていることがわかった。

#### D. 考察

本研究課題では、薬剤誘導性に repressor タンパク質を制御するシステムを用いることにより、肝細胞に任意の時期に免疫応答

を惹起する B 型肝炎モデルマウスの作製を目指すとともに、個々の HBV ウィルス抗原タンパク質特異的な免疫応答反応を検証するための一過性に肝細胞特異的に HBV タンパク質が発現可能なモデルの構築を行っている。いずれのモデルもマウスの樹立目標は本年度で達成することができた。今後の課題としては、肝細胞への HBV タンパク質の発現誘導のみでは十分な免疫応答が誘導できないことがあげられ、ウィルスに対する免疫能の活性化の方策についてのさらなる検討を行い、抗 HBV 創薬の解析基盤となる新規マウスの樹立と表現型の解析を引き続き進める予定である。

## E. 結論

HBV の病態解明と創薬ターゲットの絞り込みを達成することを目標とし、ヒト B 型肝炎を模倣する肝細胞に 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、ウィ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予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2014. 146(1): 222-232.

## 2. 学会発表

- (1) 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.
- (2) 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.
- (3) 犬塚義、上田佳秀、千葉勉、丸澤宏之. B 型肝炎ウィ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

- (4) 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
- (5) 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

- G. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特許取得  
該当なし
  2. 実用新案登録  
該当なし
  3. その他  
特記事項なし

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：豊田哲也 長寿医学研究所 副所長

分担研究課題：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

研究要旨：HBV治療薬の探査を目的として、ポリメラーゼ活性(逆転写活性、RNase H活性)阻害物質スクリーニング系開発のために、それらの生化学的特徴を決定した。従来より長いN末を有するタンパクを非変性条件で抽出した画分が酵素活性を示し、逆転写活性の至適条件はpH 8.5、45 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、0.02 % Triton X-100、0.5 mM dNTPs、37°C、RNase H活性の至適条件はpH 8.0、22.5 mM NaCl、4 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、0.02 % Triton X-100、37°Cであった。そして、スクリーニング用に50 μLのアッセイ系を開発した。また、構造解析、surface plasmon resonanceを用いた結合物質のスクリーニングを目的とする大腸菌によるTP、逆転写酵素、RNase Hの発現と変性条件の大量精製法と再生法を確立した。

A. 研究目的

HBV ポリメラーゼは逆転写酵素と RNase H 活性を持ち、逆転写酵素に対するヌクレオチドアナログが治療薬として用いられている。本研究は、テノフォビル、エンテカビルより効率の良い HBV 逆転写酵素の阻害剤の開発と RNase H に対する阻害剤の開発のためのスクリーニング系の開発を目的とする。また、新たに C 型肝炎 NS5A 阻害剤（ダクルインザ）開発の戦略を応用し、HBV 内部タンパクに結合する物質から阻害剤の開発を行うために、そのスクリーニング系を開発する。具体的に、以下の3点を行う。

- 1.HBV 逆転写酵素の生化学的特徴の決定と逆転写阻害剤スクリーニング法の開発
- 2.HBV RNase H 精製法の改良
- 3.Surface plasmon resonance を用いた結合物質スクリーニング、および構造解析のための HBV タンパクの精製法の確立

B. 研究方法

- 1.大腸菌による HBV タンパク発現系の改良

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（図 1）。そして、大腸菌 Rosetta/pLysS を用いて RT303RNaseH は HSP90α と共発現、RNaseH681 は GroES と共発現した。それぞれ、NaCl と Triton X-100 で可溶化し、精製した。

2.HBV 逆転写酵素活性の解析

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。

(倫理面への配慮)

該当しない

C. 研究結果

1.HBV 逆転写酵素の生化学的特徴

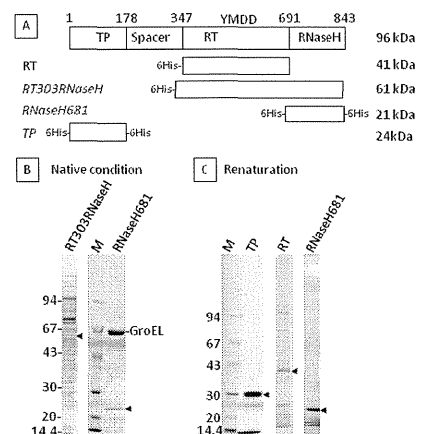


図1. HBVポリメラーゼタンパクの精製  
A. 発現するタンパクの模式図 数字はアミノ酸の位置を示す。B. 活性を保持したタンパク C. 変性条件下で精製したタンパク(矢印はタンパクを示す、分子量は左側に示す)

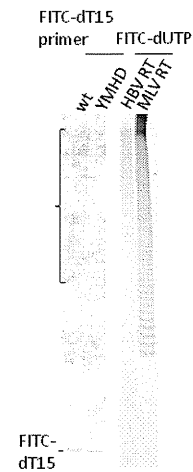


図2. 逆転写活性  
FITC-dT primerを用いた逆転写活性とFITC-dUTPを用いた逆転写活性(YMDH:活性のない酵素、MLV RT: Molony murine leukemia virus RT), primer、転写物の位置は図示した。

RT303RNaseH は Superdex200 の fr. 14-16 を酵素(図 1B)として用いて、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。以下、逆転写反応は 50  $\mu$ L (50 mM TrisHCl pH 8.5、45 mM NaCl、5 mM  $MgCl_2$ 、1 mM DTT、0.0 2% Triton X-100、0.5 mM dNTPs)、37°Cで 2 時間インキュベートした。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  $\mu$ M)を用いても、高分子逆転写物を検出した(図 2)。なお、逆転写活性をロックアウトした YMDH 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。

2.RNaseH681 の精製と定量

RNaseH681 は 1M NaCl、1% Triton X-100 で可溶化し、HisTrap、Superdex200 を用いて精製した(図 1B)。1L の培養から約 1 nmol の酵素が精製できた。

3.RNaseH681 を用いた阻害剤スクリーニング系 ver3

ver3 は DNA 分解酵素活性の混入がなく、50  $\mu$ L (50 mM TrisHCl pH 8.0、22.5 mM NaCl、4 mM  $MgCl_2$ 、1 mM DTT、0.02 % Triton X-100、キメラプローベ 1 pmol、RNaseH681 1 pmol)で 1 アッセイを行う。

4.Guanidine を用いた TP、RT、RNaseH681 の精製

TP、RT、RNaseH681 を 6M guanidine で可溶化し、HisTrap にて精製した(図 1C)。TP は 8 M urea  $\rightarrow$  2 M urea  $\rightarrow$  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、結合する阻害剤のスクリーニングに用いるこ

とはできる。

#### D. 考察

変性・再生による大腸菌からの HBV タンパクの大量精製法は、酵素活性は低い、構造解析と結合する阻害剤のスクリーニングに用いることができる。逆転写活性・RNase H 活性をもとに阻害剤をスクリーニングするには、非変性条件で精製した酵素画分を用いて行う。

逆転写活性阻害物質スクリーニング系は蛍光偏光を測定する方法と蛍光基質の取り込みを測定する方法が考えられ、現在それぞれについて検討中である(図 3)。

A. Polymerase Elongation Template Element (PETE) assay system B. FITC-dUTP based assay system

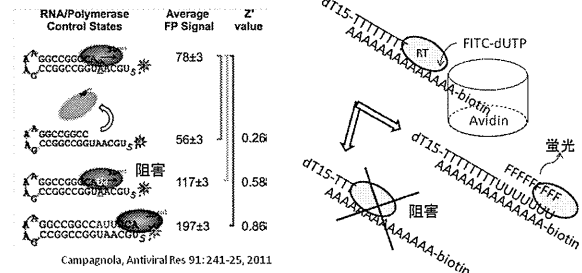


図3. 逆転写活性阻害剤スクリーニング系の理論模式図  
Campagnolaによる蛍光偏光を測定する方法(A)とFITC-dUTPの取り込み蛍光を測定する方法(B)

#### E. 結論

従来より長い N 末を持つ RT、RNase H で、逆転写活性、RNase H 活性の最適条件を決定し、スクリーニングに用いる 50  $\mu$ L 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。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### 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：朴 三用 横浜市立大学 教授  
研究協力者：

分担研究課題：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  
（HBV DNA ポリメラーゼおよび NTCP の発現精製系構築）

研究要旨：B型肝炎ウイルス（以下、HBV）は、DNAウイルスであるにも関わらず、RNAを経由して自身のゲノムを複製している。この機構は、他ウイルスでは見られず独特な複製機構である。この複製機構の中心的な役割を担っているのは、HBV DNAポリメラーゼであるが、依然として構造情報は明らかにされていない。HBV DNAポリメラーゼの構造生物学的理解は、複製機構の理解にとどまらず創薬基盤情報構築を行うことを可能にする。このようなHBV細胞感染後の複製機構は重要であるが、同時に、HBVの細胞への感染機構の詳細な理解も創薬基盤情報構築に重要である。近年、HBVが肝細胞に感染する際の受容体（以下、NTCP）が同定され、それによってNTCPの立体構造の重要性が高まってきた。そこで両蛋白質（HBV DNAポリメラーゼ、NTCP）の結晶構造解析による創薬基盤情報構築を目的とし、発現系および精製実験を行った。

A. 研究目的

HBV の独特な複製機構の中心的な役割を担っているのは HBV の DNA ポリメラーゼである。しかしながら、現在までに構造情報は一切明らかとなっていない。また、感染初期段階にある、HBV とその受容体（NTCP）との構造情報も明らかとなっていない。本研究では、HBV DNA ポリメラーゼおよび NTCP の構造解析に向けた蛋白質発現構築を目指す。結晶構造解析には、数 mg から数十 mg にわたる高純度精製蛋白質が必要になる。両蛋白質ともに大量発現系、精製方法は確立されていない。従って、これら両蛋白質の大量発現系構築、高純度精製を研究目的とした。

B. 研究方法

〈HBV DNA ポリメラーゼ〉

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。作成したプラスミドを蛋白質発現用大腸菌 BL21 (DE3)\*pLysS と BL21 (DE3)RILP に形質転換し蛋白質発現を試みた。蛋白質発現後に不溶性画分としてサンプルが得られた場合は、リフォールディングを検討した。

〈NTCP〉

HEK293T の cDNA ライブラリーより 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。作成したプラスミドを BL21 (DE3)\*pLysS および BL21 (DE3)RILP に形質転換した後、O. D.<sub>600</sub>=0.8 付近で 0.5 mM IPTG を添加し、37° C で 4 時間、あるいは 20° C で終夜培養し蛋白質発現を行った。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、上述の方法で蛋白質発現を試みた。生きた大腸菌を直接使わず、その抽出液等を使い蛋白質を合成する、大腸菌無細胞蛋白質発現系も行った。その際は、大腸菌コドン最適化した NTCP 遺伝子

を pIVEX ベクターに組み込んで用いた。  
〈S-1-48〉

HBV が感染する際、HBV S 蛋白質の 1-48 残基目までが NTCP と相互作用する報告が近年発表された。そこで、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。蛋白質発現確認には、BL21 (DE3)\*pLysS および BL21 (DE3)RILP を用いた。発現条件は 37° C と 20° C で行った。

### C. 研究結果

〈HBV DNA ポリメラーゼ〉

各種大腸菌、蛋白質発現条件でも蛋白質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。TP200 ドメインに関しては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。不溶性画分を一般手な方法でよく洗浄し 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 においてはリフォールディングによる折畳みがうまくいかなかった為か、段階的透析している際に白色沈殿として沈殿してしまっていた。NV-10 に関しては、リフォールディング成功した前例が論文報告されていたため、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からむにかけたところ、分子量 100 kDa 以上の分子量を持つと計算された。

〈NTCP〉

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、BL21 (DE3)\*pLysS および BL21 (DE3)RILP の 37° C と 20° C での条件で培養を行い、Ni-NTA カラムを用いた粗精製を行った。しかしながら、SDS-PAGE 上では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。そこで、大腸菌ではあるが無細胞系蛋白質発現系である 5PRIME RTS500 を用いて蛋白質発現を試みた。精製後、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。

〈S-1-48〉

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、BL21 (DE3)\*pLysS および BL21 (DE3)RILP、37° C および 20° C の全ての条件で蛋白質の発現は見られなかった。しかしながら、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、どの条件でも蛋白質発現を確認できた。BL21 (DE3)RILP での発現がよかったためこちらを採用した。Ni-NTA による粗精製後に MALDI-TOF マスで分子量を測定し、目的蛋白質である事を同定した。

### D. 考察

〈HBV DNA ポリメラーゼ〉

全長 HBV DNA ポリメラーゼに関してはどの条件でも発現を確認する事は出来なかった。内在性のプロモーターや mRNA の二次構造が影響している事が示唆された。そこで大腸菌コドン最適化した遺伝子を用いてもみたが改善は見られなかった。TP200 ドメインに関しては、NV-10 を用いた段階的透析法によるリフォールディングができたように見えるが、実際の分子量は 27 kDa 程であるため、NV-10 によるリフォールディングでは、NV-10 自体が TP200 を取り囲むように結合している事が考えられる。また、CD スペクトル等を使い二次構造含有量を測定していないため今後行う必要がある。そのほかのドメインに関しても同様な方法でリフォールディングできる可能性があるため、今後試していく。

〈NTCP〉



無細胞蛋白質発現系で蛋白質発現を確認できたのは、生物に寄らない、生物の蛋白質合成機構だけを使った方法であったためと考えられる。また、通常の蛋白質発現では用いない、ジギトニン等の界面活性剤を蛋白質合成溶液に直接添加することが出来たためと考えられる。

<S-1-48>

HBV の遺伝子配列の S-1-48 では発現できず、大腸菌コドン最適化を行った後の遺伝子では蛋白質発現できたことから、HBV の遺伝子由来 S-1-48 の mRNA の二次構造や転写レベルでの制御が示唆された。

## E. 結論

大腸菌を用いた HBV DNA ポリメラーゼ全長及び各ドメインの蛋白質発現後、可溶性画分としては得られていない。原核生物を用いた発現系が適さない事や相互作用相手が足りないためなど考えられる。そこで昆虫細胞を用いた蛋白質発現系構築や蛋白質共発現系を構築することで改善が見込める。NTCP に関しては、大腸菌無細胞蛋白質合成系では蛋白質合成できるものの、蛋白質結晶科を行うには収量が足りない。しかも、大腸菌そのものでは蛋白質合成が出来ない。発現した蛋白質が大腸菌にとって毒性を示す事や、膜蛋白質であるため大腸菌の膜上にうまく挿入できなかつた事などが考えられる。こちらも昆虫細胞やヒト細胞を利用する事で改善する可能性があるため、同様に今後行っていく。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 の発現精製が行えた後、複合体構造を得る為に利用する予定である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Shibayama N, Sugiyama K, Tame JR, Park SY. Capturing the Hemoglobin Allosteric Transition in a Single Crystal Form. *J Am Chem Soc.* 2014 Apr 2;136(13):5097-105.
- (2) Sugiyama K, Iyori M, Sawaguchi A,

Akashi S, Tame JR, Park SY, Yoshida S. The crystal structure of the active domain of Anopheles anti-platelet protein, a powerful anti-coagulant, in complex with an antibody. *J Biol Chem.* 2014 Jun 6;289(23):16303-16312.

(3) Voet AR, Noguchi H, Addy C, Simoncini D, Terada D, Unzai S, Park SY, Zhang KY, Tame JR. Computational design of a self-assembling symmetrical  $\beta$ -propeller protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Oct 21;111(42):15102-7.

(4) Hirano T, Sugiyama K, Sakaki Y, Hakamata W, Park SY, Nishio T. Structure-based analysis of domain function of chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus*. *FEBS Lett.* 2015 Jan 2;589(1):145-51.

## 2. 学会発表

(1) Sam-Yong Park, "The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase" International School of Crystallography, 30 May-8 June 2014, Erice, Italy.

(2) リガンド結合状態及び非結合状態のケナガマンモスヘモグロビンの結晶構造。野口 大貴、雲財 悟、キャンベル ケビン、ホーチェン、朴三用、タイムジェレミー、第 14 回日本蛋白質学会 横浜、2014 年 6 月 25 日-27 日

(3) ムラサキイガイ由来レクチン Mytilec の X 線結晶構造解析。寺田 大樹、河合 文啓、野口 大貴、雲財 悟、イムテイアジハサン、朴三用、大関 泰裕、タイムジェレミー、第 14 回日本蛋白質学会 横浜、2014 年 6 月 25 日-27 日

(4) メチシリン耐性黄色ブドウ球菌由来ペニシリン結合タンパク質 3 の X 線結晶構造解析。吉田 尚史、朴三用、第 14 回日本蛋白質学会 横浜、2014 年 6 月 25 日-27 日

## 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

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：馬場昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

研究協力者：外山政明，岡本実佳（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

分担研究課題：カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬の同定と開発

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の治療薬は、インターフェロンを除くと、全て逆転写酵素として働く HBV の DNA ポリメラーゼを標的とする核酸アナログである。これまでの本研究において、既存の薬剤とは異なる作用機序を有する、新規抗 HBV 薬の同定と開発を目的として、カプシド蛋白を標的とした薬剤の *in silico* アッセイ系を確立した。また、それを用いて薬剤ライブラリーのスクリーニングを行い、選別した薬剤の中から選択的に HBV 産生を抑制する化合物を同定した。本年度は、それらの誘導体について、*in vitro* における抗 HBV 効果及びカプシド形成阻害効果について調べたところ、活性の高い薬剤を同定することに成功し、また、同定された薬剤はカプシド形成阻害効果を有することを明らかにした。

A. 研究目的

これまでの本研究報告書でも述べたように、B型肝炎ウイルス（HBV）による慢性肝炎の治療薬として、現在臨床で使用可能なものは、インターフェロンを除くと、全てが核酸アナログである。これらの薬剤は逆転写機能を有する HBV の DNA ポリメラーゼを標的としており、それ以外の分子を標的とした抗 HBV 薬の開発が遅れている。核酸アナログの実用化は、慢性 B型肝炎の治療成績に大幅な改善をもたらしたが、これらの薬剤に対する耐性ウイルスの出現や、薬剤の中断による肝炎の再燃・増悪も報告されている。

そこで本研究では、核酸アナログ以外の新規抗 HBV 薬の開発と同定を目的として研究を行う。HBV の場合、薬剤の標的となる可能性のあるウイルス由来の蛋白分子も少なく、また、ウイルスの複製機構が解明されていない部分も多いが、これまでの本研究により、HBV のカプシド蛋白を標的とした薬剤の *in silico* アッセイ系を確立しており、これを用いて薬剤のスクリーニングを行うことで、効率的に薬剤の同定を試み

る。このスクリーニングによって選び出された薬剤の抗 HBV 効果は、HBV 感染培養細胞を用いた *in vitro* アッセイにより確認する。この操作により、リード化合物が得られたら、その周辺化合物や誘導体について、抗 HBV 効果を検討することで薬剤の構造最適化を行うとともに、作用機序（標的分子）を明らかにする。最終的には、動物を用いた毒性試験や薬物動態試験を行い、これらの結果を総合することで、当該薬剤の臨床開発の可能性を決定する。

本研究の目的が達成されれば、我が国に 110-140 万人と推定される HBV 持続感染者に対し、既存の抗 HBV 薬とは異なる作用機序を有する新規薬剤を提供することにより、新しい B型肝炎治療への展望を開くことが可能となる。すなわち、既存の核酸アナログと本研究により開発が期待される新規薬剤を併用することで、高価で副作用の強いインターフェロンが不要になるだけでなく、薬剤耐性ウイルスの出現による肝炎の再燃を防ぎ、感染者に対して長期にわたる安定的な治療を提供することができる。その結果、肝硬変や肝がんの発症率や死亡

率を減少させることで、感染者の将来に対する不安を軽減するとともに、国民の福祉の向上と医療費の削減をもたらすことができると思われる。

## B. 研究方法

1. 抗 HBV アッセイ : *In silico* スクリーニングにより選出されたリード化合物 (薬剤) は、ヒト肝癌細胞株 HepG2 に HBV DNA を導入した HepG2.2.15 細胞のクローン株 HepG2.2.15.7 を用いて、抗 HBV 効果について検討した。具体的には、 $1 \times 10^4$  個/well の細胞を、コラーゲンがコートされたマイクロプレートに播種し、37°C にて培養し、24 時間後、種々の濃度の薬剤を加えた。培養 3, 6 日後に、同じ濃度の薬剤を含む新鮮な培養液と交換し、さらに 3 日間培養した。その後、細胞はテトラゾリウムを用いた色素法にて、生細胞数を定量した。一方、培養上清は SideStep Lysis and Stabilization Buffer を用いてウイルス粒子を融解した後、real-time PCR 法を用いて、ウイルス DNA の定量を行った。Real-time PCR に用いた TaqMan プライマー/プローブの塩基配列は、平成 24 年度の本報告書に記載した。

2. 細胞内カプシド蛋白形成阻害効果 : 同定されたリード化合物 (薬剤) のカプシド蛋白形成阻害効果について検討した。具体的には、 $1 \times 10^5$  個/well の細胞を、コラーゲンがコートされた 12 ウェルプレートに播種し、37°C にて培養し、24 時間後、種々の濃度の薬剤を加えた。培養 3, 6 日後に、同じ濃度の薬剤を含む新鮮な培養液と交換し、さらに 3 日間培養した。その後、細胞を PBS で洗浄し、lysis buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1% Nonidet® P-40) にて細胞を溶解させた。溶解された細胞溶解液を遠心分離によって、核などを沈殿させた後、上清を回収し、カプシド蛋白を含んだ細胞溶解液とした。カプシド蛋白は、1% アガロースゲルで電気泳動し、キャピラリートランスファー法を用いてニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜に転写後、カプシド蛋白に対する抗体を反応させ (一次抗体反応)、一

次抗体に対する horse radish peroxidase (HRP) 標識二次抗体を結合させた。HRP 化学発光基質を用いてカプシド蛋白を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究では、個人が出来るようなヒトのサンプルは用いていない。

## C. 研究結果

1. 抗 HBV 効果 : 一昨年度の本研究報告書で報告した #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 (表 1)。

表 1. #289 の周辺化合物の抗 HBV 効果。

Compounds	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
#289	> 50	> 50
#274	6.6	34.1
#246	> 50	> 50
#799	3.8	32.5
#917	> 50	22.3
#114	18.9	21.7
#277	> 50	45.2
#930	> 50	> 50

EC<sub>50</sub> : 50% Effective concentration based on the reduction of viral DNA in culture supernatants.

CC<sub>50</sub> : 50% Cytotoxic concentration based on the reduction of viable cell number.

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、これまでの本研究において確立した *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。*In silico* スクリーニングにて選別された 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。その結果、15 薬剤のうち、3 薬剤に濃度依存的な抗 HBV 効果を認めた (図 1)。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 (表 2)。

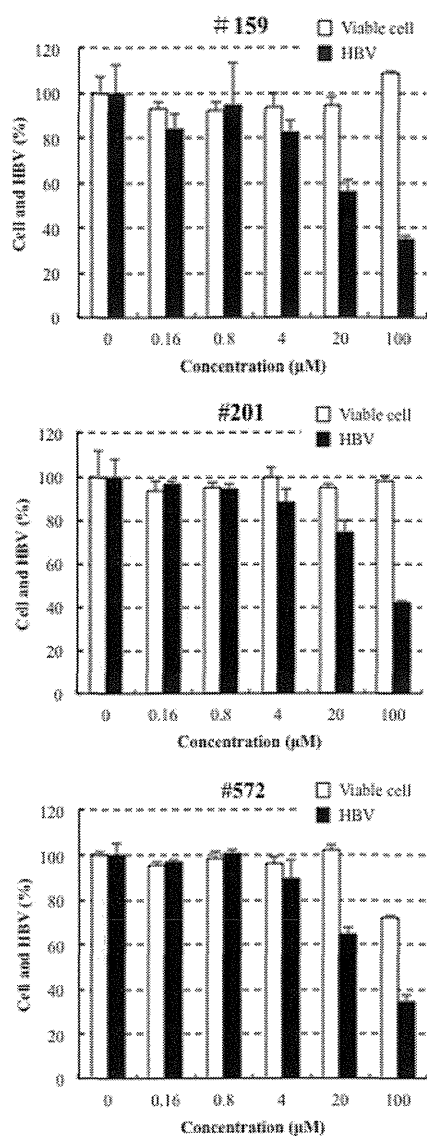


図 1. *In silico* スクリーニングによって選別された薬剤の抗 HBV 効果. 薬剤の抗 HBV 効果は, HepG2.2.15.7 細胞における, 培養上清中の HBV の DNA を real-time PCR 法にて定量することで評価した。また, 薬剤の細胞毒性は生細胞数をテトラゾリウム法にて定量することで評価した。#159 の EC<sub>50</sub> および CC<sub>50</sub> 値は, それぞれ 34.5 および > 100 μM であった。#572 の EC<sub>50</sub> および CC<sub>50</sub> 値は, それぞれ 44.0 および > 100 μM であった。また, #201 の EC<sub>50</sub> および CC<sub>50</sub> 値は, それぞれ 66.9 および > 100 μM であった。表 2. #159 の誘導体の抗 HBV 効果。

Compounds	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
#832	3.5	> 100
#588	12.7	> 100
#333	33.2	43.6
#159	34.5	> 100
#269	40	72
#648	67.4	50.4
#330	68.1	> 100
#184	73.8	51.4
#715	> 100	57.7
#685	> 100	60.4
#386	> 100	> 100
#941	> 100	> 100
#060	> 100	> 100
#955	> 100	> 100
#422	> 100	70.5
#497	> 100	> 100
#912	> 100	> 100
#590	> 100	> 100
#303	> 100	> 100
#614	> 100	> 100
#726	> 100	68.8
#402	> 100	> 100
#168	> 100	> 100
#499	> 100	> 100
#739	> 100	> 100
#932	> 100	> 100
#518	> 100	46.1
#964	> 100	> 100
#897	> 100	> 100
#309	> 100	67.9
#931	> 100	> 100
#478	> 100	> 100
#110	> 100	> 100
#802	> 100	> 100
#229	> 100	> 100
#791	> 100	> 100

EC<sub>50</sub> : 50% Effective concentration based on the reduction of viral DNA in culture supernatants.