

CC₅₀ : 50% Cytotoxic concentration based on the reduction of viable cell number.

2. リード化合物のカプシド蛋白形成阻害効果：同定されたリード化合物の#799 及び #832 の細胞内カプシド蛋白形成阻害効果について検討した。その結果、同定されたリード化合物は、濃度依存的にカプシド蛋白の形成を阻害した。一方、逆転写酵素阻害薬であるラミブジン (3TC), エンテカビル (ETV) はカプシド蛋白形成を阻害しなかった (図3)。このことから、同定されたリード化合物である#799 及び#832 は、カプシド蛋白形成阻害剤である可能性が示唆された。

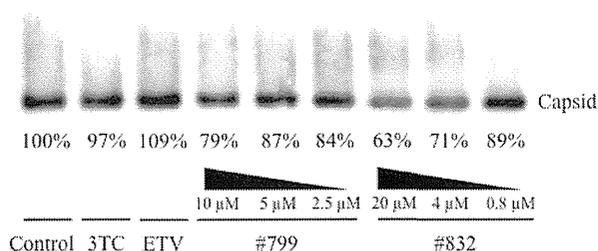


図2. リード化合物のカプシド蛋白阻害効果. HepG2.2.15.7 細胞を種々の薬剤濃度存在下 (10 μM 3TC, 10 nM ETV) で処理し、10 日後に細胞内カプシド蛋白を抽出した。カプシド蛋白を 1%アガロースで分離し、ニトロセルロース膜に転写後、抗 HBc 抗体により解析した。

3. 新規核酸誘導体：昨年度の本研究報告書で述べたように、本研究の目的である「カプシド蛋白を標的とした抗 HBV 薬」の研究を進める一方で、我々は新規の核酸誘導体に強い抗 HBV 効果を同定した。本年度の研究では、これら新規核酸誘導体の作用機序の一部を明らかにした。

同定された新規核酸誘導体は何れもアデノシン誘導体であり、また、アデノシルホモシステイナーゼ (SAHH) 阻害剤である neplanocin A を母骨格としている (図3)。そこで、同定された Nuc 1 及び Nuc 2 の SAHH 活性阻害効果について検討を行った。

その結果、Nuc 1 及び Nuc 2 は SAHH 活性を阻害しなかった (図4)。このことから、これらの抗 HBV 効果は SAHH 阻害作用によるものではないことが明らかになった。

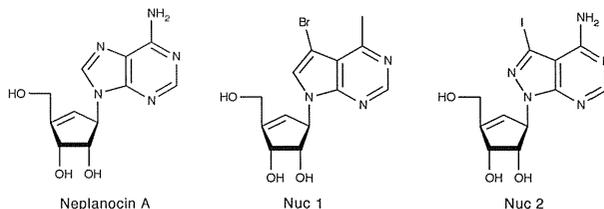


図3. 新規核酸誘導体の化学構造.

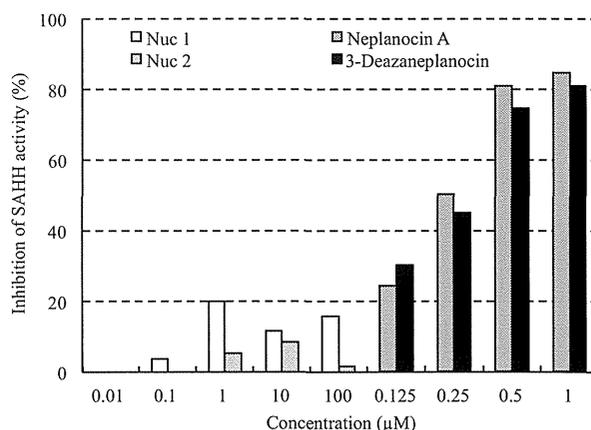


図4. 新規核酸誘導体の SAHH 活性阻害効果. 各種薬剤と SAHH を混合した後、10 μM の L-homocysteine と adenosine を加え、SAH 合成反応を進めた。反応後、競合的 ELISA 法によって、S-アデノシル-L-ホモシステイン (SAH) の産生量から各種薬剤の SAHH 活性阻害を検討した。この時、positive control として SAHH 阻害剤の neplanocin A 及び 3-deazaneplanocin A を用いた。

D. 考察

HBV のコアは感染細胞の細胞質において、カプシド蛋白、ウイルスプレゲノム RNA、ウイルス DNA ポリメラーゼ、そしていくつかの宿主細胞由来の蛋白によってアセンブリされる。コアはプレゲノム RNA からウイルス DNA の合成や細胞内輸送に必須であることから、コアを形成する際のカプシド-カプシド蛋白間の相互作用

(インターフェイス)は、抗ウイルス薬の標的になる可能性がある。我々はこれまでの本研究において、コンピューターを用いて、カプシド-カプシド蛋白間のインターフェイスを解析し、それと相互作用する薬剤を選び出す目的で、薬剤ライブラリーの *in silico* スクリーニングを実施してきた。一昨年度に報告したリード化合物の #289 の周辺化合物を 7 種類入手し、その抗 HBV 効果を調べたところ、その中から #289 より強い抗 HBV 効果を有する #799 を同定することに成功した。また、#799 は弱いながらも濃度依存的にカプシド蛋白形成を阻害した。しかし、現時点では、#799 が理論通りにカプシド-カプシド蛋白間の相互作用を阻害しているかは不明である。今後、#799 について榑原研究分担者の協力を得て、合成展開による構造最適化を行い、さらに強い抗 HBV 効果を有する薬剤の同定を目指す。活性の強い薬剤が同定できた時には、カプシド形成を阻害することで、抗 HBV 効果を発揮しているかどうかを明らかにする予定である。

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、新たに *in silico* スクリーニングを実施した。これにより、実際に *in vitro* 抗 HBV 試験を実施すべき薬剤を 15 種類に絞り込み、それらの抗 HBV 効果を調べた。今回、新たに同定された 3 薬剤のうち、一番抗 HBV 効果の強かった #159 の誘導体 35 化合物について抗 HBV 効果を調べたところ、#159 より強い抗 HBV 効果を有する #832 を同定する事に成功した。また、#832 も #289 と同様にカプシド蛋白形成を濃度依存的に阻害した。しかし、#799 と同様に、#832 についてもカプシド-カプシド蛋白間の相互作用を阻害しているかどうかを明らかにするためには、化学構造の最適化を図り、活性の強い薬剤を同定する必要がある。

一方、これらとは別に、昨年度に報告した 2 種類の新規核酸誘導体の作用機序を調べた。これらの薬剤は、SAHH 阻害剤の一つである neplanocin A を母骨格としている。

しかしながら、2 種類の核酸誘導体は SAHH 活性阻害作用を有しておらず、また、SAHH 阻害剤である neplanocin A 及び 3-deazaneplanocin A は抗 HBV 効果を示さなかった (data not shown)。以上の事から、SAHH 活性阻害と抗 HBV 効果は関連しない事が明らかとなった。今後、これらの核酸誘導体についても合成展開を行い、同時に作用機序(標的分子)を明らかにする予定である。また、高い抗 HBV 活性を有するものが得られた場合、3TC や ETV に耐性を示す HBV に対する抗ウイルス効果を検討することで、開発の可能性を探る予定である。

E. 結論

HBV のカプシド蛋白を標的とする薬剤の *in silico* アッセイ系を用いて、薬剤ライブラリーのスクリーニングを行い、*in vitro* 抗 HBV アッセイを行ったところ、リード化合物となるような新規薬剤を同定することに成功した。また、同定されたリード化合物はカプシド蛋白形成阻害作用を有することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Toyama M, Aoyama H, Mukai R, Nakamura M, Yoshimura K, Okamoto M, Ohshima T, Hashimoto Y, Baba M. A novel tetramethylnaphthalene derivative selectively inhibits adult T-cell leukemia (ATL) cells in vitro. *Anticancer Res.* **34**: 1771-1778 (2014).
2. Konreddy AK, Toyama M, Ito W, Bal C, Baba M, Sharon A. Synthesis and anti-HCV activity of 4-hydroxyamino α -pyranone carboxamide analogs. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**: 259-263 (2014).
3. Jan S, Hyun S, Kim S, Lee S, Lee I-S, Baba M, Lee Y, Yu J. Cell penetrating, dimeric α -helical peptides are nanomolar inhibitors of HIV-1 transcription. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**: 10086-10089 (2014).
4. Sakakibara N, Baba M, Okamoto M, Toyama M, Demizu Y, Misawa T, Kurihara M, Irie K, Kato Y, Maruyama T.

Design, synthesis, and anti-HIV-1 activity of 1-aromatic methyl-substituted 3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil and N-3,5-dimethylbenzyl-substituted urea derivatives. *Antiviral Chem. Chemother.* in press.

2. 学会発表

1. 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.
2. Baba M, Toyama M, Ito W, Okamoto M, Konreddy AK, Bal C, Sharon A, Watashi K, Wakita T. Anti-HCV activity of novel pyranone carboxamide derivatives and their structure-activity relationship. *16th International Congress of Virology*, July 30, 2014, Montreal, Canada.
3. 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.

4. 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.

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：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野
研究協力者：Lin Deng 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野
勝二郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野

分担研究課題：B型肝炎ウイルスタンパク質と相互作用する宿主タンパク質の
構造と機能の解析

研究要旨：B型肝炎ウイルス(HBV)のXタンパク質 (HBx) はウイルスゲノムの転写や複製に重要な役割を担うのみならず、多くの宿主因子と結合し、宿主細胞の遺伝子発現やシグナル伝達を攪乱して、細胞に様々な影響を及ぼすことが知られている。本研究では、HBxの多様な機能の分子機序を明らかにするために、新規HBx結合宿主因子として、癌抑制因子の一種と考えられるperoxiredoxin 1 (Prdx1)、及び、様々な原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子の発現制御に関与しているヒストンメチルトランスフェラーゼSMYD3を同定した。HBxとPrdx1の相互作用については、1) Prdx1との結合にはHBxのN末端近傍領域のアミノ酸残基(aa)16-20、とくに17位のCysが重要であること、2) HBV複製細胞及びHBx発現細胞では酸化ストレス応答遺伝子が強く誘導されるが、この酸化ストレス応答はPrdx1をノックダウンすることにより有意に減弱すること、及び、3) Prdx1をノックダウンするとHBV pgRNAの発現が有意に増加することがわかった。これらの結果は、Prdx1がHBV感染に対する宿主細胞の防御因子である可能性を示唆している。一方、HBxとSMYD3の相互作用については、4) HBxとSMYD3の結合には、HBxのC末端領域(aa 131-154)とSMYD3のC末端領域(aa 269-288)が関与していること、5) SMYD3はHBVの複製に有意な影響を及ぼさないこと、及び、6) HBxとSMYD3の相互作用によりNF- κ B及びJNK経路が有意に活性化されることが明らかになった。今後、HBxとPrdx1あるいはSMYD3の相互作用がHBVのライフサイクルや宿主細胞機能に及ぼす影響についてさらに詳細に解析を進める予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は、免疫能が不十分な新生児や乳幼児に感染した場合は持続感染状態(キャリア)になり、しばしば慢性肝炎、肝硬変や肝細胞癌を引き起こす。HBVは9種類のgenotype (A~H, J)に分けられ、それらはさらに複数のsubgenotype (HBV/B1等)に細分される。HBVのgenotypeやsubgenotypeの違いは地球規模での地域偏在性と相関し、また、慢性化率や発癌率など臨床病態との相関も指摘され

ている。我が国にはgenotype Cとgenotype Bが多く、前者は肝細胞癌の発症リスクが高いとされている。

HBVゲノムは約3.2 kbの不完全二本鎖環状DNAで、Pre-S/S遺伝子、Pre-C/C遺伝子、P遺伝子、X遺伝子の4つのopen reading frameが存在する。X遺伝子からHBxタンパク質(HBx)が産生される。HBxは細胞質と核の双方に存在する。HBxはウイルスゲノムの転写・複製に重要な役割を担うのみならず、多くの宿主因子と結合し、宿主細

胞の遺伝子発現やシグナル伝達を攪乱して、細胞に様々な影響を及ぼすことが知られている。

本研究では、タンデムタグ・アフィニティークロマトグラフィー/質量分析法等により見出した新規 HBx 結合宿主タンパク質のうち、癌抑制因子として知られペルオキシダーゼである Prdx ファミリーに属する peroxiredoxin 1 (Prdx1)、及び、様々な原癌遺伝子や細胞周期調節遺伝子の発現制御に関与しているヒストンメチルトランスフェラーゼ SMYD3 と HBx の相互作用について詳細に解析することを目的とした。

B. 研究方法

1) Prdx1 及び SMYD3 と HBx の相互作用の解析：細胞に発現プラスミドをトランスフェクションして Prdx1 あるいは SMYD3 と HBx の全長または欠失変異体あるいは点変異体を共発現させ、両者の結合や細胞内共局在について、免疫共沈法、Proximity ligation assay (PLA)法及び免疫蛍光共焦点顕微鏡法を用いて解析した。

2) Prdx1 のノックダウンあるいは過剰発現の影響の解析：Prdx1 mRNA に特異的な 2 種類の siRNA を細胞にトランスフェクションして Prdx1 の発現をノックダウンした。一方、Prdx1 の過剰発現は上記 1)の発現プラスミドを用いて行った。Prdx1 ノックダウンあるいは過剰発現の程度は抗 Prdx1 抗体を用いた免疫ブロット法にて確認した。

3) HBV pgRNA 発現量の解析：1.2 倍長の HBV ゲノム DNA (HBV/Bj_JPN56 及び HBV/C_ATJPN; 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター・溝上雅史センター長より分与)をトランスフェクションして得られた HBV 複製細胞における HBV pgRNA の発現量を、特異的プライマーを用いた定量 RT-PCR 法により測定した。

4) HBV/HBx 依存的酸化ストレス応答に及ぼす Prdx1 の影響の解析：Huh7.5 細胞に、Prdx1 特異的 siRNA あるいは対照 siRNA をトランスフェクション後、酸化ストレス応答検出用の ARE ルシフェラーゼレポーター遺伝子(pGL4.37)を全長 HBx あるいは変

異 HBx 発現プラスミドと共にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を指標にして、酸化ストレス応答に及ぼす Prdx1 の影響について解析した。

5) NF- κ B 及び JNK 経路に及ぼす HBx 及び SMYD3 の影響の解析：Huh7.5 細胞に、NF- κ B あるいは JNK 活性化検出用のルシフェラーゼレポーター遺伝子を、HBx 及び SMYD3 発現プラスミドと共にトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を指標にして、NF- κ B 及び JNK 活性化に及ぼす HBx 及び SMYD3 の影響について解析した。(倫理面への配慮)

種々のタンパク質の発現プラスミドの作製及び使用は、神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。遺伝子組換え HBV の使用は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認及び文部科学大臣の確認を得た。すべての遺伝子組換え実験は、神戸大学大学院医学研究科微生物学研究室において、遺伝子組換え実験及びバイオセーフティーに関する法令及び指針等に準拠して行った。

C. 研究結果

1) HBx の Prdx1 結合部位の同定：HBx の欠失変異体を用いた解析により、Prdx1 との結合には HBx の N 末端近傍領域のアミノ酸残基(aa)16~20 位が重要であることがわかった。さらに、この領域のアミノ酸残基を 1 つずつ Ala に置換して Prdx1 との結合について調べたところ、17 位の Cys を Ala に置換した場合に、両者の結合が全く認められなくなった。Leu-16、Leu-18、Arg-19、Pro-20 をそれぞれ Ala に置換した場合にも、両者の結合は有意に低下した。

2) HBV/HBx 依存的酸化ストレス応答遺伝子の誘導及びそれに対する Prdx1 の影響：ARE ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、HBV 複製細胞や HBx 発現細胞では酸化ストレス応答遺伝子が強く誘導されることがわかった。この酸化ストレス応答は、siRNA により Prdx1 をノックダウンすることにより有意に減弱した。

3) HBV pgRNA 発現に及ぼす Prdx1 の影

響：siRNAによりPrdx1の発現をノックダウンすると、HBV pgRNAの発現が有意に増加した。このHBV pgRNA発現増加は、HBV ゲノム複製レベルが低い genotype B (HBV/Bj_JPN56)でも、また、それより約1,000倍複製レベルが高い genotype C (HBV/C_ATJPN)でも、同様に見られた。

一方、発現プラスミドを用いてPrdx1を過剰発現させた場合、HBV ゲノム複製レベルが低い HBV/Bj_JPN56 では HBV pgRNA の発現が有意に増加した。しかし、HBV/C_ATJPN では変化が見られなかった。

4) HBxとSMYD3の結合領域及び細胞内共局在部位の解析：HBxとSMYD3の様々な欠失変異体を用いて、両者の結合領域の解析を行った。その結果、HBxのC末端領域(aa 131-154)とSMYD3のC末端領域(aa 269-288)が、両者の結合に関与することがわかった。両者の細胞内局在に関しては、全長HBxと全長SMYD3は主として細胞質で共局在することが明らかになった。また、両者の細胞質内共局在はPLA法によっても確認された。

5) HBV pgRNA発現に及ぼすSMYD3の影響：SMYD3の発現をsiRNAによりノックダウンした時、また、発現プラスミドにより過剰発現させた時、HBV pgRNAの発現量は、HBV/Bj_JPN56、HBV/C_ATJPNのいずれのウイルス株においても、有意な変化は認められなかった。

6) NF- κ B及びJNK経路に及ぼすHBx及びSMYD3の影響：ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、全長HBxあるいは全長SMYD3を過剰発現させると、NF- κ B及びJNK経路が軽度活性化される傾向が見られた。一方、全長HBxと全長SMYD3を共発現させると、NF- κ B及びJNK経路は有意に活性化された。

D. 考察

本研究において、新規HBx結合宿主因子として同定したPrdx1とHBxの相互作用について更に解析を進めた。その結果、Prdx1との結合にはHBxのN末端近傍領域のaa 16-20、とくにCys-17が重要であることが

明らかになった。

HBV複製細胞及びHBx発現細胞では、酸化ストレス応答遺伝子が強く誘導された。この酸化ストレス応答は、Prdx1をノックダウンすると有意に減弱した。この結果は、抗酸化タンパク質であるPrdx1の第一義的作用によるものと考えられる。

Prdx1発現をノックダウンすると、HBV pgRNAの発現が有意に増加した。この結果は、Prdx1がHBVゲノムの転写・複製に対して抑制的に作用することを示唆している。一方、Prdx1を過剰発現させた場合においても、HBVゲノム複製レベルが低いHBV/Bj_JPN56では、HBV pgRNAの発現が有意に増加した。この結果より、HBVゲノムの転写・複製に対するPrdx1の作用は、他の宿主因子からの影響をも受けている可能性が推察された。

以上を総合的にして、Prdx1はHBV感染に対する防御因子として機能している可能性が示唆された。

一方、もうひとつの新規HBx結合宿主因子として同定したヒストンメチルトランスフェラーゼSMYD3とHBxの相互作用についても解析を進めた。その結果、HBxのC末端領域(aa 131-154)とSMYD3のC末端領域(aa 269-288)が両者の結合に関与していること、及び、全長HBxと全長SMYD3は主として細胞質で共局在することが明らかになった。

SMYD3のノックダウン及び過剰発現はHBVの複製に有意な影響を及ぼさなかった。一方、HBxとSMYD3の相互作用により、NF- κ B及びJNK経路が有意に活性化された。両者の相互作用がHBVの生活環全般や他の細胞機能に及ぼす影響について、今後さらに解析を進める予定である。

E. 結論

HBxとPrdx1の結合にはaa 16~20、とくにCys-17が重要であることが示された。HBV複製細胞やHBx発現細胞では酸化ストレス応答遺伝子が強く誘導されるが、この酸化ストレス応答にPrdx1が大きく関与していることが明確になった。そして、

Prdx1 が HBV ゲノムの転写・複製に対して抑制的に作用している可能性が示された。

HBx と SMYD3 の相互作用については、HBx の C 末端領域(aa 131-154)と SMYD3 の C 末端領域(aa 269-288)が両者の結合に重要であることがわかった。SMYD3 は HBV の複製に有意な影響を及ぼさなかったが、HBx と SMYD3 の共発現により、NF- κ B 及び JNK 経路が有意に活性化された。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Utsumi T, Wahyuni RM, Lusida MI, Yano Y, Priambada NP, Amin M, Purwono PB, Istimagfiroh A, Soetjipto, Brulé A, Hotta H, Hayashi Y. Full genome characterization and phylogenetic analysis of hepatitis B virus in gibbons and a caretaker in Central Kalimantan, Indonesia. *Arch Virol*, 160: 685-692, 2015.
- 2) Utsumi T, Yano Y, Hotta H. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Asia. *World J Med Genet*, 4(2): 19-26, 2014.
- 3) Utsumi T, Lusida MI, Yano Y, Purwono PB, Amin M, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Progress in the control of hepatitis B virus infection among children in Indonesia. *J Vaccines Vaccin*, 5(5): 1000247, 2014.
- 4) Aweya JJ, Sze CW, Bayega A, Mohd-Ismail NK, Deng L, Hotta H, Tan YJ. NS5B induces up-regulation of the BH3-only protein, BIK, essential for the Hepatitis C virus RNA replication and viral release. *Virology*, 474: 41-51, 2015.
- 5) El-Shamy A, Hotta H. Impact of hepatitis C virus heterogeneity on interferon sensitivity: An overview. *World J Gastroenterol*, 20(24): 7555-7569, 2014.
- 6) Juniastuti, Wibowo BP, Wibawa IDN, Utsumi T, Mustika S, Amin M, Wahyuni RM, Kurniawan H, Hendrayana A, Setiawan PB, Yamani LN, Soetjipto, Yano Y, Hotta H, Hayashi Y, Lusida MI. Interleukin-28B polymorphisms and response of chronic hepatitis C patients from Indonesia to pegylated Interferon/Ribavirin treatment. *J Clin Microbiol*, 52(6): 2193-2195, 2014.
- 7) Ratnoglik SL, Jiang DP, Aoki C, Sudarmono P, Shoji I, Deng L, Hotta H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities. *PLoS ONE*, 9(6): e98877, 2014.
- 8) Takei S, Omoto C, Kitagawa K, Morishita N, Katayama T, Shigemura K, Fujisawa M, Kawabata M, Hotta H, Shirakawa T. Oral administration of genetically modified Bifidobacterium displaying HCV-NS3 multi-epitope fusion protein could induce an HCV-NS3-specific systemic immune response in mice. *Vaccine*, 32(25): 3066-3074, 2014.
- 9) Adianti1 M, Aoki C, Komoto M, Deng L, Shoji I, Wahyuni1 T S, Lusida M I, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiol Immunol*, 58(3): 180-187, 2014.

- 10) Ratnoglik S L, Aoki C, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N, Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*, 58(3): 188-194, 2014.
- 11) Aoki C, Hartati S, Santi MR, Lydwina, Firdaus R, Hanafi M, Kardono LB, Shimizu Y, Sudarmono P, Hotta H. Isolation and identification of substances with anti-hepatitis C virus activities from *Kalanchoe pinnata*. *Int J Pharm Pharmaceut Sci*, 6(2): 211-215, 2014.
- 12) Wahyuni TS, Widyawaruyanti A, Lusida MI, Fuad A, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hayashi Y, Aoki C, Hotta H. Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves. *Fitoterapia*, 99: 276-283, 2014.
- 13) Bai F, Yano Y, Kim SR, Seo Y, Miki A, Saito M, Hirano H, Momose K, Minami A, Hatazawa Y, Hayakumo T, Widasari DI, Rinonce HT, Sugano M, Tani S, Yoon S, Imoto S, Azuma T, Hotta H, Hayashi Y. Mutational diversity of NS5A and NS3 during triple therapy (telaprevir, pegylated-interferon- α 2b and ribavirin) for genotype 1b chronic hepatitis C: The Kobe Hepatitis Therapeutic Group. *Int J Mol Med*. 33(6): 1652-1656, 2014.
- 1) Deng L, Gan X, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. A tandem affinity purification analysis of HBx-interacting proteins and identification of two novel interactors Prdx1 and SMYD3. 2014 TASL-Japan Hepatitis B workshop. Taipei, Taiwan, April 19-20, 2014.
- 2) Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I, Hotta H. Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA , September 3-6, 2014.
- 3) Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA , September 3-6, 2014.
- 4) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 5) Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- β superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 6) Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N,

学会発表

- Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 7) Matsui C, Shoji I, Sianipar I R, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 α protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 8) Wahyuni T S, Widyawaruyanti A, Lusida M I, Fuad A, Soetjipto, Fuchino H, Kawahara N, Hayashi Y, Aoki C, Hotta H. Chalepin and pseudane IX isolated from *Ruta angustifolia* leaves inhibit hepatitis C virus replication. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara. Nara, September 23-26, 2014.
- 9) Utsumi T, Lusida M I, Yano Y, Wahyuni R M, Istimagfiroh A, Rinonce H T, Amin M, Juniastuti, Pranawa, Aditiawardana, Tjempakasari A, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Difference in the prevalence of hepatitis B and C virus infections among hemodialysis patients from private hemodialysis units in Surabaya, Indonesia. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara. Nara, September 23-26, 2014.
- 10) Amin M, Hadikusumo A A, Juniastuti, Wahyuni R M, Magfiroh A I, Utsumi T, Yano Y, Soetjipto, Hayashi Y, Hotta H, Lusida M I. Serologic and genotype analysis of hepatitis B virus among mothers with HBsAg positive and their family. The 6th International Seminar of Indonesian Society for Microbiology. Padang, Indonesia, October 16-17, 2014.
- 11) Utsumi T, Meilani, Amin M, Lusida M I, Istimagfiroh A, Wahyuni R M, Yano Y, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Serological markers of hepatitis A, B, C, and E viruses in highlanders of Papua, Indonesia. The 6th International Seminar of Indonesian Society for Microbiology. Padang, Indonesia October 16-17, 2014.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 松岡陽子, DENG Lin, 朝日朱美, 青木千恵, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による TGF- β スーパーファミリーにおける Smad2/3 と Smad1/5/9 経路の脱制御とその分子機序の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014年11月.
- 15) 甘 翔, DENG Lin, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによるミトコ

- ンドリア介在性アポトーシス誘導機構の
 解明. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会.
 横浜, 2014 年 11 月.
- 16) 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar I R, 南
 奈苗, DENG Lin, 堀田博. C 型肝炎ウイ
 ルス感染による Hepatocyte nuclear factor
 (HNF) -1 α 蛋白質の選択的分解機構. 第
 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜,
 2014 年 11 月.
- 17) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H.
 HCV NS5A interacts with lysine
 methyltransferase SMYD3 and
 transcriptionally activates the protein
 disulfide isomerase gene AGR3. 第 62 回日
 本ウイルス学会学術集会. 横浜, 2014 年
 11 月.
- 18) Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N,
 Deng L, Hotta H. HCV NS5A protein
 physically and functionally interacts with an
 OTU deubiquitinase. 第 62 回日本ウイル
 ス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月.
- 19) 内海孝子, Rury Mega Wahuni, Maria Inge
 Lusida, 矢野嘉彦, Nur Priambada,
 Mochamad Amin, Priyo Budi Purwono,
 Anittagwa Istimagfiroh, Anittaqwa
 Maghfirah, Soetjipto, 堀田博, 林祥剛. Full
 genome characterization and phylogenetic
 analysis of hepatitis B virus in gibbon and its
 caretaker in Indonesia. 第 62 回日本ウイル
 ス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月.
- 20) 青木千恵, Muhammad Hanafi, Leonardus
 B.S. Kardono, 清水洋子, Pratiwi
 Sudarmono, 堀田博. *Aspergillus terreus* 抽
 出液及びその精製物ロバスタチンは高濃
 度で C 型肝炎ウイルス感染性粒子の放出
 を促進する. 第 67 回日本細菌学会関西支
 部総会学術集会, 西宮, 2014 年 11 月.
- 21) 勝二郁夫, 松井千絵子, Imelda Rosalyn
 Sianipar, 南奈苗, Lin Deng, 堀田博. C 型
 肝炎ウイルスによる HNF-1 α 蛋白
 質の選択的分解機構の解析. 第 37 回
 日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11
 月.
- 22) 青木千恵, Muhammad Hanafi, Leonardus
 B.S. Kardono, 清水洋子, Pratiwi
 Sudarmono, 堀田博. *Aspergillus terreus* か
 らの精製物質ロバスタチンは C 型肝炎ウ
 イルス感染性粒子放出を促進する. 日本
 薬学会第 135 年会, 神戸, 2015 年 3 月.
- 23) Wahyuni T S, Widyawaruyanti A, Lusida
 M I, Fuad A, Soetjipto, Fuchino H,
 Kawahara N, Hayashi Y, Aoki C, Hotta H.
 Inhibition of hepatitis C virus replication by
 Chalepin and Pseudane IX isolated from
 Ruta angustifolia leaves. 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
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。

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：森川賢一 北海道大学医学部 助教

分担課題名：B型肝炎ウイルス肝炎により誘導される宿主因子の網羅的プロテオーム解析

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）は、宿主免疫からの逃避および慢性感染化、自身の効率よい複製や宿主との共存のために感染細胞内の細胞性因子や各種シグナル経路に関与することが知られている。特にその現象は、急性感染時やキャリアー状態からの急性増悪時に顕著に認めるとされている。本研究はHBV培養細胞モデルを用いて、HBV蛋白発現下において誘導される宿主因子を網羅的にプロテオーム解析する。HBV感染に関与している宿主細胞性因子の特定とその病原性発現機構を分子レベルで解明し、宿主因子をターゲットにした新たな抗ウイルス薬開発へと発展する基礎形成を目的とする。

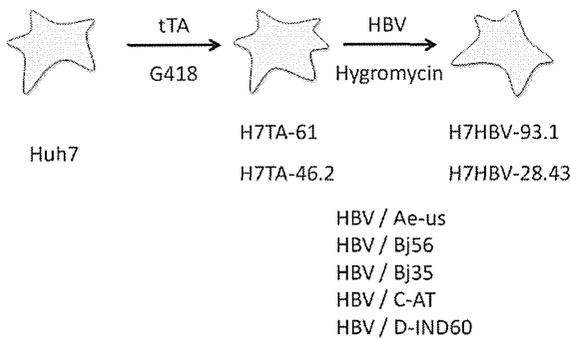
A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）細胞モデルを用い、HBV蛋白発現下において誘導される宿主因子を網羅的にプロテオーム解析する。

B. 研究方法

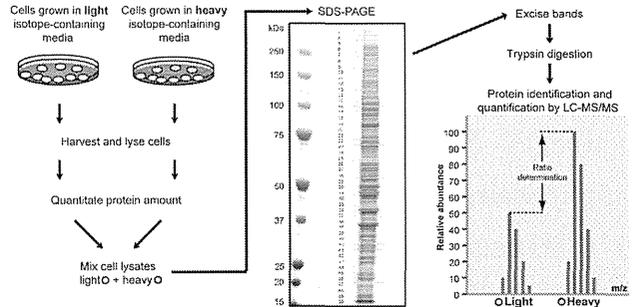
HBV蛋白発現調整細胞株を樹立する。HBV蛋白非発現群と発現群をSILAC法にて標識しプロテオーム解析により比較検討し、HBVにより誘導される宿主因子を検討する。

I.HBV細胞株の樹立方法



テトラサイクリントランスアクチベーター（tTA）を利用したTet-offの系を利用し、Huh7細胞株を元にHBV全長蛋白を下流にもつプラスミドを発現調整可能な安定細胞株を樹立する。これらの細胞株は、培養上清のテトラサイクリンの有無によりHBV蛋白の発現を厳密に制御する事が可能となる。

II.SILAC法の概要



テトラサイクリンによりHBV全長蛋白質の発現調整を制御する。同細胞株を培養液中のテトラサイクリンの有無により、HBV全長蛋白非発現群と発現群に調整する。また同時に両群をSILAC法により標識するため一方を通常の培養液で、もう一方を標識アミノ酸含有培養液で細胞培養を行う。継代を繰り返す事により標識アミノ酸が天然の細胞内合成経路により蛋白質中に導入される。

両方の細胞から蛋白質を抽出し等量ずつ混合したのちSDS-PAGEにて分離し、ゲルの各バンドをトリプシン消化して質量分析計により分析を行う。通常アミノ酸および標識アミノ酸でラベルされたペプチドは化学的に同一であるため、逆相クロマトグラフィーにおいて同時に溶出され、同時に質量分析される。得られた質量分析スペクト

ルにおける、通常および標識蛋白質に由来するペプチドのピーク強度の比率から、実験サンプル中の蛋白質の発現量変化を比較定量的に得ることが出来る。質量分析により網羅的・比較定量的に同定した蛋白を組織特異性、細胞内局在、生命情報学的手法を用いて選別を行う。

(倫理面への配慮)

- I. 本研究は病原微生物の取り扱いについて日本ウイルス学会の「ウイルス研究におけるバイオセーフティ指針」に基づきウイルス取り扱い者に対する安全対策と、ウイルスの実験施設外への漏出予防を十分に考慮し行う物とする。
- II. 細胞株作成に用いた患者血清は、すべての解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。
- III. 肝疾患患者からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し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わる手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。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する。当該研究機関の動物実験倫理委員会に申請し、承認を得た後に実施する。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)を遵守して実施する。

C. 研究結果

平成26年度は各遺伝子型HBVプラスミドの構築を行い、細胞株樹立を行った。パイロット試験として樹立した遺伝子型Dの細胞株を用いてSILAC法によるプロテオーム解析を行った。3828蛋白を比較定量的に同定し、約111蛋白がHBV蛋白発現時に有意に増減していた。ミトコンドリア関連蛋白の増加と小胞体関連蛋白の減少が、明らかな傾向として示された。

- I. B型肝炎ウイルス(HBV)発現調整細胞株を用

いてSILAC法による網羅的プロテオーム解析を行った。

- II. HBV蛋白発現時に細胞は、細胞周期や細胞分化が制御されている事が示唆された。
- III. HBV蛋白発現時でも、アポトーシスや細胞死を引き起こす可能性のある酸化ストレスの指標や活性酸素の上昇は軽度であった。
- IV. HBV genotype Ae, Bj-56, Bj-35, C, D株の蛋白発現調整細胞株を樹立した。

D. 考察

今回行ったプロテオーム解析の結果より、HBV蛋白が細胞内で発現する事により細胞周期、細胞分化の遷延化が引き起こされ持続感染化、癌化へと誘導される可能性が示唆された。臨床的特徴と比較検討を行うために、今後は各genotypeにより異なった臨床経過(慢性化率や発癌率等)をたどる理由を、細胞株樹立後遺伝子型毎にプロテオーム解析を行い、その病原性発現機構を詳細に検討できるようになる。

E. 結論

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

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

I.論文発表

1. Hiraide A, Hiroishi K, Shimazaki T, Eguchi J, Ishii S, Morikawa K, Sakaki M, Doi H, Omori R, Kajiwar A, Hayashi E, Shiina M, Hirayama Y, Imawari M. Increased expression of immuno-inhibitory molecules on peripheral blood lymphocytes may suppress disease progression in autoimmune hepatitis. *Hepatol Res.* 2015 in press.
2. Tsunematsu S, Chuma M, Kamiyama T, Miyamoto N, Yabusaki S, Hatanaka K, Mitsuhashi T, Kamachi H, Yokoo H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Orimo T, Wakayama K, Ito J, Sato F,

Terashita K, Nakai M, Tsukuda Y, Sho T, Suda G, Morikawa K, Natsuzaka M, Nakanishi M, Ogawa K, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging*. 2015 in press.

3. 森川賢一, 坂本直哉. 特集 今B型・C型肝炎をどう治療するか C型慢性肝炎の病態・自然経過と発癌. *消化器の臨床*. 2015 Feb; 18(1):53-58.
4. Welsch C, Haselow K, Gouttenoire J, Schneider M, Morikawa K, Martinez Y, Susser S, Sarrazin C, Zeuzem S, Antes I, Moradpour D, Lange CM. Hepatitis C virus variants resistant to macrocyclic NS3-4A inhibitors subvert IFN- β -induction by efficient MAVS cleavage. *J Hepatol*. 2014 Nov 21. pii: S0168-8278(14)00853-8. doi: 10.1016/j.jhep.2014.11.009. [Epub ahead of print]
5. Lange CM, Gouttenoire J, Duong FH, Morikawa K, Heim MH, Moradpour D. Vitamin D Receptor and Jak-STAT Signaling Crosstalk Results in Calcitriol-Mediated Increase of Hepatocellular Response to IFN- α . *J Immunol*. 2014 Jun 15; 192(12):6037-44.
6. Morikawa K, Gouttenoire J, Hernandez C, Dao Thi VL, Tran HT, Lange CM, Dill MT, Heim MH, Donzé O, Penin F, Quadroni M, Moradpour D. Quantitative proteomics identifies the membrane-associated peroxidase GPx8 as a cellular substrate of the hepatitis C virus NS3-4A protease. *Hepatology*. 2014 Feb; 59(2):423-33.

II. 学会発表

<国際学会 : Poster presentation >

1. Shimazaki T, Date T, Gouttenoire J, Quadroni M, Moradpour D and Morikawa K. THE HEPATITIS B VIRUS MODULATES CELLULAR FACTORS IN THE DIRECTION OF SLOWDOWN OR STOP CELL CYCLE AND PROLIFERATION. The 11th JSH Single Topic Conference. Hiroshima, Japan, 20-21 Nov 2014.
2. Tran HT, Morikawa K, Rose Z, Dao Thi VL, Penin F, Heim MH, Donzé O, Quadroni M, Gouttenoire J, Moradpour D. Identification of OCIAD1 as Cellular Substrate of HCV NS3-4A Protease. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Boston, USA, 7-11 Nov 2014.

3. Tran HT, Morikawa K, Rose Z, Dao Thi VL, Penin F, Heim MH, Donzé O, Quadroni M, Gouttenoire J, Moradpour D. Identification of OCIAD1 as Cellular Substrate of HCV NS3-4A Protease. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, 7-11 Sep 2014.

<国内学会 : Oral presentation >

1. 土肥弘義, 森川賢一, 吉田 仁. 肝硬変における液性免疫異常. 第40回日本肝臓学会東部会. 東京, 28 Nov 2014.
2. 大森里紗, 森川賢一, 林栄一, 荒井 潤, 梶原 敦, 宮下みゆき, 魚住祥二郎, 下間 祐, 打越 学, 土肥弘義, 坂木 理, 吉田 仁. 当院で経験したB型肝炎ウイルス再活性化9症例の検討. 第40回日本肝臓学会東部会. 東京, 28 Nov 2014.
3. 荒井 潤, 伊藤敬義, 打越 学, 下間 祐, 宮下みゆき, 森川賢一, 江口潤一, 吉田 仁. C型慢性肝炎におけるDAA, ペグIFN, リバビリン3剤併用療法とDAA2剤併用療法におけるB細胞HCV RNA及びISG発現動向の比較. 第40回日本肝臓学会東部会. 東京, 27 Nov 2014.
4. 林 栄一, 江口潤一, 坂木 理, 土肥弘義, 大森里紗, 梶原 敦, 伊藤敬義, 森川賢一, 吉田 仁, 石井成明, 広石和正, 井廻道夫. 肝細胞癌に対する樹状細胞と抗TIM-3抗体を用いた免疫療法の検討. 第50回日本肝臓学会総会. 東京, 30 May 2014.
5. 荒井 潤, 伊藤敬義, 打越 学, 下間 祐, 宮下みゆき, 森川賢一, 江口潤一, 吉田 仁. C型慢性肝炎患者に対するTVR3剤併用療法においてB細胞中ISG発現と治療前血清補体値は早期抗ウイルス状態確立に関連する. 第50回日本肝臓学会総会. 東京, 30 May 2014.
6. 森川賢一, 島崎とも江, 吉田 仁. プロテオミックスによる宿主因子を標的とした肝炎ウイルスによる新規創薬研究の可能性. 第50回日本肝臓学会総会. 東京, 29 May 2014.

<国内学会 : Poster presentation >

1. 魚住祥二郎, 馬場俊之, 坂木 理, 梶原 敦, 荒井 潤, 大森里紗, 下間 祐, 土肥弘義, 打越 学, 森川賢一, 吉田 仁. 肝硬変に合併した門脈血栓症に対してダナパロイドナトリウムによる血栓溶解療法の有効性に関する検討. JDDW2014(第22回日本消化器関連学会週間)(第18回日本肝臓学会大会). 神戸, 24 Oct 2014.

2. 打越 学、伊藤敬義、荒井 潤、下間 祐、宮下みゆき、坂木 理、土肥弘義、魚住祥二郎、大森里紗、梶原 敦、森川賢一、江口潤一、吉田 仁. TVR3 剤併用療法後の C 型慢性肝炎 SVR 患者における B 細胞 HCV、B 細胞活性化因子および免疫グロブリン以上の変化. JDDW2014(第 22 回日本消化器関連学会週間) (第 18 回日本肝臓学会大会) . 神戸, 24 Oct 2014.
3. 梶原 敦、下間 祐、林 栄一、荒井 潤、大森里紗、宮下みゆき、魚住祥二郎、打越 学、土肥弘義、坂木 理、森川賢一、江口潤一、伊藤敬義、吉田 仁. 当院における肝細胞癌に対する RFA 治療後の再発リスク検討についての因子. JDDW2014(第 22 回日本消化器関連学会週間) (第 18 回日本肝臓学会大会) . 神戸, 23 Oct 2014.
4. 下間 祐、伊藤敬義、江口潤一、柳川達郎、森川賢一、坂木 理、打越 学、土肥弘義、宮下みゆき、大森里紗、荒井 潤、梶原 敦、林 栄一、吉田 仁. 肝表病変に対するラジオ波焼灼術の成績と工夫. JDDW2014(第 22 回日本消化器関連学会週間) (第 18 回日本肝臓学会大会) . 神戸, 23 Oct 2014.
5. 森川賢一、伊達朋子、吉田 仁. HCV NS3-4A 蛋白複合体による宿主自然免疫の攪乱. 第 50 回日本肝臓学会総会. 東京, 30 May 2014.
6. 打越 学、伊藤敬義、荒井 潤、下間 祐、宮下みゆき、森川賢一、江口潤一、吉田 仁. C 型慢性肝炎における DAA、Peg-IFN、リバビリン 3 剤併用療法中の B 細胞活性化サイトカインの上昇と B 細胞異常関連因子の検討. 第 50 回日本肝臓学会総会. 東京, 30 May 2014.

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書（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

研究分担者：梁 明秀（横浜市立大学医学部微生物学）

研究協力者：松永智子、宮川 敬（横浜市立大学医学部微生物学）

分担研究課題：B型肝炎ウイルスタンパク質の発現、酵素活性および結合因子の解析

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）感染症に対するPegインターフェロン（IFN）療法の奏成功率が低い要因として、ウイルス側がIFN活性に対する拮抗因子を所持する可能性が考えられる。我々は、IFN誘導因子の一つであるTetherinが抗HBV活性を示す一方、HBs抗原がその抗ウイルス活性を失わせることでウイルス複製を維持していることを見いだした。TetherinはI型IFNにより誘導され、HBV粒子をエンドソーム膜に係留することで、感染性ウイルス粒子の産生を阻害した。一方、HBsタンパク質はC末端側の膜貫通ドメイン(TM4)を介してTetherinと結合し、Tetherinの抗ウイルス活性を阻害した。TetherinのHBs結合領域をトランスフェリン受容体の細胞膜ドメインに置き換えたキメラ変異体は、HBsによる拮抗を受けず、高い抗ウイルス活性を示した。これらの結果は、IFN誘導因子であるTetherinがHBVの粒子産生を負に制御する宿主因子であり、HBs抵抗性Tetherin変異体を細胞に導入することで、HBV感染を制御できることを示唆するものである。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）は感染しても多くの場合はウイルスが自然排除されるが、一部はキャリア化する。最近ではキャリア化しやすい欧米型（genotype A）ウイルスが日本に流入し、現行ワクチンの有効性やキャリアの増加が懸念されている。病状の進行は肝細胞におけるHBV量と相関があり、したがってウイルス量を低く維持することが重要である。HBVは感染細胞内で逆転写反応を行うため、治療には核酸アナログ製剤が使用されるが、長期服用による薬剤耐性ウイルスの出現が危惧されており、さらなる薬剤の開発が望まれている。また近年、Pegインターフェロン（IFN）療法が開始されたが、本療法の奏成功率はわずか2～3割であり、その要因も不明である。その一因としては、ウイルス側がIFNに対する拮抗メカニズムを所持する可能性が考えられる。

I型IFN誘導性の宿主防御因子Tetherinは感染細胞から新たに産生されたウイルスを細胞膜上に繫留することで様々なウイル

ス産生を阻害する。我々はTetherinを過剰発現するとHBV粒子がエンドソーム膜に係留され、感染性ウイルス粒子の産生が阻害される一方、HBs抗原が細胞内に存在するとTetherinの抗ウイルス活性が失われることを見いだした。そこで本年度はTetherinを標的とする新たな治療法を提案することを目的とし、(1)実際にTetherinがIFNのもつ抗HBV活性の一部であるかを検証のうえ、(2)電子顕微鏡を用いたTetherin発現細胞でのHBV粒子の挙動、(3)HBs-Tetherinの結合様式の解析とHBsによって拮抗されないキメラTetherinの作製、(4)HBs-Tetherin相互作用が細胞内シグナリングに及ぼす影響について調べた。

B. 研究方法

HBV産生過程におけるTetherinの阻害活性は、HepG2細胞にHBV分子クローンとTetherin発現ベクターをトランスフェクションして72時間後に上清および細胞を回収し、ELISA法とqPCR法を用いてHBs抗

原量とウイルス DNA 量を測定して判定した。またその時の細胞を固定包埋し透過型電子顕微鏡観察を行った。Tetherin-HBs 相互作用はコムギ無細胞系を用いて Tetherin, HBs を合成し、免疫沈降によって解析した。NFκB 活性化は、NFκB-Luciferase ベクターを Tetherin, HBs 発現ベクターと共発現させ 48 時間後に Luciferase アッセイを行った。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験については、組換え DNA 実験安全管理規則に基づき、横浜市立大学組換え DNA 実験安全委員会による審査・承諾を得て実験を行っている。

C. 研究結果

1) Tetherin は I 型 IFN の抗 HBV 活性の一部である

HepG2 細胞もしくはヒト初代肝細胞において、Tetherin は I 型 IFN 濃度依存的に発現上昇が見られた(図 1)。次に HepG2 細胞にあらかじめ Tetherin 特異的 siRNA またはコントロール siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に IFNα を処理した上で HBV 全長発現ベクター pUC19-HBV C/AT を遺伝子導入したところ、コントロール細胞では IFNα 濃度依存的な上清 HBsAg 量、HBV DNA 量の低下が見られた。しかし、Tetherin をノックダウンした細胞ではその低下がほとんど見られなかった(図 2)。これらの結果から、Tetherin は肝細胞において I 型 IFN 誘導性であること、また I 型 IFN のもつ抗 HBV 活性の一端を担う宿主防御因子であることが示唆された。

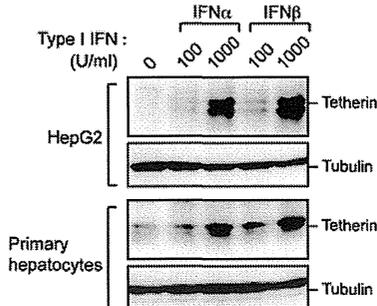


図 1. I 型 IFN による Tetherin 発現誘導

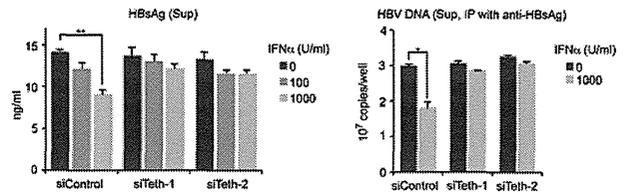


図 2. Tetherin ノックダウン細胞における IFN の抗 HBV 活性の低下

2) Tetherin 発現細胞では HBV 粒子がエンドソーム膜に係留される

電子顕微鏡を用いて Tetherin 発現細胞での HBV 粒子を観察したところ、HBV 様粒子が細胞内エンドソームでよく観察された(図 3)。Tetherin 陰性細胞ではこの現象はまったく見られなかった。さらにこれらの粒子はエンドソーム膜に係留されていた。

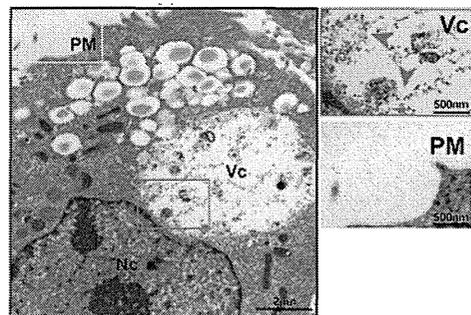


図 3. Tetherin 発現細胞における HBV 粒子のエンドソーム膜への係留 (PM:細胞膜, Vc:エンドソーム, Nc:核)

3) HBs-Tetherin の結合様式の解析と HBs 抵抗性 Tetherin の作成

これまでに HBs が Tetherin と結合し、拮抗することは分かっていたが、その詳しい結合様式は不明であった。そこで HBs および Tetherin の各ドメインを欠失させた変異体を作成し、それらの相互作用を調べたところ、HBs の最も C 末端側の膜貫通領域 (TM4) が Tetherin の膜貫通領域と相互作用することが分かった(図 4)。そこで HBs 抵抗性 Tetherin を作製すべく、Tetherin の膜貫通領域をトランスフェリン受容体もしくはマウス Tetherin の当該領域と置換したキメラ Tetherin (TFRTM, Mo-TM) を作製したところ、これらの変異体は HBs との相互作用が失われ、野生型 Tetherin よりも強

い抗 HBV 活性を示した (図 5)。

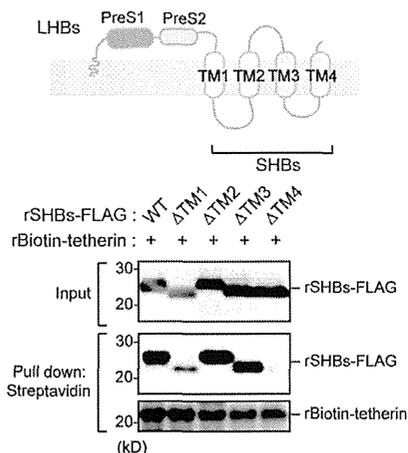


図 4. HBs TM4 を介した Tetherin との結合

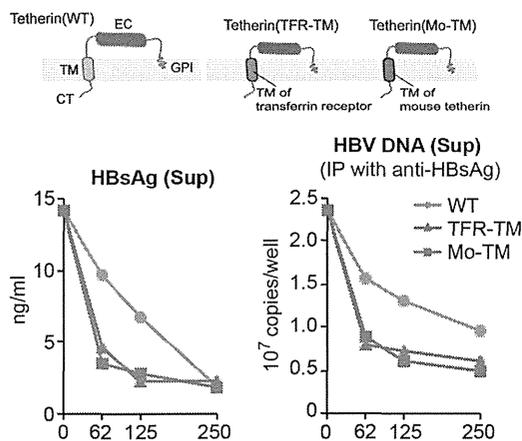


図 5. キメラ Tetherin による HBV 産生阻害

4) HBs-Tetherin 相互作用が細胞内シグナリングに及ぼす影響

Tetherin はウイルスを感知すると NFκB を活性化することで IL6 などの炎症性サイトカインを分泌することが知られている。そこで HBs と Tetherin を共発現させたところ、NFκB 活性化と IL6 mRNA 量の増加が見られた。一方、TM4 を欠失した HBs を Tetherin と共発現させたところ、NFκB 活性化は見られなかった。これらの結果から、Tetherin は細胞内で HBs を感知する細胞内ウイルスセンサーである可能性が示唆された。

D. 考察

本研究により、Tetherin は I 型 IFN のもつ抗ウイルス活性の一端として HBV 産生

過程を阻害することが分かったが、HBs の TM4 領域がこれを拮抗することで、実際には効率的な HBV 産生が起こることが分かった。このことは、PegIFN 療法の低い奏功率の一因かもしれない。一方で HBs 抵抗性 Tetherin を発現させることで Tetherin の抗 HBV 活性がレスキューされたことから、今後は本因子を肝細胞へ導入するなどの新規細胞療法への活用を模索したい。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Iwamoto M, Wakita T, et al., Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Hepatology*.2014;59(5):1726-37.

2. 学会発表

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

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。

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.

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.

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, Borroto-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, 2014 年 11 月, 神奈川.

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：渡士幸一 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

分担研究課題：培養系および *in vitro* 系を用いた HBV 感染複製阻害剤の探索

研究要旨：HBV感染複製阻害作用をもつ低分子化合物を同定するために、HBV受容体であるNTCPのリコンビナントタンパク質を作成した。これを3つの*in vitro*系での化合物スクリーニングに利用した。その結果、1) AlphaScreenにより、NTCPとLHBsの結合を阻害する168低分子化合物、2) RAPIDシステムにより、NTCPに結合する10の特殊環状ペプチド、3) 化合物アレイにより、NTCPに結合する74の低分子化合物、がそれぞれ得られた。それぞれの化合物をHBV感染許容性株HepG2-hNTCP-C4細胞を用いたpreS1 binding assay、HBV感染実験、またNTCPトランスポーターアッセイにより評価し、宿主細胞へのpreS1ペプチドの吸着およびHBV感染を阻害する化合物およびペプチドを得た。このように本研究では*in vitro*系でのスクリーニングによりHBV感染阻害化合物を同定できることが明らかとなった。

A. 研究目的

HBV感染を排除する治療薬としては核酸アナログとインターフェロン類が存在するが、本研究では異なる作用点をもつ抗HBV剤として、HBVの宿主細胞への吸着・侵入を阻害する化合物の取得を目指した。特にHBV受容体として報告された sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)に着目し、リコンビナントNTCPタンパク質を用いた3種の*in vitro*アッセイ系でスクリーニングをおこなった。

B. 研究方法

(1) AlphaScreenによるNTCP-LHBs結合阻害化合物の同定

リコンビナントHisタグ付加NTCPタンパク質 (His-NTCP) および GST タンパク質 (His-GST)、biotin 付加 LHBs タンパク質

(bio-LHBs)、MHBs タンパク質 (bio-MHBs)、His タグ (bio-His) はコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系により合成した。本 AlphaScreen アッセイでは主に His-NTCP と bio-LHBs を用いたが、シグナルが NTCP と LHBs の特異的結合によるものであることを示すために His-NTCP の代わりに His-GST、bio-LHBs の代わりに bio-MHBs を用いた。スクリーニングには当研究室で保有する化合物などを含めた 1536 化合物を用いた。一次スクリーニングとして His-NTCP と bio-LHBs を用いた AlphaScreen のシグナルを 1/10 以下に低下させるものをヒットとした。二次スクリーニングでは偽陽性を除くために bio-His から定常的に発するシグナルを検出し、これを His-NTCP と bio-LHBs を用いた AlphaScreen シグナルと同程度に低下させる化合物を除いた。またそれぞれの系で用量依存性を確認した。三次スクリ

ーニングでは HBV 感染許容性細胞株 HepG2-hNTCP-C4 細胞を用い、これと LHBs 内の HBV 吸着・侵入に関わる preS1 領域からなる蛍光ペプチド (preS1 ペプチド) との吸着を評価した。さらに四次評価において HBV の HepG2-hNTCP-C4 細胞への感染を調べた。

(2) RAPID システムにより得られた NTCP 結合特殊環状ペプチドの HBV 感染抑制効果

RAPID システムによりリコンビナント His-NTCP に結合するものとして得られた 10 の特殊環状ペプチドの、HBV 吸着および感染を、それぞれ preS1 binding assay および HBV 感染アッセイにより評価した。preS1 binding assay、HBV 感染アッセイは (1) と同様の方法によりおこなった。

(3) 化合物アレイにより得られた NTCP 結合化合物の HBV 感染抑制効果

化合物アレイによりリコンビナント His-NTCP に結合するものとして得られた 74 化合物の HBV 吸着および感染を、それぞれ preS1 binding assay および HBV 感染アッセイにより評価した。preS1 binding assay、HBV 感染アッセイは (1) と同様の方法によりおこなった。

C. 研究結果

(1) AlphaScreen による NTCP-LHBs 結合阻害化合物の同定

コムギ胚芽無細胞タンパク質合成系を用いて合成した His-NTCP および bio-LHBs を用いて、これらの結合によりシグナルが検出される AlphaScreen 系を確立した。His-NTCP の代わりに His-GST、あるいは

bio-LHBs の代わりに bio-MHBs を用いることによってこの顕著なシグナルは検出されないことから、この AlphaScreen シグナルは NTCP と LHBs の特異的結合によるものであることが示唆された。またこれまで NTCP と LHBs の結合を阻害することが知られているシクロスポリンはシグナルを用量依存的に低下させた。さらにアッセイに用いる buffer を最適化することにより、シクロスポリン添加で AlphaScreen シグナルを約 1/10 にまで低下させるスクリーニング系を確立することができた。この系を用いて化合物スクリーニングを行い、AlphaScreen シグナルを 1/10 以下に低下させる 168 化合物を一次ヒットとして得た。

偽陽性を除くために、bio-His から定常的に発するシグナルを上記と同様に低下させる化合物をのぞき、二次ヒットとして 130 化合物を選別した。

三次スクリーニングとして培養系における preS1 binding assay をおこない、preS1 ペプチドの HepG2-hNTCP-C4 細胞への吸着を阻害するものとして 27 化合物を得た。

さらにこの中から HepG2-hNTCP-C4 細胞への HBV 感染を用量依存的に阻害するものとして 14 化合物を同定した。

(2) RAPID システムにより得られた NTCP 結合特殊環状ペプチドの HBV 感染抑制効果

RAPID システムによりリコンビナント His タグ付加 NTCP タンパク質に結合するものとして得られた 10 の特殊環状ペプチドの、preS1 binding assay に対する影響を評価した。その結果 100 μ M においてはいずれのペプチドも、preS1 ペプチドの HepG2-hNTCP-C4 細胞への吸着を阻害した。