

201423032A

厚生労働省科学研究補助金

肝炎等克服実用化研究事業（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の

樹立及び感染系による

病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発

平成 26 年度 総括・分担研究報告

研究代表者 上田 啓次

平成 27 (2015) 年 3 月

I. 総括研究報告

B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発

上田 啓次

II. 分担研究報告

1. 感染誘導/非誘導した肝癌細胞を用いた差分解析による感染受容体の分離・同定

上田 啓次

2. HBV受容体発現細胞株の樹立と感染初期過程を標的にした抗ウイルス剤探索

森石 恆司

3. 発現・精製したHBV膜蛋白をプローブとした相互作用因子の網羅的分離による

HBV感染受容体の分離・同定

黒田 俊一

4. HBVエンベロープタンパク質と相互作用する細胞膜表面分子の網羅的探索

黒木 和之

5. HBV感染におけるリン酸化タンパク質の機能解析

岡本 徹

6. 細胞表面の糖鎖変化とHBV感染に関する研究

三善 英知

7. HBV 感染機構に寄与する HBV 表面抗原由来糖鎖構造の解析

三崎 亮

8. HBV 感染による病態発症機構の解析

竹原 徹郎

9. HBV 複製抑制機構におけるトリプトファン代謝酵素 (IDO) の関与

考藤 達哉

10. 正常ヒト肝細胞で発現する miRNA と HBV 感染関連及び HBV 感染による miRNA

発現変動の解析

吉山 裕規

11. HBVポリメラーゼ発現・精製と活性測定系の確立, 立体構造解析

大崎 恵理子

12. NTCP 大量発現・精製と立体構造解明への試み

斉藤 伸一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）

総括研究報告書

B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による
病態機構の解析と新規抗HBV剤の開発

研究代表者： 上田 啓次

大阪大学大学院医学系研究科 感染症・免疫学講座ウイルス学 教授

研究要旨： B型肝炎ウイルス（HBV）感染受容体を分離・同定し、HBVには簡便かつ有効な感染系を樹立する。HBV感染機構を含めたHBVの生活環、HBV関連病態発症機構を解明し、HBVの特性や病態に基づいた治療法の開発を促進すること、糖鎖修飾とウイルス感染動態や病態発症との関連やHBV持続感染にみられる免疫抑制機の解明から抗HBV創薬の実現につなげることを目標として研究を展開した。受容体関連では、昨年度分離したHBV膜蛋白であるPreS1～HBsN末領域と相互作用する因子（HBV-RX1）が、preS1：2-47アミノ酸領域と相互作用することを確認した。またNTCPに関しては、ヒト肝癌由来培養細胞株HepG2における発現でHBV感染が許容されること、EDTA-トリプシン処理することで著しい感染性することを見出した。このことはNTCP発現局在とHBV感染経路を示唆する重要な知見と考えられた。擬似HBV粒子BNCに結合する新たなかん実質細胞因子を分離した。糖鎖関連では、HBV産生細胞で特にフコース残基もつ分岐型糖鎖が顕著に増加することが判明し、逆にフコースの付加に関わる等転移酵素、Fut8の強制発現でBNCの取込が上昇、ノックダウンで低下するなど、フコース修飾とHBVの感染性は相関することがわかった。免疫抑制機構に関しては、B型慢性肝炎患者において、PD-1陽性NK細胞は、肝障害に関連し、Tim-3陽性T細胞が、HBVの持続感染に関連する可能性が示唆された。またHBVの複製抑制にPDCとNKの相互活性化作用が関与しており、IDOの誘導が重要であることが示された。HBVpolのRT活性ドメインの大腸菌発現系で、高純度精製し、DNAもしくはRNA依存性DNA合成活性の検出に成功、high-through-put活性測定系樹立に目処がたった。

研究分担者 森石 恆司
山梨大学大学院医学工学総合研究部 教授

研究分担者 岡本 徹
大阪大学微生物病研究所 助教

研究分担者 黒田 俊一
名古屋大学大学院生命農学研究科 教授

研究分担者 黒木 和之
金沢大学がん進展制御研究所 准教授

研究分担者 三善 英知
大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究分担者 三崎 亮
大阪大学生物工学国際交流センター 講師

研究分担者 竹原 徹郎
大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究分担者 考藤 達哉
国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター 肝疾患先進医療
研究室長

研究分担者 吉山 裕規
島根大学医学部 教授

研究分担者 大崎 恵理子
大阪大学大学院医学系研究科 助教

研究分担者 斉藤 伸一
大阪大学大学院医学系研究科 特任助教

A. 研究目的

我国のHBV感染患者は約150万人存在すると推定され、HBV感染症の制御・克服は重要な課題である。現行の抗HBV剤はHBVの特性に基づいて開発されたものではなく、また変異体の出現も多い

(J. Antimicro. Chemother. 61:766)。HBV感染を感染患者から消滅させるには、HBVの特性に基づいた新規薬剤・治療法の開発が望まれる。

本問題の解決にはHBV感染現象を容易に

観察できる感染系の構築が不可欠であり、それにはHBV感染受容体を分離・同定する必要がある。簡便な*in vitro*、個体レベルでの感染系の構築によりHBV感染制御へ向けた新たな展開が期待できる。

私どもは本問題の解決に向けたここ数年の成果として、HBV膜粒子を被ったレトロウイルス (HBV pseudotype particle; HBVpp) やEGFP、YFPなどの蛍光蛋白遺伝子やルシフェラーゼ遺伝子を内在したリコンビナントHBVの作製に成功し、感染能を指標にしたHBV感染受容体のスクリーニング系を開発した。HBVppを用いた実験で肝癌由来培養細胞株にHBV付着因子が存在するという結果も得つつある。2012年に報告されたHBV感染受容体としてのNTCPのヒト肝癌由来培養細胞株における発現はHBVの感染に十分であることを確認し、このことを踏まえて、HBV感染受容体全容の解明と立体構造に基づく薬剤探索を促進させたい。

HBV感染病態 (肝炎、肝硬変、肝癌) では糖鎖修飾状態が変動し (Trends Microbiol. 14:211)、免疫担当細胞の活性化に影響を与えている可能性がある。HBVの糖鎖修飾を標的にした抗HBV剤の開発も重要と思われる (Antiviral Res. 80:11)。HBVの人工的持続感染細胞 (HB611、PNAS 84:444) や遺伝子発現系で糖鎖修飾の変動や免疫制御系遺伝子のプロファイルを探索し、肝炎発症機序の解明に迫る。

また、HBVポリメラーゼ活性測定系を確立し、これまで不可能であった high-throughput試験管内抗HBV剤マスキリーニング系を確立する。また高純度・大量精製から立体構造の解明とそれに基づく

薬剤探索を目指す。

B. 研究方法

HBV 受容体の分離・同定と感染系の確立。

上田

1) HBV preS1~SSN 結合因子の ORF をクローニングし、肝癌由来培養細胞株で発現させ、合成 preS1 (myristoyl-2-47) ペプチドを用いて結合性を確認した。

2) NTCP 発現細胞を作製し、HBV 感染能や BNC 取込み能を検討した。

森石

3) PreS1 に結合能により NTCP 発現細胞を分画し、NTCP 高発現株を分離し、種々の感染法を検討した。

4) NTCP 発現 HBV 感染系で抗 HBV 化合物の同定を試みた。

黒田

5) BNC のヒト肝臓細胞への感染機構を解析するために、各種蛍光標識した BNC を調製し、in vitro においてヒト肝臓由来細胞 (Huh7 (低親和性 HBV 受容体を多量に発現; NTCP 発現は微量), HepG2 (低親和性 HBV 受容体を微量発現; NTCP 発現は極微量), HepG2-NTCP (感染研 脇田先生・渡土先生から供与))、又は非ヒト肝臓由来細胞 (HEK293) への結合と侵入を共焦点顕微鏡や FACS により解析した。

岡本

6) ヒト NTCP を発現するトランスジェニックマウス (hsNTCP-TG) を作製を試みた。

7) hsNTCP-TG から初代肝細胞を取得して HBV 感染性を検討した。

8) NTCP 以外に HBV 感染に関わる膜タ

ンパク質がないかを検討するため、NTCP を発現していない HepG2 細胞から膜画分を精製し、マウスに免疫することで、血清、ならびにハイブリドーマを作製した。

黒木

9) 組換えHBVベクターの構築: マーカー遺伝子 (新たに核内局在シグナルを導入した GFP および RFP) を HBV ベクターの HBV S 遺伝子もしくはその近傍へ塩基数を合わせて置換した。発現プロモーターを HCMV IE プロモーターに置き換えたものも作製した。

10) 組換えHBVパッケージング細胞の作製: HBV core、pol、X 遺伝子発現用と HBV envelope 遺伝子発現用レトロウイルスベクターを HepG2 細胞や HEK293 細胞の他に導入し HBV パッケージング細胞を樹立した。

11) iPS 細胞株の樹立: ヒト成人および新生児皮膚繊維芽細胞、また、単核細胞からセンダイウイルスベクターを使って山中 4 因子を導入する CytoTune-iPS2.0 (ディナベック) 法を用いて iPS 細胞株を樹立した。iPS 細胞は rBC2LCN-FITC (和光純薬) を使った生細胞染色により選択、単離した。肝細胞への分化誘導はアルブミン等の発現を RT-PCR で測定することにより検討した。

斉藤

12) 9回膜貫通型タンパクである NTCP は、従来の大腸菌を用いた発現系での発現が困難であった為、ブレヴィバチルス菌を用いた発現系でも NTCP 発現を試みた。

吉山

13) HBV に感染可能な細胞と感染不能な細胞の miRNA 発現変化を比較する。また、感染可能な細胞で、HBV 感染前と感染後の miRNA 発現変化を比較する。変化が認められ

たmiRNAの標的遺伝子を同定する。

糖鎖修飾とHBV感染・増殖・病態.

三善

1) ヒト肝がん細胞株Huh6とHB611を通常の条件で培養し、BNCを添加後3時間のBNCの取り込みをFACSと共焦点顕微鏡で観察した。最も変化の見られたフコース転移酵素Fut8の過剰発現とノックダウンによるBNCの取り込み変化を検討した。コアフコースを認識するレクチンPhoSLの添加やインターフェロンによるBNCの取り込みの違いも検討した。それぞれのケースでのNTCPの発現の変化を観察し、BNCの取り込みとの関係を考察した。また、糖鎖の違いによるNTCPとの結合性の違いをグライコプロテオミクスの方法によって解析した。

三崎

2) EndoM-N175Qを利用し糖鎖改変HBVの作製のための予備実験を行った。

3) 昆虫細胞を利用することにより、HBV様粒子の大量生産を試みた。また系におけるHBV様粒子の糖鎖プロファイルを作成した。

HBVによる免疫抑制機構の解明.

竹原

1) HBV発現細胞株であるHepG2. 2. 15、HB611、その親株であるHepG2、Huh6を用いてPD-L1の発現頻度を解析した。

2) 健康成人の末梢血単核球とHBV発現細胞株とを共培養することで、NK細胞、T細胞、NKT細胞のPD-1、Tim-3発現頻度の変化を検討した。

3) B型肝炎患者の末梢血単核球を採取し、フローサイトメトリーにてNK細胞(CD3⁻CD56⁺細胞)、T細胞(CD3⁺CD56⁻細胞)、NKT細胞(CD3⁺CD56⁺細胞)のPD-1、Tim-3の発現を解析した。

考藤

4) CRISPR/CAS9系を用いてIDO欠失(IDO-KO)HuH7を樹立した。またDoxycycline(DOX)誘導性にIDOを発現するHuH7を作成した。

5) DCサブセット(PDC、MDC、BDCA3DC)とNK細胞を採取し、HBV-Huh7と共培養して、I型、II型、III型IFNの産生と肝細胞ISGの誘導とIDOの発現、及びHBV複製抑制効果を検討した。

HBVポリメラーゼの発現・精製とアッセイ系の確立.

大崎

1) HBVポリメラーゼ逆転写ドメイン(RT)の大腸菌のコドン利用に則したStrep-RT-His₆を構築し、変性条件下で発現・精製を行った。

2) 巻き戻しによる活性測定系構築を試みた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え実験指針に基づき諸施設において申請・許可、場合によっては大臣確認実験承認を得た上で研究を遂行した。ヒトサンプルの使用に当たっては、施設倫理委員会にて実験内容が承認を受け、B型肝炎患者及び健康者に文書を用いて説明の上、署名による同意を得た上で行った。

C. 研究結果

・研究代表者（上田啓次）

(1) 発現差分解析あるいはPreS1～HBs N端部の pull-down アッセイにより、HBV-RX1-1、HBV-RX1-2、HBV-RX2 を分離した。これらはすべて、ヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 で発現しているタンパクであり、発現局在は細胞質と考えられた。

(2) HBV-RX1-1 と合成 preS1 (myristoyl-2-47) ペプチドとの相互作用が確認されたが、HBV-RX1-2、HBV-RX2 との相互作用は確認されなかった。

(3) NTCP 発現ヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 は HBV 50～100 G. E. I. で感染を許容することが確認できた。

・研究分担者（森石恆司）

(1) NTCP発現HepG2では、Trypsin EDTA 処理による浮遊細胞に対する感染効率が有意に高かった。また、EDTA単独による浮遊細胞処理との感染効率における差が認められなかったことから、トリプシン酵素活性は感染効率上昇に重要でないことが示唆された。

(2) 本感染培養細胞系を用いて、抗HBV 剤スクリーニングを行い、Proscillaridin A (EC50 = 7.2 nM、SI値75.5) を得た。Proscillaridin A処理はpreS1ペプチド結合活性を阻害しなかったことから、Proscillaridin Aの抗HBV感染阻害活性の作用点はpreS1が細胞表面に接着した後の過程であることが示唆された。

・研究分担者（黒田俊一）

(1) BNCとHuh7細胞間結合における

NTCPの関与：Cf633蛍光標識BNCはHuh7細胞とNTCP発現に関係なく高い結合能を示した。また、BNC-Huh7間の高度な親和性はNTCPに依存しないことが確定した。

(2) HepG2-NTCP細胞とMyr47の結合に対するBNCの効果：HepG2-NTCP細胞にTAMRA蛍光標識Myr47：BNC（5：1）を添加したが、Myr47の結合には全く影響はなく、NTCP-Myr47結合（ヒト肝臓細胞へのHBV感染に必須と考えられている結合）に対し、BNCは無関係であることが判明した。

(3) Myr 化及び脱糖鎖 BNC（元来、HBV由来Lタンパク質はMyr 化、糖鎖なし）が、未処理 BNC と比較して非常に効率よく、ヒト肝臓由来細胞に結合して細胞内に進入した。

・研究分担者（岡本 徹）

(1) 肝臓特異的なプロモーターである、アルブミンプロモーターを用い、hsNTCP-TGを作製した。

(2) hsNTCPの発現をウエスタンブロットと免疫染色で検討し、肝細胞膜表面に発現していることが確認した。

(3) hsNTCP-TGマウスから環流法によって初代肝細胞を取得してHBVを接種したところ、hsNTCP-TG由来の初代肝細胞は全く感受性を示さなかった。

(4) NTCPを発現していないHepG2細胞から、膜画分を精製し、マウスに免疫して抗体を作製した。免疫したマウス血清から精製したIgG画分に、HBVの感染中和活性が認められた。

(5) HepG2細胞膜画分を免疫したマウスからリンパ節を採取し、ハイブリドーマを作製し、そこに中和活性のあるモノクローナル抗体の作製を開始した。

・研究分担者（黒木和之）

(1) 組換えHBVベクターの構築: 蛍光蛋白質をHBV感染のマーカー遺伝子としたHBVベクター(HBV-GFPNuc、HBV-RFPNuc)を作製し、パッケージング細胞から $10^5 \sim 10^6$ /mlのHBV-GFPNuc粒子を含む培養上清を得た。しかし、NTCP発現HepG2細胞への感染実験では感染成立を示す明確なGFPの核内局在を確認することができず、さらに他の細胞を用いた検討が必要である。

(2) 組換えHBVパッケージング細胞の作製: 作製したパッケージング細胞では成熟HBV粒子と同程度あるいはそれ以上の不完全HBV粒子が産生されていることが抗HBs抗体および抗HBc抗体を用いた免疫沈降法による解析から示された。

(1) iPS細胞株の樹立: CytoTune-iPS2.0の導入によ0.1%程度の頻度でiPS細胞が出現した。iPS細胞はrBC2LCN-FITC(和光純薬)を使った生細胞染色により確認し単離した。各導入実験からそれぞれ24クローンを単離し、分化等不安定なものを除き現在それぞれ5クローンを得た。

・研究分担者（三善英知）

(1) HBVゲノム遺伝子をHuh6に安定的に組み込んだHB611細胞では、親株に比べ、コアフコースの増加とシアル酸の増加、お

よびE4-PHAとの結合性の低下を認めた。

(2) HBVの疑似ウイルスとなるBNC(Bio-nanocapsule, 名古屋大学黒田教授から供与)の取り込みは、HB611ではHuh6に較べてBNCの取り込みが有意に上昇していた。

・研究分担者（三崎亮）

(1) 糖鎖供与体基質にシアリルグリコペプチドを用いてRNaseBの糖鎖改変(高マンノース型→シアリルバイアンテナ型)を行った。今回の糖鎖変換実験系では、EndoM-N175Qによる糖転移効率供与基質:受容体基質=3000:1の場合で最大の約20%となった。

(2) バキュロウイルス発現系を利用して、L、S、Cタンパク質の同時発現を行ったが、昆虫細胞内でのLタンパク質生産は確認できたものの、ウイルス様粒子、Lタンパク質は培養液中への分泌は認められなかった。

・研究分担者（竹原徹郎）

(1) HBV発現細胞株であるHepG2.2.15、HB611(図1青線)において、その親株(図1赤線)と比較し、PD-1リガンドであるPD-L1の発現亢進を認めた。

(2) また、HB611と末梢血単核球とを共培養することで、末梢血単核球中のPD-1発現NK細胞の頻度が上昇した。T細胞やNKT細胞のPD-1、Tim-3には有意な変化は認めなかった。

(3) 健康成人と比較し、B型慢性肝炎患者ではNK細胞頻度の減少、T細胞頻度の上昇を認めた。健康成人・B型慢性肝炎患者いずれにおいてもPD-1発現頻度と各種

免疫細胞の頻度には負の相関を認めた。各種細胞の PD-1、Tim-3 発現に関しては健康成人と B 型慢性肝炎患者では有意差を認めなかった。

(4) B 型慢性肝炎患者における検討では、血清 ALT 値と PD-1 陽性 NK 細胞の頻度には正の相関を認めた ($r=0.46$, $p=0.028$) (図 2)。HBe 抗原陽性例、HBs 抗原高値例 (1000IU/ml 以上) において Tim-3 陽性 T 細胞の頻度は有意に上昇しており、HBV-DNA 量と Tim-3 陽性 T 細胞の頻度に正の相関を認めた ($r=0.41$, $p=0.044$) (図 3)。NKT 細胞に関しては各種臨床データとの有意な相関は認めなかった。

・研究分担者 (考藤達哉)

(1) HBV-HuH7 と NK、pDC の共培養で、HBV 複製は強く抑制された。この HBV 抑制効果は、IDO-KO-Huh7 では減弱し、DOX によって HuH7 に IDO を再誘導すると HBV 抑制効果は回復した。ISG、IDO の誘導と HBV 複製抑制効果は正相関した。

・研究分担者 (大崎恵理子)

(1) **Strep, His** タグへと変更することにより高純度な精製が可能となった。

(2) 糖鎖ポリマーである NV10 (Novexin) 存在下でのリフォールディングで量依存的なポリメラーゼ活性の回復が確認された。

D. 考察

1) HBV-RX1 は HBV 生活環において、機能の一端を担っていると考えられたが、

発現局在が細胞質であったことから、HBV の付着・侵入に直接機能している可能性は低いものと考えられた。

2) ヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 における NTCP 発現は HBV 感染に十分と思われたが、単独で機能しているかどうかは不明であり、HBV 感染受容体複合体としての解明は尚必要と考えられた。

3) EDTA のみの剥離と比較すると、Trypsin のプロテアーゼ活性はむしろ重要ではなく、細胞を一端浮遊させて感染させることが重要と思われた。HepG2 は細胞接着が強く、Trypsin 処理する必要がある、Trypsin EDTA 処理が細胞感染に有効であると思われた。

4) Proscillaridin A ($EC_{50} = 7.2$ nM、SI 値 75.5) は新抗 HBV 剤候補になり得る。

5) NTCP 非依存的な HBV の感染機構が存在し、BNC は NTCP 非依存的な HBV 受容体探索プローブとして有用である。

6) Myr 化及び脱糖鎖 BNC (元来、HBV 由来 L タンパク質は Myr 化、糖鎖なし) の高取込は、Myr 化と細胞膜融合との関連を示唆している。また糖鎖は HBV の感染に直接的には関わっていないものと思われた。

7) HBV 感染には NTCP 以外の膜タンパク質の関与が示唆され、NHepG2 細胞の膜画分で免疫したマウスの IgG 画分に、HBV に対する中和活性が検出されたことから、NTCP 以外の宿主因子の存在が示唆された。

8) NTCP_{Brevi} 変異体をより安定に発現させる為、さらに GST などの可溶化タグ導入、可変領域の削除、および NTCP ORF 配列への点変異導入を加えることで発現量が改善する可能性が考えられた。

9) HB611 細胞におけるコアフコースとシアル酸の増加は HBV が自らの増殖や感染に有利な方向に細胞の形質を変化させる可能性を示唆している。またコアフコースの過剰発現とロックダウンによって、BNC の感染と細胞表面のコアフコースの重要性が明らかになった。

10) 糖鎖改変を経由した HBV 様粒子の作製には mg オーダーの受容体 HBV 様粒子の確保が必要であるが、酵母を利用して生産した BNC を利用することで問題の解決に近づけた。供与体基質にシアリルグリコペプチドおよびオキサズリン化シアリルバイアンテナ型糖鎖を用いているが、EndoM-N175Q の糖転移反応においてはオキサズリン化糖転移効率が良いことが分かった。

11) ALT 上昇とともに PD-1 陽性 NK 細胞が増加していることから、肝障害に PD-1 陽性 NK 細胞が関与している可能性が示唆された。

12) HBs 抗原高値例において、Tim-3 陽性 T 細胞が増加しており、HBV-DNA 量との正の相関も認めることから、T 細胞における Tim-3 発現が、免疫機能を抑制しウイルスの増殖・持続感染に関与している可能性が示唆された。

13) 急性期の免疫細胞による HBV 複製抑制効果に IDO が関与していることが示された。IDO 誘導効率の向上が抗 HBV 活性の増強に繋がる可能性がある。

E. 結論

1) 培養細胞における HBV 受容体の発現と HBV の感染様式に関し、細胞接着面を

経由するなど興味深い結論が得られた。

2) NTCP は単独で HBV 受容体として機能しているのではなく、副因子の存在が示唆された。

3) 感染時に感染許容細胞を Trypsin-EDTA 処理することによって NTCP 依存の感染の効率が上昇することがわかり、この手法によって抗 HBV 剤スクリーニングが可能であることが示唆された。

4) 「2 段階 HBV 受容体説」を支持する結論を得た。低親和性 HBV 受容体はヘパラン硫酸依存性であり、高親和性 HBV 受容体は NTCP と酸性処理耐性の少なくとも 2 種類が存在する。

5) 成熟リコンビナント HBV 粒子の産生を高めた HBV パッケージング細胞を構築した。ニワトリ肝癌由来 LMH 細胞より得られた HBV パッケージング細胞は組換え HBV 粒子の産生に有用であった。

6) HBV 感染細胞と非感染細胞で発現する

7) RNA の次世代シーケンスを行い、バイオインフォマティクス解析を開始した。

8) 肝がん細胞に HBV が感染する時に、コアフコースという細胞表面の糖鎖が重要である。

9) HBV 感染阻害薬開発の対象としてフコース結合型糖鎖を合成するために必要とされる酵素、糖ヌクレオチド等を標的とすることが有効である。

10) PD-1 陽性 NK 細胞は、肝障害に関連し、Tim-3 陽性 T 細胞は、HBV の持続感染に関連する可能性が示唆され、Tim-3 をターゲットとした治療戦略の可能性が示唆された。

- 11) HBV の複製抑制に PDC と NK の相互活性化作用が関与しており、IDO の誘導が重要である。
- 12) 6M グアニジン塩酸塩或いは 1%SDS による変性条件下での精製により、高収量、高純度の TP, RT を得ることが可能であり、NV10 存在下でのリフォールディングにより、活性の回復を確認することができる。
high-through-put 抗 HBV 剤スクリーニング系の開発が視野に入った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

各分担研究報告を参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

II. 分担研究報告

感染誘導/非誘導した肝癌細胞を用いた差分解析による感染受容体の 分離・同定

研究分担者 上田 啓次 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨：2012年にNTCPが HBV感染受容体として報告されたが、NTCPのHBV受容体としての活性には様々な報告がみられ、他にも受容体として機能する分子の存在が示唆されている。昨年度までに、ヒト肝癌由来培養細胞株、HepaRGをDMSOで感染誘導処理/未処理細胞を用いた蛋白レベルの差分解析、またHBV膜タンパクpreS1からHBs蛋白N末領域（preS1～SSN）と相互作用する因子として、HBV-RX1-1、HBV-RX1-2、HBV-RX2を同定し、このうち、HBV-RX1-1がNTCPと相互作用することを確認した。immuno-fluorescet assayの結果から、HBV-RX1-1は細胞質タンパクであり、細胞表面でHBV受容体として直接機能している可能性は少ないものと思われたが、HBV生活環の中での何らかの重要な機能的相互作用ではないかと考えている。今後ノックダウン細胞の作製などにより、この相互作用の意義を明らかにし、相互作用の破綻がHBV増殖に与える影響を解明する予定である。

A. 研究目的

HBV感染受容体はウイルスの発見から半世紀足らずに現在に至っても全く明らかにされていない。簡便な *in vitro*感染系が存在しないことが、その重要な理由であると思われるが、このことによりHBVのライフサイクルや病態発症機構の詳細は不明なままである。またHBVの特性に基づいた抗HBV剤の開発はされておらず、HBVの本質を理解した抗HBV剤の開発には、HBV感染受容体を分離・同定し、簡便な*in vitro*或は個体レベル（*in vivo*）での感染系を確立することが不可欠である。そして、感染系によるHBVの詳細な生活環や病態発症機構の解明を含めて、包括的な抗HBV剤の探

索・開発、本受容体を標的とした創薬の実現を目指す。

B. 研究方法

HBV感染受容体の分離・同定

- 1) HBV 側リガンド；PreS1～HBs N 端部をプローブにして相互作用因子を処理細胞から分離した。
- 2) 同定した蛋白の ORF をクローニングし、肝癌由来培養細胞株で発現させ、合成 preS1 (myristoyl-2-47) ペプチドとの結合性を検討した。
- 3) NTCP 発現ヒト肝癌由来培養細胞株で HBV の感染性を検討した。

(倫理面への配慮)

病原体安全管理、遺伝子組換え実験指針に従い遂行した。

C. 研究結果

- 1) 発現差分解析あるいはPreS1~HBs N端部の pull-down アッセイにより、HBV-RX1-1、HBV-RX1-2、HBV-RX2 を分離した。これらはすべて、ヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 で発現しているタンパクであり、発現局在は細胞質と考えられた。
- 2) HBV-RX1-1 と合成 preS1 (myristoyl-2-47) ペプチドとの相互作用が確認されたが、HBV-RX1-2、HBV-RX2 との相互作用は確認されなかった。
- 3) NTCP 発現ヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 は HBV 50~100 G. E. I. で感染を許容することが確認できた。

D. 考察

HBV-RX1 は HBV 生活環において、機能の一端を担っていると考えられたが、発現局在が細胞質であったことから、HBV の付着・侵入に直接機能している可能性は低いものと考えられた。

ヒト肝癌由来培養細胞株 HepG2 における NTCP 発現は HBV 感染に十分と思われたが、単独で機能しているかどうかは不明であり、HBV 感染受容体複合体としての解明は尚必要と考えられた。

E. 結論

培養肝癌細胞株には HBV 生活環で機能する宿主因子が発現しており、抗 HBV 剤の標的となり得る。

HBV 受容体複合体の全容の解明が更に必要である。

F. 健康危険情報

(総括研究報告書に記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Xin Zheng, Eriko Ohsaki, Keiji Ueda. "The Mechanism of Angiopoietin-1 Up-regulation in KSHV-infected PEL Cell Lines." *J. Virol. in press*
- (2) Keiji Ueda, Hiroko Omori. "Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity." *J. Liver 3 (5): e1000169, 2014.*
- (3) Keiji Ueda. "Change in Cellular Gene Expression by Hepatitis B virus (HBV)." pp21-231 in "Epidemiology I", iConcept Press Ltd., 2014
- (4) 上田啓次. 「感染」 プログレッシブ生命科学 (米田悦啓ら編)、pp234-249. 南山堂、2014.
- (5) 上田啓次. 「DNA ウイルス」病原微生物学 (荒川宜親ら編)、pp167-180. 東京化学同人、2014.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

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

HBV 受容体発現細胞株の樹立と感染初期過程を
標的にした抗ウイルス剤探索

研究分担者 森石 恆司
山梨大学大学院医学工学総合研究部 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス (HBV) の受容体分子として Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) が報告された。しかしながら、NTCP を高発現させてもすべての細胞株で感染率は高くない。今年度、Trypsin EDTA 処理による HBV 培養細胞感染法確立を目指し、抗 HBV 化合物探索を行った。NTCP を HepG2 に発現させたとき、細胞間接着面に多く発現していることから、細胞を Trypsin EDTA で浮遊させ、感染させると HBV 感染効率が上がることを前回報告した。今回、ミリストリル化した preS1 ペプチド (FAM ラベル) によって、感染抑制が見られたことから、浮遊細胞による感染でも preS1 依存に感染していることが示唆された。EDTA 単独と Trypsin EDTA 処理で比較しても感染効率に差が認められなかった。患者血清による感染でも同様な結果が認められた。また、コール酸取り込み阻害をもつジギタリス類化合物で抗 HBV 活性を検討すると、Proscillaridin A に非常に高い抗 HBV 活性が認められた (EC50 = 7.2 nM, SI 値 75.5)。また、preS1 の細胞接着を proscillaridin A は阻止しなかったことから、この抗 HBV 活性は preS1 が細胞に接着した後の過程を標的していることが示唆された。以上の結果から、我々が確立した感染培養細胞系は抗 HBV 剤スクリーニングに応用可能であることが分かった。これらの成果は、新規ワクチン開発や抗ウイルス剤開発に繋がると思われる。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) のキャリアは我国で140万人いるといわれている。その病原性発現機構や感染機構に不明な点が多く残されている。高率のよいウイルス培養法が確立されておらず、新規抗 HBV 療法の開発の障害となっている。特に感染初期の侵入機構の詳細はわかっていない。HBV のエンベロープ蛋白質は S, M, L の分子種があり、それぞれの C 末端領域は共通の S 蛋白質である。L 蛋白質のみに PreS1 領域があり、PreS1 領域が HBV 侵入に重要であることが知られている。PreS1 の N 末端は Myristoyl 化されており、それが標的細胞へのウイルス粒子の付着に重要であることがわかっている。Lipopeptide である preS1 の N 末端領域のペプチドは、Myrccludex-B は抗 HBV 剤として臨床試験されている。最近、HBV 受容体候補として、Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide (NTCP) が報告された (Yan et al. eLife, 2012, 1:e00049)。PreS1 領域 2-48 のア

ミノ酸残基を合成し、N 末端を Myristoyl 化し、それをプローブにして、NTCP 分子を単離している。NTCP 発現によって HBV/HDV 感染を許容することから、有力な受容体候補の一つとして考えられる。しかし、NTCP を高発現させても原著論文 (eLife, 2012, 1:e00049) で感染効率は 10% 前後と低く、その低感染率である理由はよく分かっていない。前回、NTCP 発現 HepG2 細胞を Trypsin EDTA 処理で浮遊させ、HBV を感染させると、感染効率が上昇することを報告した。今回、培養細胞による HBV 感染法を確立し、HBV 感染阻害剤のスクリーニングを試みた。

B. 研究方法

ヒト肝臓 cDNA ライブラリ (Clontech) から PCR によりヒト NTCP 遺伝子を増幅し、pcDNA3.1 に導入し、培養細胞にて発現した。NTCP 発現 HepG2 細胞は、Puromycin で選択し、高発現細胞をクローニングした。ミリストリル化した N 末端 2-48

残基で構成された preS1 ペプチドを合成し、FAM でラベルした。PreS1 ペプチドの発現細胞への付着能を FACS によって評価した。HBc 抗原測定は、市販 ELISA キットを用いた。また、HBV の DNA および RNA は Real time PCR によって定量した。感染時、細胞を Trypsin-EDTA 処理し、遠心洗浄した後、Yan et al. (eLife, 2012, 1:e00049) の方法で HBV を感染させた。

(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した。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山梨大学医学部倫理委員会規程に従って承認を得た。インフォームド Consent に係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存した。動物実験は、山梨大学動物実験規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。遺伝子組み換え実験は、山梨大学遺伝子組み換え実験安全管理規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。放射線及び放射性同位元素を扱う実験は、山梨大学総合分析実験センター放射線障害予防規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。

C. 研究結果

NTCP を HepG2 細胞に導入し、株化し、preS1 ペプチド結合によって高い結合を示す細胞株 HepG2A3 細胞を単離した。この細胞に対して、接着した状態および Trypsin EDTA 処理による浮遊した状態で感染させ、感染効率を比較すると、Trypsin EDTA 処理による浮遊細胞に対する感染効率が有意に高かった。また、EDTA 単独による浮遊細胞処理との感染効率における差が認められなかったことから、蛋白質分解活性は感染効率上昇に重要でないことが示唆された。また、患者血清による感染実験でも同様の結果が得られた。さらに、この感染培養細胞系を用いて、抗 HBV 剤スクリーニングを行った。既報で、コール酸取り込み阻害活性と抗 HBV 活性が一致するとの報告があったことから、コール酸取り込み阻害をもつジグタリス類の抗 HBV 活性を検討した。試験した化合物のうち、Proscillaridin A が非常に高い抗 HBV 活性を示した (EC50 = 7.2 nM、SI 値 75.5)。ところが Proscillaridin A 処理は preS1 ペプチド結合活性を阻害しなかったことから、Proscillaridin A の抗 HBV 感染阻害活性の作用点は preS1 が細胞表面

に接着した後の過程であることが示唆された。

D. 考察

本研究により、高率に HBV 培養細胞系が確立され、新規ワクチン開発および抗ウイルス剤スクリーニング方法の応用へつながり、新規 B 型肝炎療法の開発に期待される。EDTA のみの剥離と比較すると、Trypsin のプロテアーゼ活性はむしろ重要ではなく、細胞を一端浮遊させて感染させることが高感染率を維持することに重要と思われた。しかしながら、HepG2 は細胞接着が強く、Trypsin 処理する必要があり、Trypsin EDTA 処理が細胞感染に有効であると思われた。NTCP の細胞局在が HBV 感染に重要であるか、もしくは、細胞を剥離することで何らかの細胞内にシグナルが入る事が感染に重要なのか明確ではない。今後、その作用機序を解明することでより感染効率のよい培養系確立を目指す。化合物スクリーニングを今後も行い、より有効な抗 HBV 剤候補の同定を目指す。

E. 結論

本研究結果から、感染時に感染許容細胞を Trypsin-EDTA 処理することによって NTCP 依存の感染の効率が上昇することがわかり、この手法によって抗 HBV 剤スクリーニングが可能であることが示唆された。今後、この培養系を使い新規 HBV 開発を目指す。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

- ① 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 hepacivirus. *J. Virol.*, 88: 13352-13366, 2014
- ② Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tani H, Roy SR, Tanaka J, Tsubuki M, Akimitsu N: PBDE: Structure-Activity Studies for the Inhibition of Hepatitis C Virus NS3 Helicase. *Molecules*, 19: 4006-4020, 2014

- ③ Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Maeda K, Nakata H, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Shimada S, Mitsuya H: EFdA, a Reverse Transcriptase Inhibitor, Potently Blocks HIV-1 Ex Vivo Infection of Langerhans Cells within Epithelium. *J. Invest. Dermatol.*, 134: 1158-1161, 2014
- ④ Furuta A, Salam KA, Hermawan I, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Peng PW, Suzuki Y, Yamamoto N, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N: Identification and biochemical characterization of halisulfate 3 and suvanine as novel inhibitors of hepatitis C virus NS3 helicase from a marine sponge. *Mar. Drugs*, 12: 462-476, 2014
- ⑤ Allen SJ, Mott KR, Matsuura Y, Moriishi K, Kousoulas KG, Ghiasi H: Binding of HSV-1 Glycoprotein K (gK) to Signal Peptide Peptidase (SPP) Is Required for Virus Infectivity. *PLOS one*, 9: e85360, 2014
2. 学会発表
- ① Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, and Moriishi K, Infection of equine hepacivirus in a closed colony of Japanese native horse, The 21st International meeting on Hepatitis C virus and related viruses. 2014.9.7-11, Banff, Canada.
- ② Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, and Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, 2014, 9. 3- 6. Los Angeles, USA.
- ③ 山下篤哉、藤本雄介、田中智久、葛西宏威、児玉栄一、渡士幸一、脇田隆字、前川伸哉、榎本信幸、田中 淳一、森石恆司、海洋生物抽出物ライブラリーソースからのB型肝炎ウイルス転写活性抑制化合物の探索、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜
- ④ 安本順、葛西宏威、土橋香織、渡士幸一、脇田隆字、田中智久、山下篤哉、森石恆司、HBV感染による細胞内脂肪滴形成への影響、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜
- ⑤ 田中智久、陳文家、乙黒光姫、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本在来馬におけるウマヘパシウイルス感染第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜
- ⑥ 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10日～12日、横浜
- ⑦ 天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、坂本直哉、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司 Tyrphostin 類縁化合物のC型肝炎ウイルス複製阻害活性の検討、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10日～12日、横浜
- ⑧ Moriishi K, Establishment of a novel cell line with high susceptibility to NTCP-dependent HBV infection, The 2nd Japan-Italy Liver Workshop: "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: Molecular Basis and Clinical Links" 2014.11.18-19. Hiroshima
- H. 知的所有権の出願・登録状況特になし。

発現・精製したHBV膜蛋白をプローブとした相互作用因子の
網羅的分離によるHBV感染受容体の分離・同定

研究分担者 黒田 俊一

名古屋大学大学院生命農学研究科 教授

研究要旨：これまでに出芽酵母由来HBV表面抗原L粒子（バイオナノカプセル（BNC））が、ヒト肝臓由来細胞株数種（含 初代培養細胞）において、HBVと同様の経路かつ同等の効率で、低親和性（ヘパラン硫酸依存的）受容体と結合し、Pre-S1特異的な高親和性受容体（NTCP（Sodium taurocholate cotransporting polypeptide））が唯一のHBV高親和性受容体ではない）に移行し、エンドサイトーシスにより細胞内侵入する事を明らかにした。この「2段階HBV受容体説」に関しては、現在までのところ他の研究者たちの成果と矛盾は生じていない。今年度は、出芽酵母により作製したBNCには、HBVの感染性に必須とされているLタンパク質N末端側のミリストイル（Myr）残基が存在しないが、HBVのHepG2-NTCPに対する感染をBNCはPre-S1ペプチド（Myr47；NTCPアンタゴニスト）と同レベルの濃度で抑制することを明らかにした。また、BNCとヒト肝臓由来細胞との相互作用はNTCP「非」依存的であり、BNCのMyr化並びに脱糖鎖により増強することが判明した。これらの結果は、HBV感染機構にはNTCP以外のHBV受容体が存在することを強く示唆している。さらに、BNCを用いてヒト肝臓細胞内でのHBV脱殻過程（細胞質内移行）の解析を行い、エンドソーム内でHBVエンベロープとエンドソーム膜が同時に破壊されることを示した。現在、我々が開発した全自動1細胞解析単離装置を使用して、ヒト肝臓由来cDNAライブラリを発現する非ヒト肝臓細胞から、BNC結合タンパク質11種類（重複可能性有）を単離している。

A. 研究目的

HBVは、全世界で2~3億人が感染していると言われ、日本国内でも150万人もの感染患者が存在していると推定されている。HBVへの感染は、慢性肝炎や肝硬変、更には肝臓癌へとつながるため、その感染の予防や治療は大変重要な課題である。しかしながら、HBVの感染機構には未だ不明な点が多く、ヒト肝細胞上のHBV受容体でさえ、数十年間研究されてきているにも関わらず、確定的な報告はなされていない。こうした背景から、HBVの感染機構に基づく有効な治療法は未だ開発されておらず、HBVの予防や治療法の確立のためにも、受容体の同定と、それに続く感染機構の詳細な解析は必要不可欠である。

我々はHBVの感染に必須である同外皮Lタンパク質から構成されるサブウイルス粒子バイオナノカプセル（BNC）を、出芽酵母を用いて大量（mg単位）に調製する技術を有している。従来のHBVビリオンを用いた研究では、ビリオン自体の大量調製が困難である事やHBVの効率的な感染系が無い事がネックとなっていたが、BNCをHBVのモデルと

する事で、従来の研究とは一線を画する実験系の構築が可能となり、HBV受容体の特定や、HBVの感染機構を詳細に解析する事も出来ると考えられる。

従って本研究では、BNCのHBVの感染モデルとしての有用性を検証するために、一昨年度は、BNCがHBVと同様の経路かつ同等の効率で、ヒト肝臓由来細胞株数種（含 初代培養細胞）において、低親和性HBV受容体と結合し、Pre-S1特異的な高親和

