

り個人情報を含むものは無い。また、遺伝子組換え実験の対象となるが、事前に大阪大学に組換え実験計画書を提出、承認を得ている。よって、倫理面での問題は無いと判断した。

C. 研究結果

○EndoM-N175Q を利用した糖鎖改変

まず、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）を行ったところ、タンパク質電気泳動の結果から EndoH で糖鎖を加水分解した RNaseB に対して約 2 kDa（シアリルバイアンテナ型の分子量に相当）分子量の高い位置にタンパク質のバンドを得ることができた。同様に、供与体基質にオキサゾリン化シアリルバイアンテナ型糖鎖を用いても同様の結果が得られた。続いて、糖転移したと考えられる分子量の増加した RNaseB について、EndoH（高マンノース型糖鎖を加水分解できるがシアリルバイアンテナ型糖鎖は基質とならない）およびグリコペプチダーゼ F（高マンノース型およびシアリルバイアンテナ型糖鎖の両方を加水分解できる）処理を行った。この結果、糖鎖変換後の RNaseB について、タンパク質電気泳動パターンを確認すると EndoH 処理によってバンドのシフトが起きないが、グリコペプチダーゼ F 処理によって分子量が約 2 kDa 低下し、糖鎖を持たない RNaseB と同等の分子量を示した。また、課題「糖鎖プロファイルの作成」で行った糖鎖構造解析法を用いて RNaseB へのシアリルバイアンテナ型糖鎖転移を確認したところ、HPLC 上で

標準シアリルバイアンテナ型糖鎖と溶出時間が一致した。なお、今回の糖鎖変換実験系では、EndoM-N175Q による糖転移効率は供与基質：受容体基質=3000：1 の場合で最大の約 20%となった。

次に、上記によって得られた糖鎖変換条件を BNC に適用した。この結果、タンパク質電気泳動上で RNaseB と同様のバンドのシフトが確認できた。ただし、糖転移効率については約 10%程度となった。

○昆虫細胞を利用した HBV 様粒子の作成

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、ウイルス様粒子さらには L タンパク質についても培養液中への分泌は認められなかった。宿主昆虫培養細胞内でのタンパク質の生産は、遺伝子導入後に無血清条件下で 5 日培養することで十分に得ることができた。

○糖鎖プロファイルの作成

Huh6 細胞、HBV ゲノム遺伝子を保持する HB611 細胞の膜タンパク質由来糖鎖について構造解析を行った。Huh6 膜糖タンパク質からは、GlcNAc、Man、Gal、Sia、グルコース (Glu) およびフコース (Fuc) から成る以下の糖鎖 $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ (71.6%)、 $\text{GluMan}_9\text{GlcNAc}_2$ (1.6%)、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (1.6%)、 $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ (1.9%)、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (11.6%)、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (3.5%)、 $\text{Gal}_3\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (1.6%)、

SiaGalGlcNAcMan₄GlcNAc₂ (1.3%) が得られた。マンノース残基 5~9 個から成る高マンノース型糖鎖は全体の 71.6%を占め、フコース結合型糖鎖は検出されなかった。これに対し、HB611 の膜タンパク質糖鎖構造は Man₅₋₉GlcNAc₂ (63.1%)、GalGlcNAcMan₃GlcNAc₂ (1.1%)、GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ (1.4%)、Man₃FucGlcNAc₂ (2.7%)、GalGlcNAcMan₃FucGlcNAc₂ (0.9%)、GalGlcNAcMan₄FucGlcNAc₂ (4.6%)、GalGlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (2.9%)、Gal₂GlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (18.8%)、SiaGal₂GlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (1.8%) となった。高マンノース型糖鎖は全体の 63.1%であったのに対し、フコースの付加した糖鎖は 31.7%と Huh6 細胞とは大きく異なる糖鎖分布を示した。昨年度得られた Huh6、HB611 細胞の全可溶性タンパク質由来の糖鎖分布結果と比較しても顕著な差は見られなかった。

一方、フコース転移酵素をノックダウンした HB611 細胞およびノックダウン (ネガティブ) コントロール細胞より全可溶性タンパク質を調製し、その糖鎖構造分布を解析した。フコースノックダウン細胞では、Man₅₋₉GlcNAc₂ (52.6%)、Man₁₋₄GlcNAc₂ (0.2%)、GluMan₉GlcNAc₂ (1.5%)、GlcNAc_nMan₃GlcNAc₂ (3.1%)、GalGlcNAcMan₃₋₅GlcNAc₂ (1.3%)、GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ (3.9%)、Gal₃GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ (0.7%)、SiaGalGlcNAc₂Man_nGlcNAc₂ (0.4%)、SiaGal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ (4.3%)、Man_nFucGlcNAc₂ (4.9%)、

GlcNAc_nMan₃FucGlcNAc₂ (5.2%)、GalGlcNAcMan_nFucGlcNAc₂ (1.5%)、GalGlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (0.3%)、Gal₂GlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (1.7%)、Gal₂GlcNAc₂Man₃Fuc₂GlcNAc₂ (1.0%)、Gal₃GlcNAc₃Man₃FucGlcNAc₂ (1.8%)、SiaGalGlcNAcMan_nFucGlcNAc₂ (1.4%)、SiaGalGlcNAc₂Man_nFucGlcNAc₂ (0.5%)、SiaGal₂GlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (0.3%) という分布を示し、フコース結合型糖鎖は全体の 17.2%を占めた。また、コントロール細胞由来の糖鎖構造分布は、Man₅₋₉GlcNAc₂ (39.4%)、Man₁₋₄GlcNAc₂ (2.6%)、GluMan₉GlcNAc₂ (0.9%)、GlcNAc_nMan₃GlcNAc₂ (0.5%)、GalGlcNAcMan₃₋₅GlcNAc₂ (1.9%)、GalGlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ (1.2%)、Gal₃GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ (2.2%)、Gal₂GlcNAc₃Man₃GlcNAc₂ (0.6%)、SiaGal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ (0.6%)、Man_nFucGlcNAc₂ (2.0%)、GlcNAc_nMan₃FucGlcNAc₂ (6.5%)、GalGlcNAcMan_nFucGlcNAc₂ (0.9%)、Gal₂GlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (19.7%)、Gal₂GlcNAc₂Man₃Fuc₂GlcNAc₂ (1.5%)、Gal₃GlcNAc₃Man₃FucGlcNAc₂ (6.1%)、Gal₄GlcNAc₄Man₃FucGlcNAc₂ (1.0%)、SiaGalGlcNAc₂Man_nFucGlcNAc₂ (1.0%)、SiaGal₂GlcNAc₂Man₃FucGlcNAc₂ (1.8%)、SiaGal₃GlcNAc₃Man₃FucGlcNAc₂ (3.1%) であった。フコース結合型糖鎖は全体の 43.6%を占めており、HB611 由来可溶性タンパク質糖鎖に含まれるフコース結合型糖鎖の割合 38.8%と大きな差は見られなかった。

D. 考察

糖鎖改変を経由した HBV 様粒子の感染には 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。本年度は、BNC およびモデルタンパク質 RNaseB を利用して、高マンノース型から哺乳動物に見られるシアリルバイアンテナ型糖鎖への改変に成功した。ただし、シアリルバイアンテナ型糖鎖を EndoM-N175Q を利用して転移する段階の効率が 20%程度と低い状況である。さらに、現段階の効率でも大過剰の供与体基質が必要であることから、より安価かつ高効率の糖鎖改変系の確立が求められる。現状で、供与体基質にシアリルグリコペプチドおよびオキサゾ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ゾリン化糖転移効率が良いことが分かった。

昆虫培養細胞-バキュロウイルス発現系を利用した HBV 様粒子の生産は、L タンパク質の培養液中への分泌が見られなかったことから現在構築しているベクターでは問題があると考えられた。他研究者の報文では L、S タンパク質に加え C タンパク質を同時に発現することでウイルス様粒子の形成が起きることが報告されていたが、昆虫培養細胞系では適用できないことが示唆された。

上述したように、ウイルスは宿主細胞膜タンパク質と相互作用すると考えられることから、HBV ゲノム遺伝子を保持する HB611 細胞と野生型 Huh6 細胞由来の膜タ

ンパク質糖鎖構造を解析した。昨年度解析した両細胞の可溶性全タンパク質糖鎖構造分布（フコース結合型糖鎖に関して、各々 HB611 : 38.8%、Huh6 : 0%）と比較して、フコース結合型糖鎖の割合が大きく変わらないことから、HBV 感染によって宿主細胞の糖タンパク質糖鎖にフコース結合が顕著に現れることは確実であると考えられる。また、当該フコース結合型糖鎖を生合成するフコース転移酵素の遺伝子をノックダウンした HB611 細胞の糖鎖構造を解析した。他研究分担者グループの実験データから、この細胞では HBV 感染力が低下することが示唆されている。実際の糖鎖構造解析結果においても、ノックダウンコントロール細胞の解析結果と比較してフコース結合型糖鎖の分布が 43.6%から 17.2%へと著しく減少していたことから、HBV 感染効率にフコース結合型糖鎖が貢献していると考えられる。

E. 結論

次年度では EndoM-N175Q による供与体糖鎖の転移効率を確実に上げることが必要であるが、タンパク質の *in vitro* 糖鎖改変システムの構築については目処が立った。現状の実験系で得られた糖鎖改変 BNC を用いて標的宿主細胞への取込み実験を随時開始する。一方で、現在はシアリルバイアンテナ型糖鎖 1 種を供与体基質として用いているため、他構造の糖鎖を持つ基質の調製とそれを利用した糖鎖改変を進める。

また、本年度の HB611 細胞およびフコース転移酵素ノックダウン HB611 細胞の糖鎖プロファイルから、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と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

G. 知的所有権の出願・取得状況

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

HBV感染による病態発症機構の解析

研究分担者 竹原 徹郎

大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学 教授

研究要旨：B型肝炎の病態形成における各種免疫細胞と免疫抑制受容体であるPD-1 (Programmed death-1)およびTim-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule 3) の意義について明らかにすることを目的とした。HBV発現細胞株 (HepG2. 2. 15、HB611) ではその親株と比較し、PD-L1の発現が上昇しており、末梢血単核球とHB611との共培養にてNK細胞上のPD-1の発現は増加し、B型肝炎ウイルス感染細胞の存在でPD-1陽性T細胞が増加することが示唆された。さらに、健康成人14例、B型慢性肝炎患者23例より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、T細胞、NKT細胞のPD-1、Tim-3の発現頻度の解析を行った。B型慢性肝炎患者では健康成人と比較し、NK細胞の頻度は有意に低く、T細胞の頻度は有意に高かった。B型慢性肝炎患者において、PD-1発現NK細胞の頻度と血清ALT値とは正の相関を認めた。また、Tim-3の発現T細胞の頻度とHBV-DNA量に正の相関を認め、HBe抗原陽性例、HBs抗原高値例において有意にTim-3発現T細胞の頻度が高かった。PD-1陽性NK細胞は肝障害に関与し、Tim-3陽性T細胞はHBV持続感染に関与する可能性が考えられた。

共同研究者

巽 智秀 大阪大学消化器内科学、助教

大西良輝 大阪大学消化器内科学 大学院生

A. 研究目的

我国のB型肝炎ウイルス (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。HBVによる慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌などの病態の形成には宿主免疫応答が重要である。これまで、HBVに対するCTLや抗体産生などの獲得免疫やNK細胞などの自然免疫がB型

肝炎の病態形成に関与していることが明らかとなっている。

現在、B型肝炎患者に対してインターフェロン (IFN) による治療、エンテカビルなどの核酸アナログ製剤による治療が行われている。しかし、IFNの治療成績はセロコンバージョン率が30%程度にとどまっており、十分とは言えない。また、核酸アナログ製剤による治療は、HBV DNA複製を阻害することで、B型肝炎の制御を可能にしたが、肝内におけるcccDNAの残存があり、根治は難しい。HBVに対する免疫応答の活性

化はB型肝炎の根治、病態進展抑制、発癌抑制へとつながる可能性がある。

B型慢性肝疾患患者においては獲得免疫、自然免疫はともに抑制されており、HBV持続感染に関与している。近年、PD-1やCTLA-4、Tim-3、LAG-3といった免疫抑制受容体がサイトカイン産生や細胞傷害能といった免疫細胞機能の抑制に重要な役割を担っていることが知られている。悪性黒色腫や非小細胞性肺癌など種々の癌に対して、PD-1とそのリガンドであるPD-L1の結合を阻害する阻害抗体が有効であること示され臨床応用されつつある。B型慢性肝炎においては、これまで血清HBV-DNA量の多いHBe抗原陽性患者では、HBV特異的CD8陽性T細胞上のPD-1の発現が亢進していることや、CD4陽性T細胞上のPD-1の発現とHBV-DNA量に正の相関があることが明らかとなっている。また、B型慢性肝炎において、Tim-3陽性CD4陽性あるいはCD8陽性T細胞が増加しており、肝における炎症の程度と正の相関があることが示されている。NK細胞においても、B型慢性肝炎でTim-3発現が上昇していることが報告されているが、NK細胞のPD-1に関する報告はなく、その機能に関してもまだ明らかではない。NKT細胞の役割も未だ明らかではない。

本研究では、B型肝炎の病態形成における各種免疫細胞のPD-1およびTim-3の意義を明らかにし、新たな治療戦略の構築を目指すことを目的としている。

B. 研究方法

HBV発現細胞株であるHepG2. 2. 15、HB611とその親株であるHepG2、Huh6を用いてPD-

L1の発現頻度を、フローサイトメトリーを用いて検討した。また、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。

さらに、大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会承認のプロトコールを用いて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の発現解析を行い、臨床データとの関連を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究遂行にあたっては、事前に施設倫理委員会にて実験内容が承認され、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、採血し解析を行った。

C. 研究結果

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。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。

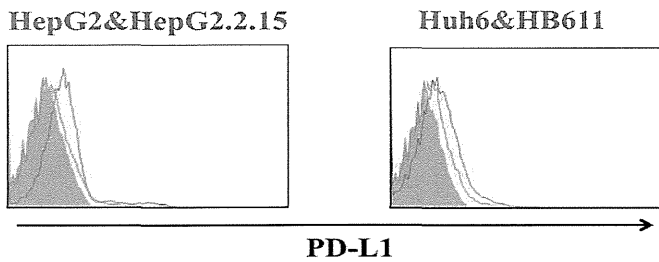


図 1. HBV 発現細胞株における PD-L1 発現

健康成人 14 例、B 型慢性肝炎患者 23 例を対象に末梢血中の NK 細胞、T 細胞、NKT 細胞の PD-1、Tim-3 発現頻度の解析を行った。

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。

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。

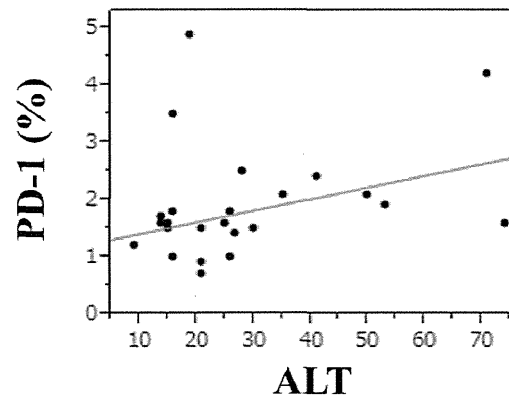


図 2. NK 細胞における PD-1 発現頻度と血清 ALT 値

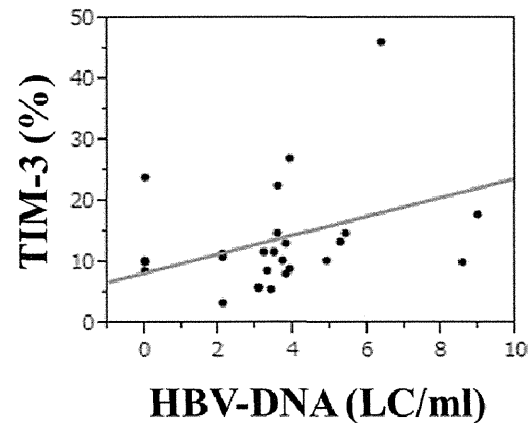


図 3. T 細胞における Tim-3 発現頻度と血清 HBV-DNA 量

D. 考察

HBV 発現細胞において PD-1 リガンドである PD-L1 の発現は増強しており、HBV 発現細胞と末梢血単核球の共培養において NK 細胞の PD-1 発現頻度が上昇することより、HBV 感染肝細胞存在下では PD-1 陽性 NK 細胞が増加する可能性があると考えられる。

健康成人・B 型慢性肝炎患者における検討では、NK 細胞、T 細胞、NKT 細胞いずれにおいても細胞頻度は PD-1 発現頻度と負の相関を認め、PD-1 発現が免疫細胞の増殖抑制やアポトーシスにより細胞数の調整

に關与している可能性がある。

本検討において、PD-1 発現 NK 細胞頻度と血清 ALT 値には正の相関を認めた。NK 細胞における PD-1 の機能については明らかとはなっていないが、ウイルス性肝炎において NK 細胞はウイルス排除に働くという報告だけではなく、肝細胞傷害に關連すること、また、細胞傷害性 T 細胞を傷害することでウイルス排除の抑制に働く可能性があることが知られている。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 細胞が關与している可能性が示唆される。PD-1 が NK 細胞においても免疫抑制に重要な働きをしているとすれば、抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体による PD-1 阻害は肝障害を助長する可能性があるかもしれない。

一方、HBe 抗原陽性例、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・持続感染に關与している可能性が示唆される。B 型慢性肝炎においても Tim-3 阻害抗体が有用な可能性が考えられる。

E. 結論

PD-1 陽性 NK 細胞は、肝障害に關連し、Tim-3 陽性 T 細胞は、HBV の持続感染に關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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada R, Hiramatsu N, Oze T, Morishita N, Harada N, Yakushijin T, Iio S, Doi Y, Yamada A, Kaneko A, Hagiwara H, Mita E, Oshita M, Itoh T, Fukui H, Hijioka T, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kasahara A, Hamasaki T, Hayashi N, Takehara T. Impact of alpha-fetoprotein on hepatocellular carcinoma development during entecavir treatment for chronic hepatitis B virus infection. J Gastroenterol (in press 2014)

2. 学会発表

1. 巽 智秀、大西良輝、西尾 啓、青野悟志、俵 誠一、板倉史晃、吉岡鉄平、向井香織、西尾公美子、疋田隼人、阪森亮太郎、宮城琢也、平松直樹、竹原徹郎
B型慢性肝炎患者における骨髓由来抑制性免疫細胞 (MDSC) の役割
JDDW2014 (第22回日本消化器關連学会週間、第18回肝臓学会大会) 兵庫県神戸市 10月23日 (23-26)日

G. 知的所有權の出願・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

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

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

研究要旨： Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) はトリプトファンをキヌレニンに代謝し、免疫抑制作用を発揮する。HBV複製肝癌細胞において、IDOはISGとして機能し、HBV複製を抑制することが報告されている。昨年度までの検討により、NK細胞、樹状細胞（DC）はHBV感染細胞を認識し、IDOの誘導を介してHBV複製を抑制することが示された。今年度は、DC-NK相互作用によるHBV複製抑制におけるIDOの特異性を確認することを目標とした。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。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。以上より、NK-pDC相互作用によるHBV複製抑制にはIDOが関与することが明らかになった。

A. 研究目的

樹状細胞（DC）はHBVのゲノム、蛋白などを感知し、I型、III型IFNを産生し、免疫系の活性化に関与する。またNK細胞はIFN- γ 産生を介してHBV感染細胞の障害やHBV複製抑制に関与する。肝臓における効率のよいISG誘導がHBV複製の抑制に重要であると考えられるが、その詳細は明らかでない。Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) はトリプトファンをキヌレニンに代謝し、免疫抑制作用を発揮する。IDOはIFN- γ で誘導される肝ISGの側面も持っており、HBV複製を抑制することが報告されている。今年度は、DC-NK相互作用によるHBV複製抑制におけ

るIDOの特異性を確認し、治療標的としての可能性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

HBV複製細胞として、1.4倍長のHBVゲノムをHuh7に遺伝子導入する系（HBV-Huh7）を用いた。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。HBV非感染健康成人のPBMCからソーティングによってDCサブセット（pDC、MDC、BDCA3DC）とNK細胞を採取した。HBV-Huh7を、ヒト末梢血から分離した

DC サブセットと NK 細胞と共培養し、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 複製抑制効果との関連性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は国立国際医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える

C. 研究結果

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。

D. 考察

本研究の培養細胞系は B 型急性肝炎時の感染肝細胞と免疫細胞の反応を模倣している。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

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Aoki, Y., Sugiyama, M., Murata, K., Yoshio, S., Kurosaki, M., Hashimoto, S., Yatsushashi, H., Nomura, H., Jong-Hon, K., Takeda, T., Naito, S., Kimura, T., Yamagiwa, Y., Korenaga, M., Imamura, M., Masaki, N., Izumi, N., Kage, M., Mizokami, M., and Kanto, T. Association of serum IFN- λ 3 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2014 (in press)

2. 学会発表

1) Yoshio S, Kanto T, Shouji H, Mano Y, Sugiyama M, Mizokami M. Human BDCA3+ dendritic cells enhance NK cell-mediated non-cytopathic inhibition of HBV replication. (Distinguished poster presentation) **The 11th JSH Single Topic Conference, Hepatitis B-recent progress in Basic and Clinical research**, Hiroshima, Japan, 2014

2) Kanto T, Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M. Natural killer cells as immunological sentinels against HBV infection. **The 2nd Japan-Italy Liver workshop, Hepatitis, setatosis and hepatocellular carcinoma: molecular basis and clinical links.** Hiroshima, Japan, 2014.

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

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服実用化研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 吉山 裕規
国立大学法人島根大学医学部 教授

研究要旨：HBV 感染に感受性の NTCP 過剰発現 HepG2 細胞を用いて、HBV を感染させた場合と感染させない場合の miRNA 発現変化を比較した。次世代シーケンスを行いいくつかの miRNA を同定した。

A. 研究目的

HBV の感染に重要な機能タンパク質を明らかにし、B 型肝炎の治療創薬を行う。

B. 研究方法

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。

（倫理面への配慮）

本分担研究では特に必要としない。

C. 研究結果

HBV 感染受容体のひとつである NTCP を過剰発現させた HepG2 細胞に HBV を感染させ、非感染細胞と比較した miRNA および RNA の発現変化を、次世代シーケンスを用いて解析した。そのデータをバイオフィーマティクスにて解析している。

D. 考察

miRNA とその標的遺伝子の解析に加えて、ノンコーディング遺伝子を含む新規遺伝子の同定と RNA 変異の解析も行っている。この解析を行うことで、ウイルス感染直後のウイルス遺伝子発現に伴う宿主遺伝子発現変化が明らかとなり、受容体など感染成立に関わる遺伝子と、その miRNA による制御機構が明らかとなると考えられる。

E. 結論

HBV 感染細胞と非感染細胞で発現する RNA の次世代シーケンスを行い、バイオフィーマティクス解析を開始した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

J Virol 89(5):2684-2697, 2015.

Cancers 6(4):2259-2274, 2014.

Biol Pharm Bull 37(4):688-693, 2014.

J Infect Chemother 20(3):169-174, 2014.

Cancer Sci 105(2):211-218, 2014.

2. 学会発表

日本ウイルス学会 2014 年 11 月 10-12 日

日本癌学会 2014 年 9 月 25-27 日

Frontiers in Cancer Science 2014,

Singapore, 2014. Nov 3-5

39th Annual International Herpesvirus

Workshop, Kobe, 2014. July 19-23

16th International EBV meeting,

Brisbane, 2014. July 16-19

H. 知的財産権の出願・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

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

研究分担者 大崎恵理子

大阪大学大学院医学系研究科 ウイルス学 助教

研究要旨：HBVポリメラーゼを標的とする新規抗HBV薬の開発を目指し、ポリメラーゼの機能ドメインの発現・精製システムを構築するとともに精製タンパクを用いて*in vitro*ポリメラーゼ活性測定系を構築した。変性条件下での精製により、さらに高純度、高収量での精製が可能となった。さらに、活性回復のためのリフォールディング条件の検討を行なったところ、ポリメラーゼ活性の回復に成功した。今後新規薬剤のスクリーニングに向けてさらに高感度・安定なアッセイ条件を検討する必要があるものの、新規抗ポリメラーゼ剤の探索が可能な系を構築することができた。

A. 研究目的

HBV感染者に対する抗ウイルス治療においてはインターフェロンや抗ウイルス剤である核酸アナログの投与が行なわれるが、しばしば核酸アナログ耐性変異株の出現が起り、それによって急性肝炎などの重篤な症状を引き起こすことなどが問題とされており、ウイルスの完全排除のための新規抗ウイルス剤の開発が急務となっている。そこで、本研究課題ではポリメラーゼを標的にした新規抗ウイルス剤の開発を目的として、ポリメラーゼ活性を迅速・簡便に測定するアッセイ系を構築し、抗ポリメラーゼ活性を示す新規薬剤のスクリーニングへの活用を目指した。また、HBVポリメラーゼの立体構造は未だに解明されておらず、1992年に解明されたHIVのRTの結晶構造解析をもとにしたHBV RTの立体構造予測によって薬剤耐性ウイルスの解析などを行なっているのが現状である。薬剤耐性

に関わるアミノ酸変異は、その多くがRTドメイン内部で起こっており、すなわちヌクレオチドとの相互作用や活性中心であるYMDDループの安定性にこのような変異が関与していることが示唆されている。薬剤耐性変異メカニズムの解析やポリメラーゼ活性の作用機序の解明、さらには抗ポリメラーゼ薬剤の開発において立体構造から得られる情報は非常に有益なものとなる。したがって結晶構造解析を目指した高純度・高収量のタンパク精製法の検討と精製RTを用いた新規抗ポリメラーゼ薬剤スクリーニングのための活性測定系の構築を試みた。

B. 研究方法

これまでの研究により確立した大腸菌発現システムを用いて、HBVポリメラーゼの逆転写酵素ドメインであるRTドメイン、およびRNAプライミングに重要なTPド

メインの N 末端に Strep タグ, C 末端に His タグを付加した発現ベクターをそれぞれ作製し, Rosetta gami B (DE3) pLys 株へ導入, 発現させて変性条件下における精製を試みた。変性条件として, 6M グアニジン塩酸塩による方法と, 1% SDS による方法を用いた。ニッケルカラムを用いて目的タンパク質を精製した。得られた精製タンパク質 (TP, RT) が目的のものであるかどうかを確認するために, SDS ポリアクリルアミドゲルにて泳動し, ゲルからバンドを切り出し, 質量分析により確認した。また, 得られた精製分画を TP, RT それぞれ 2 mg 準備し, モノクローナル抗体作製のための抗原として使用した。さらに, RT についてはリフォールディング条件を検討し, その後ポリメラーゼ活性の有無を確認した。用いた活性測定系として, ストレプトアビジンコートした 96 ウェルプレートに, ビオチンでラベルした poly-A/oligo-dT を結合させ, 精製・リフォールディング後の RT および DIG 標識 dUTP を添加して 37°C, 2 時間反応後, 合成により取り込まれた DIG-dUTP を抗 DIG ペルオキシダーゼと反応させ, 基質による発色により活性を検出した。ポリメラーゼ活性の測定において poly-dA もしくは poly-rA を用いることにより DNA 依存性および RNA 依存性の活性を区別した。DNA 依存性活性のポジティブコントロールとして T4 ポリメラーゼ (Takara) を, RNA 依存性活性のコントロールとして Super Script II (Invitrogen) をそれぞれ用い, ネガティブコントロールとしてバッファー

のみ, および同様の方法で精製した His タグ SUMO を用いた。

(倫理面への配慮)

当研究機関の遺伝子組換え実験の倫理規定に従い, また「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) を遵守して行なう。

C. 研究結果

今回変性条件下での精製のため, 可溶性タグである GST や SUMO タグから Strep, His タグへと変更することにより, 以前と比較して分解産物が減少し, より高純度な精製が可能となった。1% SDS を用いた可溶化・精製法では 6M グアニジン塩酸塩の方法よりも収量が高く, 1ℓ の培養液から約 1mg 程度の精製タンパクを得ることが可能であり, 1 段階の精製ステップにより 80-90% 程度の純度を得ることができた。この精製産物 TP, RT それぞれを質量分析により確認したところ, 目的のタンパクであることが同定された。そこで, 現在得られた精製産物を抗原としてモノクローナル抗体作製を受託により行なっているところである。さらに, RT に関してはポリメラーゼ活性の回復を目的として, リフォールディング条件を検討したところ, 糖鎖ポリマーである NV10 (Novexin) を用いることでバッファー置換時におけるタンパク質の凝集抑制効果が見られると同時に, ポリメラーゼ活性の回復が確認された。ネガティブコントロールであるバッファーのみ, および His-SUMO では活性が認められないことか

らRT特異的な活性であることが示唆された。1% SDS法によって得られた精製RTは、リフォールディング前の精製分画中に陰イオン性界面活性剤である0.1%サルコシルが含まれており、そのままでは活性が検出されなかったが、NV10添加後透析によりサルコシルを除去することによって、低タンパク量(0.2 µg ~1.0 µg)で活性が検出された。DNA依存性活性については、1 µg RTは2ユニットのT4ポリメラーゼの50%程度の活性を示したが、5µg, 10µgではほぼ活性を示さず、また RNA依存的活性については0.2 µgで1 ユニットの Super Script IIの約50%の活性を示したが、0.5 µg, 1.0 µgとタンパク量を増加させると活性がやや低下したことから、量依存的な活性の増加は見られなかった。一方、グアニジン塩酸塩によって精製したRTはDNA依存的活性については1 µgのRTは2ユニットのT4ポリメラーゼの約3倍の活性を示し、RNA依存的活性は2 µgで6 ユニットのSuper Script IIの約50%の活性を示し、いずれもタンパク量と活性の強さに相関が見られ、量依存的活性を示した。

D. 考察

前年度の非変性条件下での精製に比べて純度・収量とも飛躍的な改善が見られ、今後の抗ポリメラーゼ薬剤のスクリーニングに向けて重要な成果を上げることができたと考える。結晶構造解析のためには更なる純度の向上が求められるため、引き続き精製条件の検討を行っているところである。現在、精製して得られた TP および RT ドメインを抗原としたモノクローナル抗体を

作製中であるが、良質な抗体を得ることが出来ればポリメラーゼの機能解析に有効であり、ポリメラーゼを標的とした薬剤開発に向けた基礎的知見が得られることが期待される。HBV ポリメラーゼはその難溶性の性質により非変性条件下での精製が困難であることが知られており、変性条件下での精製においては、ある程度の収量は得られるものの、その活性の回復は非常に困難であった。本研究においては、RT のポリメラーゼ活性を測定する上でタンパクのリフォールディング条件を検討したところ、変性剤の除去の過程において糖鎖ポリマーである NV10 の共存下でのバッファー置換により、凝集抑制が可能であることを見出した。さらに NV10 を用いたリフォールディング後の RT にポリメラーゼ活性が認められた点は本研究の重要な成果の一つと考えられる。しかしながら、本アッセイ系が RT 特異的な活性を示すことを確認するために、活性を失った変異 RT (YMDD 変異体など)を用いた活性の確認や、既知の RT インヒビターである核酸アナログの本アッセイ系における効果判定、および合成産物の確認をすることなどが今後の課題であると考えている。今回 1% SDS と 6M グアニジン塩酸塩による変性法を利用した精製を行なったが、ポリメラーゼ活性については 1%SDS の方法では低タンパク量で活性を認めたが、量依存的な活性の増加が認められなかった。この原因のひとつとして、タンパク量を増やすことにより、残存サルコシルの持ち込みによる活性低下の可能性が考えられた。グアニジン塩酸塩による精製の結果、量依存的なポリメラーゼ活

性増加が確認されたことから、活性測定系において有効であることが示唆された。本研究で確立したアッセイ系において、低ユニットのポジティブコントロールで十分な活性を検出できることから、高感度検出が可能であり、本アッセイ系を用いた新規抗ポリマーゼ薬剤のスクリーニングに有効であることが示唆された。

E. 結論

6M グアニジン塩酸塩あるいは 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 を得ることができた。精製 RT のリフォールディング条件を検討したところ、NV10 の添加により凝集を抑制し、活性の回復を確認することができた。本手法により精製した RT を用いて活性測定系の特異性の評価をした上で、新規薬剤のスクリーニングを開始する。

F. 研究発表

1.論文発表

1) 該当なし

2.学会発表

1) 該当なし

G.知的所有権の出願・取得状況

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

NTCP大量発現・精製と立体構造解明への試み

研究分担者 齊藤 伸一

大阪大学大学院医学系研究科 特任助教

研究要旨：HBV 受容体 NTCP の生化学的、構造学的基盤を構築することを目標とし、細菌類を用いた NTCP 蛋白の発現・精製を行い、低レベルではあるものの、NTCP 蛋白の発現を検出する事に成功した。

A. 研究目的

新規抗HBV感染阻害薬の創出のため、ヒト肝細胞におけるHBV受容体であるNTCPの菌体内での大量発現および精製、さらには立体構造の解明までを目指す。

B. 研究方法

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、ブレビバチルス菌を用いた発現系でもNTCP発現を試みた。

（倫理面への配慮）

本研究で用いるNTCPの遺伝子配列は株化された細胞に由来するものである為、人権擁護上の問題は発生しないと考えられる。その他の倫理的問題

も発生しないと考えられる。

C. 研究結果

プロリンおよびアルギニンのコドン頻度をブレビバチルス型配列に置換生産・分泌後に分解された可能性が考えられる。

D. 考察

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。

E. 結論

なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表	(予定を含む。)
1. 論文発表	1. 特許取得
なし	なし
2. 学会発表	2. 実用新案登録
なし	なし
H. 知的財産権の出願・登録状況	3. その他
無し	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ueda K.	Change in Cellular Gene Expression by Hepatitis B virus (HBV)		<i>Epidemiology I</i>	iConcept Press Ltd	Hong Kong	2014	219-231
良元伸男、黒田俊一	DDSナノキャリア・バイオナノカプセルによるバイオイメージング		ナノ・マイクロカプセル(粒子)の調製・評価・応用《検討例集》	株式会社 技術情報協会	東京	2014	第3章 ナノ・マイクロカプセルの応用例 第15節 診
Kuroda S.	Bio-nanocapsules: Nanocarriers Harboring Virus-Derived Transfection Machinery for Use as Pinpoint Drug Delivery Systems	Akira Tsuda & Peter Gehr	<i>Nanoparticles: Drug Inhalation Therapy Events at Air-Blood Tissue Barrier</i>	Francis & Taylor, publisher CRC	New York, USA	2014	235-246
Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T, Iizasa H.	MicroRNAs and oncogenic human viruses.	Sadegh Babashah	<i>MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis.</i>	Springer	New York	2014	155-182
三善 英知、鎌田 佳宏	肝癌の診断・治療におけるバイオマーカーの有用性	小俣政男、椎名秀一朗、坂本直哉、丸澤宏之	肝 疾 患 Review2014-2015	日本メディカルセンター		2014	45-50
三善 英知、鎌田 佳宏	Topics 肝癌の新しいバイオマーカー	金子周一、竹原徹郎、持田 智	HEPATOLOGY PRACTICE Vol.5 肝癌の診療を極める～基本から最前線まで～	文光堂		2014	46-53
Moriwaki K and Miyoshi, E	Lectin flow cytometry	Hirabayashi J	<i>Lectins Methods and Protocols</i>	Human Press		2014	
Miyoshi E and Kamada Y	Glycobiology: Biology and Medicine Hepatosteatosis and Primary Hepatoma			Springer		2015	