

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免疫医学講座ウイルス学 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
山梨大学医学部 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 吉山宏規
島根大学医学部 教授

研究分担者 斎藤伸一
大阪大学大学院医学系研究科 特任助教

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 大崎恵理子
大阪大学大学院医学系研究科 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・渡士先生から供与))、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。

斎藤

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、プレビ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リ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の導入による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による糖転移効率はい供与基質：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処理する必要があり、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。

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イ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リングにより，活性の回復を確認することができる。high-throughput 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