

## II . 分担研究報告

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）  
分担研究報告書

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。今後ロ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 Angiotensin-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GRESSIVE 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

分担研究者 森石恆司 山梨大学医学部 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に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、Myrcludex-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。インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、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ギタリス類の抗 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

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  
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

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

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

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

Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, and Moriishi K, Infection of equine hepatitis virus 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.

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.

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

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

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

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

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

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。

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

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

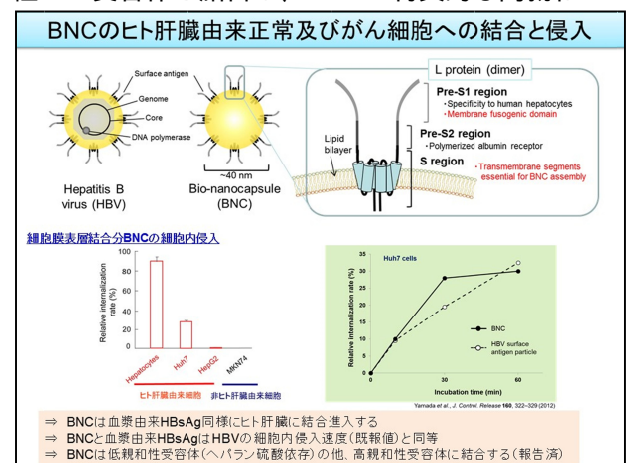
**研究要旨:** これまでに出芽酵母由来HBV表面抗原L粒子(バイオナノカプセル(BNC))が、ヒト肝臓由来細胞株数種(含 初代培養細胞)において、HBVと同様の経路かつ同等の効率で、低親和性(ヘパラン硫酸依存的)受容体と結合し、Pre-S1特異的な高親和性受容体(NTCP(Sodium taurocholate cotransporting polypeptide)が唯一のHBV高親和性受容体ではない)に移行し、エンドサイトーシスにより細胞内侵入する事を明らかにした。この「2段階HBV受容体説」に関しては、現在までのところ他の研究者たちの成果と矛盾は生じていない。今年度は、出芽酵母により作製した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(Myristoyl)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(Myristoyl; 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Myristoyl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エンベロッ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。

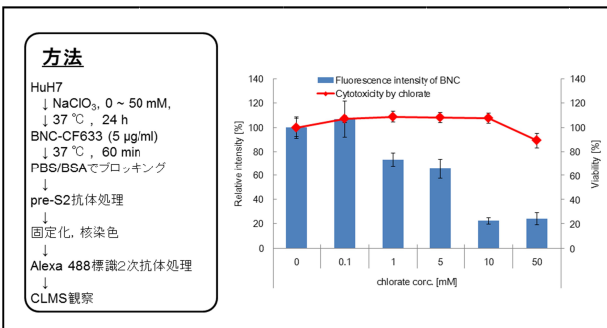
従って本研究では、BNCのHBVの感染モデルとしての有用性を検証するために、一昨年度は、BNCがHBVと同様の経路かつ同等の効率で、ヒト肝臓由来細胞株数種(含 初代培養細胞)において、低親和性HBV受容体と結合し、Pre-S1特異的な高親和



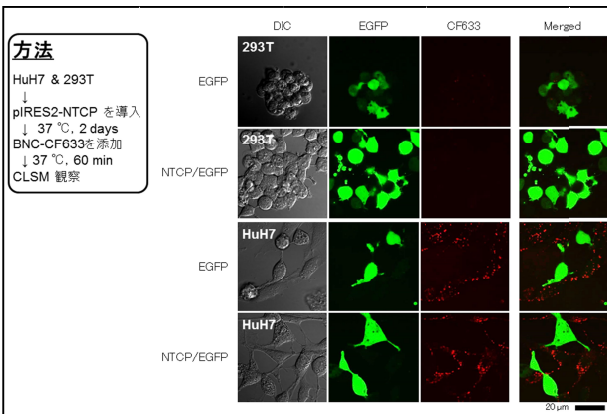
性HBV受容体に移行し(以降、「2段階HBV受容体説」と呼称)、エンドサイトーシスにより細胞内侵入する事を明らかにした(感染初期におけるBNCとHBVの類似性を証明)(図1)。昨年度は、低親和性HBV受容体の解析を生化学的に行うとともに(図2)、現在主流のNTCPだけが唯一の高親和性HBV受容体



ではなく、酸処理耐性の非 NTCP 高親和性 HBV 受容



体の存在を示した (図 3)。



今年度は、酵母由来 BNC には NTCP 相互作用に必要な Myr 残基が存在しないので、化学的に Myr 化 BNC を作成し、NTCP との相互作用を検討した。また、BNC 表層の糖鎖のヒト肝臓由来細胞への感染能に対する効果も検討した。さらに、患者由来 HBV と HepG2-NTCP を用いる感染系における BNC による感染抑制効果を検討し、並びに全自動 1 細胞解析単離装置を用いてヒト肝細胞の高親和性 HBV 受容体のハイスループット機能スクリーニングを行った。

### B. 研究方法

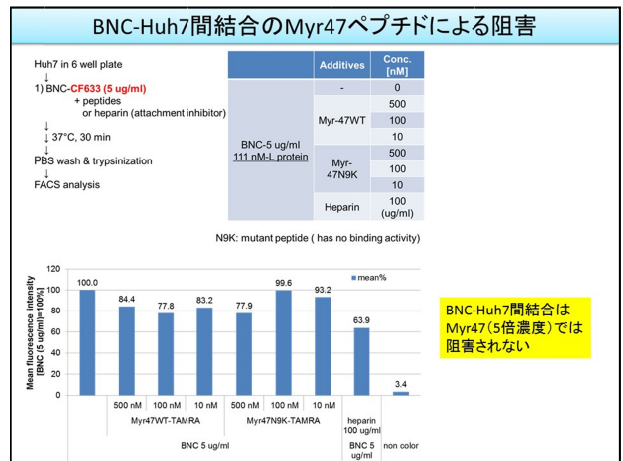
BNC のヒト肝臓細胞への感染機構を解析するために、各種蛍光標識した BNC を調製し、invitroにおいてヒト肝臓由来細胞 (Huh7 (低親和性 HBV 受容体を多量に発現; NTCP 発現は微量), HepG2 (低親和性 HBV 受容体を微量発現; NTCP 発現は極微量), HepG2-NTCP (感染研 脇田先生・渡士先生から供与)), 又は非ヒト肝臓由来細胞 (HEK293) への結合と侵入を共焦点顕微鏡や FACS により解析した。(倫理面への配慮)

本研究で行う組換え DNA 実験については、文部科学省研究開発 2 種省令に準じ、名古屋大学

院生命農学研究科へは、「タンパク質中空ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の開発 (部局承認番号: 農 09-018)」、「多様なウイルス外皮タンパク質から構成される中空ナノ粒子シリーズを用いる gene delivery system および drug delivery system に関する研究 (部局承認番号: 農 10-040)」、及び「中空ナノ粒子を用いる細胞への遺伝子及び薬剤導入の検討 (部局承認番号: 農 11-009)」として申請し、承認されている。なお、実験動物及びヒト由来試料は取り扱っていない。

### C. 研究結果

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 過剰発現に関係なく高い結合能を示す (図 3)。そこで、本結合に対する NTCP 関与の可能性を排除するため、



NTCP 特異的なリガンドである Myr47 ペプチド (HBV Pre-S1 領域 47 残基の N 末端に Myr 残基を付加した合成ペプチド) を添加したが、本結合を阻害しなかったことから、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 (図 4)。

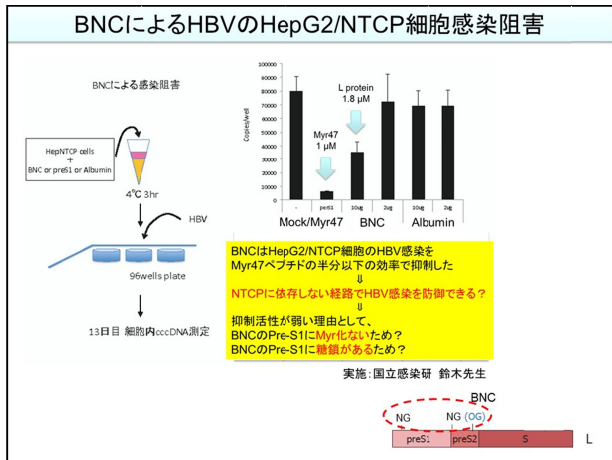
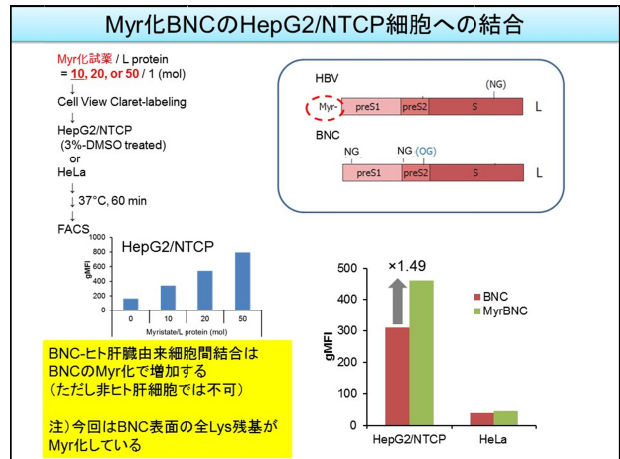
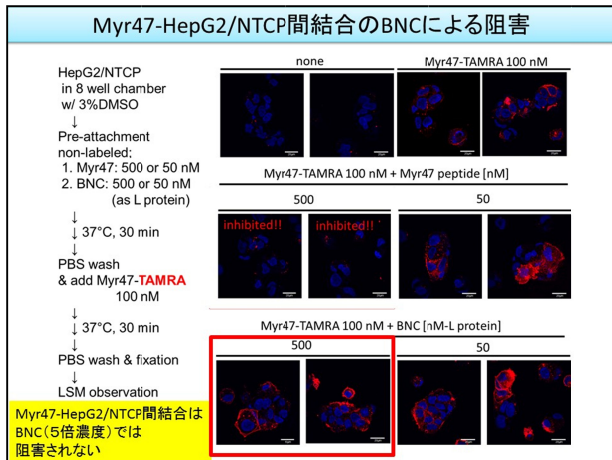
### HepG2-NTCP 細胞と Myr47 の結合に対する BNC の効果:

HepG2-NTCP 細胞に TAMRA 蛍光標識 Myr47 を結合させる条件に、BNC を添加した。Myr47 ペプチドの 5 倍量の BNC (Pre-S1 領域換算) が共存しても、Myr47 の結合には全く影響はなかった (図 5)。この結果からも、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。

### HepG2-NTCP 細胞に対する患者由来 HBV 感染に対する BNC の効果:

BNC は HBV 同等の効率でヒト肝臓由来細胞に感染し、細胞内に進入することが示されているが、及

HBV・Pre-S1 領域の Gly-2 残基には Myr 残基が付加しており、HBV のヒト肝臓特異的感染及び NTCP との相互作用に必要であることが示されている。一方、出芽酵母で調製した BNC には同様な Myr 残基は付加されていない。そこで、遊離のアミノ残基と反応できる NHS-Myr を用いて化学的に BNC 表層に Myr 残基を付加し、HepG2-NTCP への結合を評価したところ、細胞結合量は 1.5 倍に増加し、Myr 基修飾量が増えるに従い、その結合量はさらに増加した(図7)。



一方、陰性対照細胞 (HeLa) への結合には影響はなかった。以上から、BNC の Myr 化を行うことで、HBV と同様な NTCP 依存的な結合を BNC に付与できると考えられた。しかし、今回の化学修飾は Pre-S1 のアミノ基末端側特異的ではないので、今後、同特異的な化学修飾法を開発する必要がある。

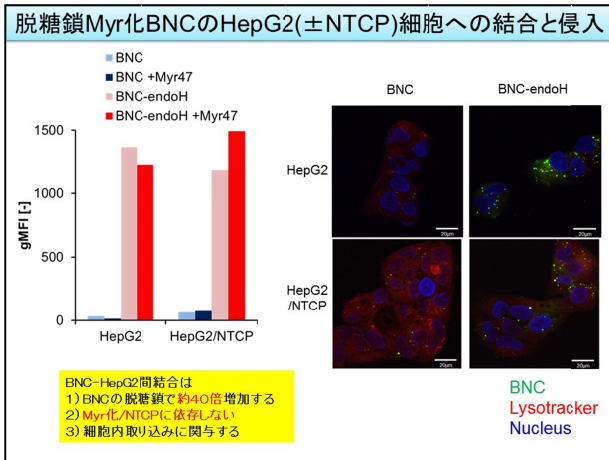
この結果から、BNC 感染機構に NTCP は関与していないことが明らかになった。そのため、BNC は果たして HBV 感染機構研究の代替となるか早急に決める必要が出てきた。そこで、感染研の脇田先生及び鈴木先生と共同で、患者由来 HBV の HepG2-NTCP に対する *in vitro* 感染モデルにおける BNC の添加効果を検討した。

#### 脱糖鎖 BNC の HepG2 に対する感染能:

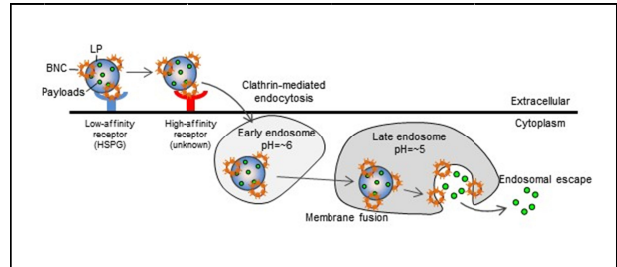
その結果、BNC は HBV 感染を抑制することが判明した。Myr47 の場合は 1 μM で 90% 以上抑制されたが、BNC の場合は Pre-S1 換算 1.6 μM で約 50% の抑制であった (図 6)。BNC はナノ粒子表層に Pre-S1 が整列提示されていることから、Myr47 ペプチド単体よりも抑制効果が高いと考えられたが、今回の結果は予想に反していた。そこで、BNC の Pre-S1 と HBV の Pre-S1 の間に構造的な差 (具体的には Myr 残基、糖鎖) が影響していると想定した。

酵母で調製した BNC において、Pre-S1 領域の N 末端側には N 結合型糖鎖、Pre-S2 領域の N 末端側には N 結合型糖鎖及び O 結合型糖鎖が付加しており、HBV とは大きく異なる。そこで、Endo H を用いて BNC から N 結合型糖鎖を除去して、その HepG2 及び HepG2-NTCP に対する感染能を検討した (図 8)。その結果、脱糖鎖 BNC は NTCP の発現に関係なく、HepG2 に対する感染能 (細胞内取り込み量 + 結合量で判断) が約 40 倍亢進した。この結果は驚くべきものであるが、糖鎖除去により BNC が凝集しやすくなっており、その為、巨大化 (100 nm 以下のサイズから数百 nm へ) が HepG2 細胞への感染能を押し上げた可能性は排除で排除できない。なお、Myr 化による相乗効果も同時に検討したが、現時点では断定的なことは言えない。今後は、脱糖鎖による BNC の粒子特性の変化を抑制し、Myr 化を N 末端特異的に行う必要がある。

#### Myr 化 BNC の HepG2-NTCP に対する感染能:



触し、自身並びにエンドソーム膜が同時に破壊され、その結果、BNC 及び BNC-LP (おそらく HBV も同様) 内部の物質を細胞質内に移行できると考えられた。これは、HBV の細胞質内侵入過程を解析する上で非



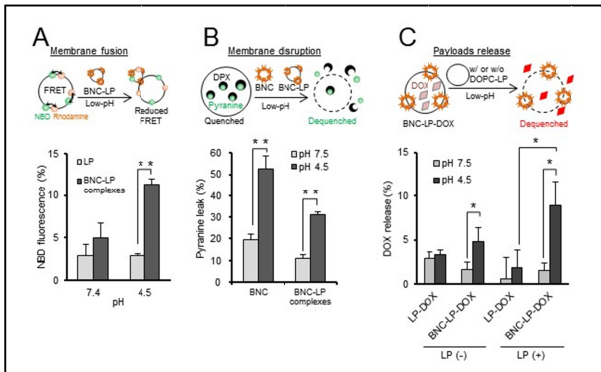
常に重要な知見である (図 10)。

**BNC を用いたヒト肝臓細胞内動態の解析：**

HBV がヒト肝臓細胞内に侵入した後、どのような機構でエンベロープを外して (脱殻)、細胞質内に移行するか不明な点が多かった。我々は、Pre-S1 領域の N 末端側 (論文投稿中) に酸性依存的膜透過ドメインを見出し、その膜透過活性が他の領域に位置する同ドメインよりも優位であることを示していたので、BNC 及び BNC 融合リポソーム (BNC-LP) を HBV にリポソーム (LP) を細胞膜と見立てて、酸

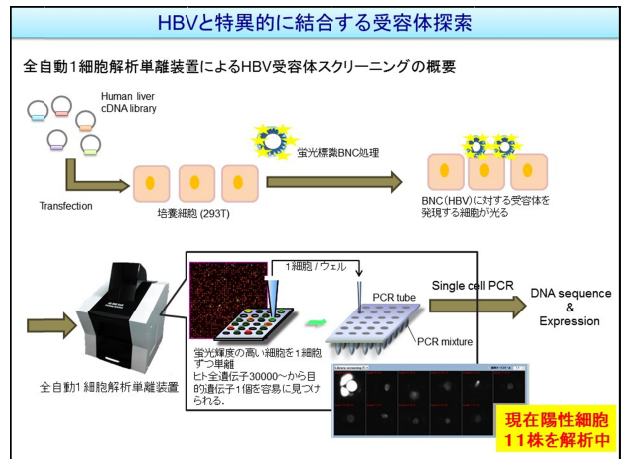
**全自動 1 細胞解析単離装置による HBV 受容体のクローニング：**

我々が開発し、製品化した全自動 1 細胞解析単離装置を用いて、HBV 受容体の単離を行った。本機は、ヒト肝臓由来 cDNA を発現する 293T 細胞等をセルアレイ化して、蛍光標識 BNC とコンタクトさせ、蛍光ラベルされた細胞を自動的に回収するものである。FACS などとは異なり、陽性細胞含有率が 0.01% 以下 (数万細胞中数個) でも確実に単離できるのが特長



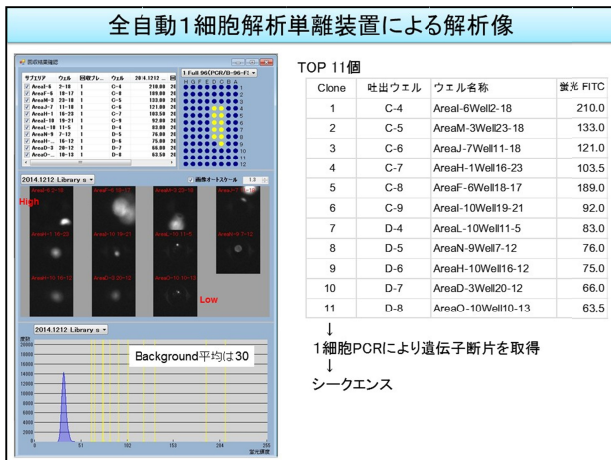
性条件下での動態を解析した。

まず、ローダミンと NBD の 2 種類の蛍光色素を FRET 状態で提示した LP に、BNC 及び BNC-LP を接触させたところ、酸性条件依存的に FRET が緩和されたことから (図 9 A) BNC 及び BNC-LP に膜融合能が存在することが判明した。次に、蛍光色素ピラニンと消光剤 DPX を包含した LP に、BNC 及び BNC-LP を接触させたところ、酸性条件依存的に内包物が放出され (図 9 B)、BNC 及び BNC-LP に外来 LP (エンドソーム膜と想定) を破壊する能力があることが判明した。最後に、蛍光を有する抗がん剤ドキソルビシン (DOX) を包含した BNC-LP に、未標識・未包含の LP (細胞と想定) を接触させたところ、酸性条件依存的に DOX が放出され (図 9 C) BNC-LP (おそらく BNC も) は外来 LP により破壊される能力があることが判明した。以上から、BNC 及び BNC-LP (おそらく HBV も同様) は、酸性条件下 (後期エンドソームまたはライソソーム) において、エンドソーム膜と接



である (図 11)。

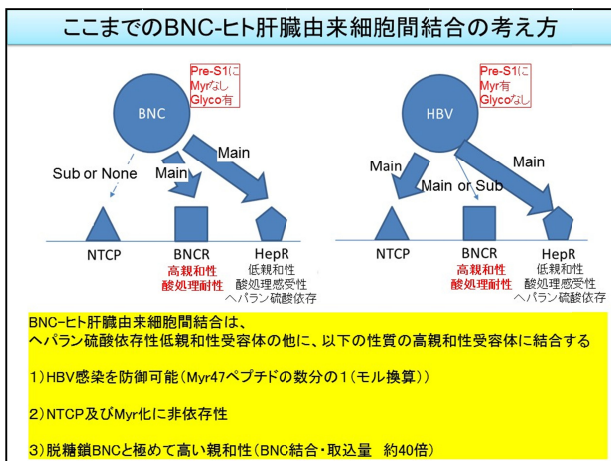
具体的には、約 50 万細胞の 293T 細胞に、ヒト肝臓由来 cDNA ライブラリ (pAP3-neo ベクター型) を 3  $\mu$ g を形質転換し、2 日間培養して得られた約 250 万細胞を蛍光標識 BNC (約 3  $\mu$ g) と混合し、37 度で 1 時間静置した後、FACS を用いて BNC 陽性細胞 (0.1%) を濃縮した。得られた 2433 個の細胞を、全自動 1 細胞解析単離装置にかけて、強い蛍光を発する BNC 陽性細胞 11 個を単離し、1 細胞 PCR を行った (図 12)。その結果、特許性確保の観点から公表できないが、主に肝臓に発現する糖鎖関連の膜タンパク質遺伝子が単離できた。その他にも、肝臓特異的に発現する膜タンパク質遺伝子が複数見出されている。現在、各遺伝子を非ヒト肝臓細胞に発現し、BNC 及び HBV



を用いて感染可能細胞として機能するか検討している。

#### D. 考察

今年度は、BNC をプローブとして用いることで NTCP 非依存的な HBV の感染機構の存在が確定的になった。最近、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することが判明した。そこで、他の研究者により進められている NTCP に関する研究成果も含めて、現時点では図 1 2 に示すようなモデルを考えている。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ことは明らかであり、何とか来年度には新規受容体の同定を行いたいと考えている。



現在、同 BNC プローブを駆使して以下の案件を進めている。 NTCP 非依存性 HBV 感染機構の全容解明、ヒト肝臓由来結合タンパク質の同定、HBV 感染防御能の検討 (脇田・鈴木先生、小嶋先生、上田先生とそれぞれ共同)、HBV 感染抑制化合物のスクリーニング (小嶋先生と共同) 及び BNC 表層・ヒト肝臓細胞表層の糖鎖と感染性の関係解明 (三善先生・三崎先生と共同) を行っている。

#### E. 結論

これまでのデータは「2段階 HBV 受容体説」を支持している。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。基本的に HBV は NTCP を優先的に利用するが、NTCP の発現が不足している場合は、他方の高親和性 HBV 受容体を利用する可能性がある (NTCP 発現パターンと HBV 感染が完全に一致しない事象を説明可能)。しかし、創薬の標的として、どちらの高親和性 HBV 受容体が有効かは不明である。いずれにせよ、BNC は NTCP 非依存の高親和性 HBV 受容体を単離できるユニークなプローブであるので、急ぎスクリーニングを完了する予定である。最後に、HBV が脱殻するのは後期エンドソーム内であり、HBV のエンベロープ構造及びエンドソーム膜を同時に破壊することにより、HBV 内部が細胞質に移行する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) A bio-nanocapsule containing envelope (E) protein domain III of Japanese encephalitis virus (JEV) protects mice against lethal JEV infection.

Miyata T, Tafuku S, Harakuni T, Tadano M, Yoshimoto N, Iijima M, Matsuo H, Kuroda S, and Arakawa T.

Microbiol. Immunol. 57(2013) 470-477.

2) Enhanced OH radical generation by dual-frequency ultrasound with TiO2 nanoparticles: Its application to targeted sonodynamic therapy.

Ninomiya K, Noda K, Ogino C, Kuroda S, and Shimizu N.

Ultrason Sonochem 21 (2014) 289-294.

3) High-throughput de novo screening of receptor agonists with an automated single-cell analysis and isolation system

Yoshimoto N, Tatematsu K, Iijima M, Niimi T, Maturana AD, Fujii I, Kondo A,

Tanizawa K, and Kuroda S.

Scientific Reports 4 (2014) 4242 (9 pages).

4) Oligomerization-induced conformational change in the C-terminal region of NELL1 is necessary for the efficient mediation of murine MC3T3-E1 cell adhesion and spreading

Nakamura Y, Hasebe A, Takahashi K, Iijima M, Yoshimoto N, Maturana AD, Ting K, Kuroda S, and Niimi T.

J. Biol. Chem. 289 (2014) 9781-9794.

5) Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates

protein expression of liver cancer susceptible gene MICA

Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, and Koike K.

Oncotarget 5 (2014) 5581-5590.

6) ウイルス表面抗原タンパク質提示によるリポソームへの標的化能, 細胞内侵入能, およびステルス能の付与

黒田俊一

膜 (2014), Vol. 39. 283-289

7) Single-cell-based breeding: Rational strategy for the establishment of cell lines from a single cell with the most favorable properties.

Yoshimoto N., and Kuroda, S.

J. Biosci. Bioeng. 117 (2014) 394-400.

8) 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jing

良元伸男、黒田俊一

ナノ・マイクロカプセル(状粒子)の調製・評価・応用 検討例集 (2014) 株式会社 技術情報協会

第3章 ナノ・マイクロカプセルの応用例 第15節 診断

9) A cisplatin-incorporated liposome that targets the epidermal growth factor receptor enhances radiotherapeutic efficacy without nephrotoxicity

Jung J, Jeong SY, Park SS, Shin SH, Ju EJ, Choi J, Park J, Lee JH, Kim I, Suh YA, Hwang JJ, Kuroda S, Lee JS, Song SY and Choi EK

Int J Oncology 46 (2014) 1268-1274

10) Chapter 15: Bio-nanocapsules: Nanocarriers Harboring Virus-Derived Transfection Machinery for Use as Pinpoint Drug Delivery Systems

Kuroda S. Nanoparticles: Drug Inhalation Therapy - Events at Air-Blood Tissue Barrier

Akira Tsuda & Peter Gehr, editors Francis & Taylor, publisher CRC (2014) pp.235-246

## 2.学会発表

該当なし

## G.知的所有権の出願・取得状況

(予定を含む。)

### 1.特許取得

1) センシング基板及びそれをういたリガンドの測定方法 発明者: 黒田俊一、飯嶋益巳 (出願人: 名古屋大学) 出願番号: 2014-064090 (平成 26 年 3 月 26 日)

2) 核酸を内封してなる中性又はアニオン性リポソーム及びその製造方法 発明者: 黒田俊一、曾宮正晴 (出願人: 名古屋大学) 出願番号: 2014-170680 (平成 26 年 8 月 25 日)

3) リポソーム複合体、その製造方法、及びその使用 発明者: 黒田俊一、太江田綾子 (出願人: 名古屋大学) 特願 2010-214303 に関して日本国特許成立 (平成 27 年 2 月 2 日)

### 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

### 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、金沢大学がん進展制御研究所、准教授

**研究要旨** : HBV 感染に関わるウイルスレセプター等の宿主分子の探索・HBV 創薬研究に適したシステムを構築するため、HBV の感染成立を迅速・簡便に検出できるようマーカー遺伝子を組み込んだ組換え HBV ベクター系の更なる改良を行った。また、iPS 細胞より分化誘導した肝細胞では組換え HBV の感染が認められ in vitro 感染系として有用であることがわかったので、各種ヒト正常細胞から iPS 細胞株を多数樹立し、本研究に有用な効率の良い HBV in vitro 感染系の確立を試みている。

### A. 研究目的

本研究の目的は HBV 初期感染に関わるウイルスレセプターを含む宿主分子群の同定およびこれら分子と HBV の interaction を阻害する化合物の探索・創薬を通じて HBV の感染・増殖を阻止する方策を得ることにある。この目的のため昨年度に続き、HBV の感染成立を迅速・簡便に検出できるよう、マーカー遺伝子を組み込み自立的な増殖能を欠損した組換え HBV ベクターを構築するとともに HBV in vitro 感染系に利用可能な細胞系を探索することとした。

### B. 研究方法

#### 組換え HBV ベクターの構築

HBV は genotype A を用いた。HBV 発現ベクターは CMV IE プロモーターより HBV pregenomic RNA を合成する pCSH4 プラスミドを用いた。HBV ベクターでは、3.2kb の HBV ゲノムサイズが変化することのないよう GeneArt (ライフテクノロジーズ) を使ってマーカー遺伝子 (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 遺伝子およびその近傍の部位へ塩基数を合わせて置換した。感染成立の検出感度を高めるためマーカー遺伝子の発現プロモーターを HBV S 遺伝子プロモーターから CMV IE プロモーターに置き換えたものも作製した。

#### 組換え HBV パッケージング細胞の作製

細胞内での HBV ゲノム間の相同組換えによる野生型 HBV の出現の可能性をより低く

抑えるため、HBV 複製ドメイン及び polyA シグナルを欠いた HBV core、polymerase、X 遺伝子発現用と HBV envelope 遺伝子発現用のコンストラクトをそれぞれレトロウイルスベクターを介して HepG2 細胞や HEK293 細胞の他、新たに B 型肝炎ウイルス研究によく用いられるニワトリ肝癌由来 LMH 細胞に導入し HBV パッケージング細胞を樹立した。更に preS2 および S 蛋白質の発現量を増強するためこれら遺伝子の発現用レトロウイルスベクターを構築しパッケージング細胞に導入した。

組換え HBV ベクタープラスミド DNA を安定に組み込んだパッケージング細胞より産生された HBV 粒子を含む培養上清を用いて 4%PEG8000 存在下で感染実験を行った。感染成立は RT-PCR による HBV mRNA の検出、およびマーカー遺伝子の発現により検討した。

#### iPS 細胞株の樹立

iPS 細胞より分化誘導した肝細胞を用いた新たな HBV in vitro 感染系を確立するため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。

iPS 細胞から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。

(倫理面への配慮)

本研究では、ウイルスベクターを用いた実験を行うことから文部科学省の定める省令「研究開発等に係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拡散防止処置等を定める省令」(平成16年文部科学省・環境省令第1号)・組換えDNA実験指針・金沢大学研究用微生物安全管理規程等に則り本学安全委員会等の承認を得て、その指示の下で研究は進められる。

## C. 研究結果

### 組換え HBV ベクターの構築

HBV 感染実験に用いている HepG2 細胞や肝細胞では自家蛍光が強く細胞全体がひかりマーカー遺伝子 GFP の蛍光を区別することが困難なことが多い。この問題を解決するため核内に局在する蛍光蛋白質を HBV 感染のマーカー遺伝子とした HBV ベクター (HBV-GFPNuc、HBV-RFPNuc) を作製した。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が得られた。これらの細胞では GFP の核内局在が確認されたが、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。

### 組換え HBV パッケージング細胞の作製

HBV core、polymerase、X 遺伝子発現用と HBV envelope 遺伝子発現用のコンストラクトをそれぞれレトロウイルスベクターを介して導入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。これらパッケージング細胞では preS1 蛋白質の過剰発現が認められたので、新たに preS2 および S 蛋白質の発現量を増強した。その結果より多くの成熟 HBV 粒子を得ることができた。

ニワトリ肝癌由来 LMH 細胞より樹立した HBV パッケージング細胞では core など HBV 蛋白質の発現は HepG2 細胞と比べ高く、組

換え HBV 粒子は  $\sim 10^7$ /ml 分泌される。

### iPS 細胞株の樹立と HBV in vitro 感染系

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) を用いてヒト成人および新生児皮膚繊維芽細胞、単核細胞から iPS 細胞株を樹立した。CytoTune-iPS2.0 の導入による 0.1% 程度の頻度で iPS 細胞が出現する。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 クローンを継代している。これら iPS 細胞より分化誘導した細胞ではアルブミンの発現に差が認められるが、HBV 感受性について検討を進めている。

## D. 考察

### 組換え HBV ベクターの構築とパッケージング細胞について

これまでに樹立した HepG2 細胞や HEK293 由来の HBV パッケージング細胞、特に HEK293 由来のもの、では抗 HBs 抗体、抗 HBc 抗体を用いた免疫沈降法による解析から成熟 HBV 粒子に比べ多くの不完全 HBV 粒子の存在が示されていた。不完全 HBV 粒子の産生は preS2 および S 蛋白質の発現増強により抑制されることからこれまでのパッケージング細胞では preS1 蛋白質過多によるアンバランスな HBV エンベロープ蛋白質の供給が組換え HBV ベクター産生系のクオリティを損なっていたと考えられる。

組換え HBV ベクターは HBV 感染メカニズムや HBV 感染に関与する宿主因子の網羅的探索、HBV 感染を阻止する化合物の探索に有用なツールになると考えている。

### iPS 細胞株の樹立と HBV in vitro 感染系について

iPS 細胞 (Dotcom) から分化誘導した肝細胞は HBV 感受性であることをすでに示している。native に近い系として、また、より HBV 感受性の高い HBV in vitro 感染系を確立するため、元となる iPS 細胞を多数

樹立した。それぞれのヒト正常細胞から各 24 クローンを単離し、最終的にそれぞれ 5 クローンを継代している。これら iPS 細胞から分化誘導により得られた肝細胞ではアルブミンの発現量にクローン間の差が認められ異質であることから、HBV 感受性も異なるものと予想される。iPS 細胞から肝細胞への分化過程と HBV 感受性、各種 iPS 細胞から得られた肝細胞の HBV 感受性の違いを元にした肝細胞遺伝子発現の差分解析から HBV 感染関連因子の同定が進むものと期待される。

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

#### E. 結論

不完全 HBV 粒子の出現を抑え、成熟 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。また、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。

各種ヒト正常細胞から iPS 細胞株を多数樹立したので、それらの分化誘導により得られる肝細胞から本研究に有用な効率の良い HBV in vitro 感染系の確立を行う。

#### F. 研究発表

- 1.論文発表  
なし

- 2.学会発表

黒木和之：B 型肝炎ウイルス感染の分子基盤 平成 26 年度遺伝子病制御研究所研究集会「感染、免疫、炎症、発癌」 2014 年 7 月 3-4 日（札幌、北海道大学学友会館）

#### G. 知的所有権の出願・取得状況



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25年度）

HBV感染におけるリン酸化タンパク質の機能解析

分担研究者：岡本 徹 大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨：HBVの感染受容体として同定された胆汁酸トランスポーター(NTCP)をヒト肝細胞に発現させるとHBVの感染を許容するが、マウスのNTCPにはその活性がないことが報告されていた。そこで、ヒト型のNTCPを発現するトランスジェニックマウス(hsNTCP-TG)を作製し、その肝細胞がHBV感染を許容するかを検討した。hsNTCP-TGは細胞膜表面にhsNTCPを発現していたが、HBVに感受性を示さなかった。さらに、HepG2細胞はNTCPを発現していないが、HepG2細胞の膜表面タンパク質を精製し、マウスに免疫した血清IgG画分にHBVに対する中和活性が見出されたことから、NTCP以外にもHBVの感染に関与する宿主因子の存在が示唆された。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)は肝癌を発症するウイルスであり、世界でも2億人もの感染者が報告されている。治療薬としては逆転写阻害剤が用いられているが、その著効率は低く、また一生涯服用せねばならず、有効な治療法とは言い難い。近年、HBVの感染受容体として同定されたNa<sup>+</sup>依存的胆汁酸胆汁酸トランスポーター(NTCP)は、ヒト型NTCPはHBVの受容体として機能するが、マウスのものは機能しないことから、HBVが感染できる動物種をNTCPが規定している可能性が示唆されている。そこで、ヒトのNTCPを発現するトランスジェニックマウス(hsNTCP-TG)を作製し、HBV感染を許容できるマウスができるかを検討した。また、NTCP以外のHBV感染に関与する膜タンパク質の存在を検討するため、NTCPを発現していないHepG2細胞の膜画分をマウスに免疫し、血清由来のIgG画分にHBVに対する中和活性があるかを検討した。

B. 研究方法

近年HBVの受容体として同定されたヒトNTCPを発現するトランスジェニックマウス(hsNTCP-TG)を作製し、HBV感染に感受性を持つマウスの作出を試みた。樹立したhsNTCP-TGでのヒトNTCPの発現をウエスタンブロット、免疫染色により確認した。

hsNTCP-TGから初代肝細胞を取得してHBVを接種した。また、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。(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する。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、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HBVの受容体候補であるヒト型NTCPを発現するマウスを作製するため、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の下流にヒトNTCPのcDNAを挿入し、マウス胚へ導入し、ヒトNTCP発現マウスを得た。このマウスの肝臓でのhsNTCPの発現をウエスタンブロットで確認し、肝組織の免疫染色でhsNTCPの局在を検討した。その結果、hsNTCPは肝細胞膜表面に発現していることが確認できた。次に、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、ヒト初代肝細胞は効率よくHBVに感染したが、hsNTCP-TG由来の初代肝細胞は全く感受性を示さなかった。そこで、NTCP以外のHBV感染に関する膜タンパク質を検索するため、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。そこで、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。

#### D. 考察

ヒトNTCP発現トランスジェニックマウスの初代肝細胞にHBVは感染しなかったことから、HBV感染にはNTCP以外の膜タンパク質の関与が示唆された。また、NTCPが発現していないHepG2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HBV感染に関わる宿主因子の存在が示唆された。

#### E. 結論

ヒトNTCPを発現するトランスジェニックマウスを作製したが、このマウスから調整した初代肝細胞にはHBV感染は成立しなかった。NTCP以外にもHBV感染に関わる膜タンパク質の存在が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1.論文発表

1. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic  $\alpha$ -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens* 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534
2. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete

propagation of hepatitis C virus. *J. Virol.* 2014; 88: 5578-5594

##### 2.学会発表

1. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of HCV. 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
5. Sayaka Aizawa, Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura, Processing of core protein by signal peptide peptidase participates in propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014
6. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto, Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
7. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真実、塩川舞、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの感染におけるアポリポタ

- ンパク質受容体の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
8. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治、アポリポ蛋白質の両親媒性  $\alpha$  ヘリックスは HCV の感染性粒子産生に寄与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
  9. 岡本徹、相澤清香、杉山由加理、幸脇貴久、福原崇介、森石恆司、小池和彦、松浦善治、C 型肝炎ウイルスの病原性発現におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
  10. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCV の Quasispecies は増殖性に関与する、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
  11. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
  12. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
  13. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014
  14. Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Ayano

Ito, Takasuke Fukuhara, Yoshiharu Matsuura, Host factors involved in HBV propagation and pathogenesis. The 11<sup>th</sup> JSH Single Topic Conference. Hiroshima, 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（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ォマテイ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、バイオフィォマテイ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

39<sup>th</sup> Annual International Herpesvirus

Workshop, Kobe, 2014. July 19-23

16<sup>th</sup> 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

厚生労働科学研究委託費（B型肝炎創薬実用化等研究事業）  
分担研究報告書

細胞表面の糖鎖変化とHBV感染に関する研究

研究分担者 三善英知 大阪大学大学院医学系研究科 機能診断科学教授

研究要旨 肝がん細胞 Huh6 と HB611 に対する HBV の疑似ウイルスである BNC(Bionanocapsule)の感染効率と糖鎖の関係をグリコプロテオミクスの手法を用いて解析した結果、コアフコースが最も重要な糖鎖であることがわかり、NTCP と結合するタンパク X の関与が示唆された。

## A. 研究目的

細胞表面の糖鎖変化と HBV の感染性を検討するため、HBV の疑似ウイルスである BNC(Bionanocapsule)の感染効率と糖鎖の関係を、ヒト肝がん細胞株 Huh6 と HB611 を用いて検討した。

## B. 研究方法

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。

### (倫理面への配慮)

本研究は細胞実験によるものであり、倫理面での問題はないものとする。

## C. 研究結果

HB611 では、Huh6 よりも著明な BNC の取り込み亢進を認め、糖鎖解析の結果からコアフコースの著しい増加を認めた。コアフコースを生合成する糖転移酵素 FUT8 のノックダウンにより HB611 の BNC 取り込みが抑制され、Huh6 への FUT8 の過剰発現により BNC の取り込み亢進が見られた。コアフコースを特異的に認識するレクチン (PhoSL) の添加実験でも同様の効果を認めた。しかし HBV のレセプターと考えられている NTCP の発現量は Huh6 の方が高く、糖鎖を介した複雑な HBV の細胞内取り込み機構が存在すると考えられる。さらに NTCP を免疫沈降し、共沈するタンパクをマススペクトロメトリーで解析した結果、タンパク X が同定された。このタンパク X を

活性化し NTCP と結合させるシグナルにコアフコースが関与する可能性が示唆された。

## D. 考察

HB611 は Huh6 に HBV genome を導入して作られた細胞株である。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がある。2つの細胞の糖鎖解析の結果、コアフコースとシアル酸の増加を HB611 細胞で確認した。実際に HB611 細胞にインターフェロン処理を行い HBV の複製を抑制すると、糖鎖構造が Huh6 に近づく。特にコアフコースの過剰発現とノ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ことから、今後はコアフコースを研究の焦点を絞って、進めてゆきたい。

## E. 結論

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。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sato M, Kamada Y, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Yamada M, Hogaku K, Takehara T, **Miyoshi E.** (2014) Fetuin A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease subjects. **Liver International** in press.
- 2) Asazawa H, Kamada Y, Takeda Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kim Y, Nezu R, Kuzushita N, Mita E, Kato M, **Miyoshi E.** (2014) Serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular



- carcinoma development. *Clin Chem Lab Med.* **53(1)**, 95-102.
- 3) Kamada Y, Sato M, Kida S, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Sobajima T, Yoshida Y, Shinzaki S, Takamatsu S, Takehara T, **Miyoshi E.** (2014) *N*-Acetylglucosaminyltransferase V exacerbates concanavalin A-induced mouse hepatitis. *Molecular Medicine Reports* Aug 14, in press.
  - 4) Azuma K, Shinzaki S, Asazawa H, Kuroki E, Kawamoto S, Kamada Y, Hayakawa K, **Miyoshi E.** (2014) Twin studies on the influence of genetic factors on serum agalactosyl immunoglobulin G level. *Biomedical Reports* **2**: 213-216
  - 5) Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, **Miyoshi E,** Shoda J. (2014) Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *J Gastroenterol.* **49(4)**, 702-714.
  - 6) Tomita Y, Azuma K, Nonaka Y, Kamada Y, Tomoeda M, Kishida M, Tanemura M, **Miyoshi E.** (2014) Pancreatic Fatty Degeneration and Fibrosis as Predisposing Factors for Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* July 2, in press
  - 7) Fujita K, Shimomura M, Umemura M, Nakata W, Sato M, Nagahara A, Nakai Y, Takamatsu S, **Miyoshi E,** Nonomura N. (2014) Serum fucosylated haptoglobin as a novel prognostic biomarker predicting a high Gleason score of prostate cancer. *The Prostate* **74(10)**, 1052-58.
  - 8) Furukawa K, Kawamoto K, Eguchi H, Tanemura M, Tomimaru Y, Akita H, hama N, Wada H, Kobayashi S, Nonaka Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kumada T, Satomura S, Ito T, Serada S, Naka T, Mori M, Doki Y, **Miyoshi E,** Nagano N. (2014) Clinico-pathological significance of leucine-Rich alpha-2-glycoprotein-1 in sera of patients with pancreatic cancer *Pancreas* Jul 23, in press.
  - 9) Azuma K, Serada S, Takamatsu S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, Naka T, **Miyoshi E.** (2014) Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. *Journal of Proteome Research* **13(11)**, 4869-77.
  - 10) Ohkura T, Fujioka Y, Nakanishi R, Shiochi H, Sumi K, Yamamoto N, Matsuzawa K, Izawa S, Ohlura H, Ueta E, Kato M, **Miyoshi E,** Taniguchi S, Yamamoto K. (2014) Low level galectin-3 concentrations are associated with insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic syndrome* Sep 23 in press.
  - 11) Tanida T, Tanemura M, **Miyoshi E,** Nagano H, Furukawa K, Nonaka Y, Akita H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Eguchi H, Mori M, Doki Y. (2014) Pancreatic cancer immunotherapy using a tumor lysate vaccine, engineered to express  $\alpha$ -gal epitopes, targets pancreatic cancer stem cells. *Int. J. Oncology* Sep 24 in press.
  - 12) Honma R, Kinoshita I, **Miyoshi E,** Tomaru U, Matsuno Y, Shimizu Y, Takeuchi S, Kobayashi Y, Kaga K, Taniguchi N, Akita DH. (2014) Expression of  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase is associated with prognosis and histology in non-small cell lung cancers. *Oncology* Oct31 in press.
  - 13) Sobajima T, Yoshimura S, Iwano T,

Kunii M, Watanabe M, Atik N, Mushiake S, Morii E, Koyama Y, **Miyoshi E**, Harada A (2014). Rab11a is required for apical protein localisation in the intestine. *Biol Open*. 2014 Dec 19. pii: BIO20148532. doi: 10.1242/bio.20148532

- 14) Wang Y, Fukuda T, Isaji T, Lu J, Gu W, Lee HH, Ohkubo Y, **Kamada Y**, Taniguchi N, **Miyoshi E**, Gu J. (2015) Loss of  $\alpha$ 1,6-fucosyltransferase suppressed liver regeneration: implication of core fucose in the regulation of growth factor receptor-mediated cellular signaling. *Scientific Reports* **5**, 8264 | DOI: 10.1038/srep08264
- 15) Kenta Moriwaki and **Eiji Miyoshi** Leitins Methods and Protocols ; Edited by Jun Hirabayashi 613 ページ、2014/9/1 発刊 Human Press
- 16) **Eiji Miyoshi** and Yoshihiro Kamada, 2015/1/1, LXII, 1568 p. Springer Glycobiology: Biology and Medicine Hepatosteatosis and Primary Hepatoma
- 17) 鎌田佳宏、**三善英知**、竹原徹郎 NAFLD の診断と検査法の update 日本消化器病学会雑誌 111(1): 25-34, 2014
- 18) 鎌田佳宏、**三善英知**、吉田雄一、竹原徹郎 サイトカインと NASH 最新醫學 69(9), 35-41, 2014
- 19) **三善英知**、鎌田佳宏 肝疾患 2014-2015 Review 2014 年 6 月 2 日発行 . 日本メデイカルセンター (総ページ 203). 肝癌の診断・治療におけるバイオマーカーの有用性 p.45-50
- 20) **三善英知**、鎌田佳宏 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 (総 338 ページ) 編者 金子周一、竹原徹郎、持田 智 . Topics 肝癌の新しいバイオマーカー

p.46-53

## 2. 学会発表

- 1) 第 104 回アメリカ癌学会 (AACR) April 5-9 in San Diego, USA 2014 年 4 月 6 日ポスター発表 .Kamada Y, Mizutani K, Fujii H, Akita M, Ohara Y, Takamatsu S, **Miyoshi E**. Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis.
- 2) The AASLD LIVER MEETING November 7-11, Boston, USA. 2014 年 11 月 9 日ポスター発表 . Kamada Y, Sato M, Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Ymada M, Hougaku H, Takehara T, **Miyoshi E**. Fetuin-A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in NAFLD subjects.
- 3) 2014 Joint Meeting of The Society for Glycobiology and The Japanese Society of Carbohydrate Research November 16-19 Honolulu Hawaii. 2014 年 11 月 19 日ポスター発表 .**Miyoshi E**, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Takamatsu S, Kamada Y. Combination of two glycol-biomarkers could make a noninvasive diagnosis for nonalcoholic steatohepatitis.
- 5) 2014 年 11 月 19 日ポスター発表 Minehira T, Uozumi N, Asazawa H, Sawanobori A, Takamatsu S, Kamada Y, Tanaka K, Fukasa K, **Miyoshi E**. Functional analysis of a novel type of CA19-9 carrier molecules in micro lipid membrane .
- 6) 2014 年 11 月 19 日ポスター発表 . Takamatsu S, Azuma K, Serada S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, Naka T, **Miyoshi E**. Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses.
- 7) 2014 年 11 月 19 日ポスター発表 Terao N, Takamatsu S, Minehira T, Kamada Y, **Miyoshi E**. Fucosylation is a common type of glycosylation in the cancer stem cell-like phenotype of pancreatic cancer under various condition. GlycoT 2014 – 9th International Symposium on Glycosyltransferases .
- 8) 2014 年 6 月 20 日 Porto, Portugal Carvalho S, Yamaguchi Y, Catarino TA, Seruca R, Carneiro F, **Miyoshi E**,

Pierce M, Taniguchi N, Reis C A, Pinho S. Identification of a site-specific modification of E-cadherin N-glycans by GnT-V with key roles in functional regulation in gastric cancer.

9) 第10回欧州クローン病・大腸炎会議 (ECCO-IBD)

2015年3月ポスター発表

Araki M, Shinzaki S, Iijima H, Yamaguchi T, Kawai S, Hiyama S, Inoue T, Hayashi Y, Watabe K, Tsujii M, **Miyoshi E**, Takehara T

Agalactosyl IgG predicts therapeutic effect of anti-TNF agents in patients with Crohn's disease

10) 第100回日本消化器病学会総会 Research Forum. 2014年4月25日 東京国際フォーラム

鎌田佳宏、竹原徹郎、**三善英知**  
血中フコシル化タンパクは肝臓 ballooning hepatocyte のバイオマーカーである

11) 第50回日本肝臓学会総会 ワークショップ 11. 2014年5月30日 ホテルニューオオタニ(東京). 鎌田佳宏、竹原徹郎、**三善英知**

血清糖鎖バイオマーカーを用いた非侵襲的 Mattenoi 分類による NASH 診断法の開発

12) 第33回日本糖質学会年会 一般口頭発表 A. 2014年8月12日 発表(名古屋大学 豊田講堂)

**三善英知**、寺尾美香、新崎信一郎  
GnT-Vトランスジェニックマウスからわかったこと

13) 第73回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川). 水谷佳代、鎌田佳宏、藤井宏修、秋田真彩、佐藤元哉、木田幸穂、高松真二、**三善英知** 2014年9月25日 口頭発表

Mac-2bp は非アルコール性脂肪性肝炎の新たな血液診断バイオマーカーである. 藤井宏修、石井真悠子、新崎信一郎、飯島英樹、高松真二、鎌田佳宏、辻井正彦、森井英一、竹原徹郎、**三善英知**. 2014年9月26日 ポスター発表 糖転移酵素 GnT-V はマクロファージの機能異常を介して腸炎を悪化させる. 寺尾尚子、高松真二、峰平朋実、鎌田佳宏、種村匡弘、**三善英知**.

14) 2014年9月27日 口頭発表  
フコシル化は膵がんの様々ながん幹細胞様の表現型に共通した糖鎖修飾である. 下村真由香、佐々木夢香、前田晴香、寺尾尚子、高松真二、鎌田佳宏、飯島益巳、疋田隼人、竹原徹郎、黒田俊一、**三善英知**.

15) 2014年9月27日 ポスター発表.

HBV 感染における細胞表面上の糖鎖の関与. 第2回 看護理工学学会学術集会 大阪大学 大阪会館(豊中キャンパス). 清水咲希、丁憲勇、渡辺宗一郎、林雅信、鳥飼一男、木戸倫子、野村泰伸、**三善英知**、山田憲嗣、大野ゆう子.

16) 2014年10月4日ポスター発表. 身体バランスの視点から見た、腰部サポートウェア有効性の検証

第61回日本臨床検査医学会学術集会 福岡国際会議場. 若松可奈、藤井宏修、新崎信一郎、飯島英樹、岩本ちづる、片岡直也、鎌田佳宏、竹原徹郎、**三善英知**.

17) 2014年11月24日 口頭発表  
**フコシル化の低下は炎症性腸疾患における免疫抑制シグナルを増強する** 秋田真彩、鎌田佳宏、水谷佳代、藤井宏修、戎谷友佑、山本晃子、佐藤元哉、木田幸穂、浅澤瞳美、中山小太郎純友、高松真二、**三善英知**.

18) 2014年11月24日 口頭発表  
非アルコール性脂肪性肝炎の鑑別診断における血中フコシル化ハプトグロビン測定の有用性について. 上田真樹子、高松真二、寺尾尚子、傍嶋智明、鎌田佳宏、**三善英知**.

19) 2014年11月24日 口頭発表  
糖鎖改変肝がん細胞における HBV の発現の変化. 第95回日本化学会年会 日本大学理学部船橋キャンパス/薬学部. 李 昊晟、真鍋良幸、徳永健斗、野中祐二、寺尾尚子、高松真二、種村匡弘、**三善英知**、深瀬浩一.

20) 2015年3月27日ポスター発表. Development of novel tumor immunotherapy using synthetic  $\alpha$ -Gal epitope as an adjuvant 楊 瀟瀟、真鍋良幸、笠原里実、高松真二、**三善英知**、深瀬浩一.

21) 2015年3月28日ポスター発表. High-throughput screening of fucosyltransferase 8 inhibitors and study for inhibitory mechanism of the hit compound

22) 第40回日本肝臓学会東部会 シンポジウム. 2014年11月27日 京王プラザ(東京). 鎌田佳宏、竹原徹郎、**三善英知**.

NAFLD 患者の血中フェチリン A は肝臓線維と動脈硬化の程度に逆相関する.

23) 第9回 日本ケミカルバイオロジー学会. 2014年6月11-13日 大阪大学会館(大阪大学豊中キャンパス) ポスター発表. 笠原里美、真鍋良幸、高松真二、**三善英知**、深瀬浩一.

蛍光偏光法を用いた High Throughput Screening による Fut8 阻害剤の探索

知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

特許取得  
該当なし

実用新案登録  
該当なし

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

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

大阪大学・生物学国際交流センター・講師

**研究要旨：**これまでに、糖鎖はタンパク質の分解からの保護や生理活性に寄与するだけではなく、癌の悪性化など病態とも密接に関わることが分かってきた。いくつかのウイルス感染とも密接な関係にあることが指摘されており、HBV に関してもその感染に糖鎖が必要であることが報告されている。しかし、実際にウイルスもしくは宿主細胞由来のどのような糖鎖構造がウイルス感染や病態発症機構に寄与するのかについては明らかにされていない。本研究課題では、「*in vitro* 糖鎖改変技術」「糖鎖構造解析技術」「タンパク質細胞内輸送経路解析技術」の3技術を駆使することで、ウイルスおよび宿主細胞由来糖鎖構造とHBV 病態発症機構との関係解明に迫り、「糖鎖を標的とした治療戦略の開発」を目指す。

A. 研究目的

本研究では、HBV 表面抗原糖鎖の改変とHBV 感染細胞の糖鎖修飾変動からHBV 病態発症機構の解明を行い、糖鎖を標的とした創薬を目指す。

HBV 表面抗原の糖鎖改変については、他研究分担者（黒田チーム）が作成した bio-nanocapsule (BNC) を受容体基質として利用する。糖転移活性を持つエンド-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ M (EndoM) のうち、加水分解活性を低下させた変異型 EndoM-N175Q を用いた酵素学的反応により、BNC の糖鎖を *in vitro* にて改変するシステムの構築を目指す。一方で、糖鎖改変にはウイルス粒子をはじめ受容体基質となるタンパク質量の確保が重要課題である。このため、受容体基質としてのHBV 様粒子については、当研究分担者サイドでも、昆虫細胞・バキュロウイルス発現系等を利用しHBV 膜タンパク質を持つウイルス様粒子の作成を進める。

また、HBV 感染が宿主細胞の糖鎖分布にどのような影響を及ぼすのか、HBV ゲノム遺伝子発現細胞 HB611（三善チームより提

供）の糖鎖プロファイルを作成し解析する。特に、ウイルス感染は標的細胞の細胞膜タンパク質との相互作用が重要であると考えられることから、本年度ではHB611 細胞の膜タンパク質糖鎖構造のプロファイリングを行う。また、昨年度までの研究成果からHBV 関連遺伝子を発現する細胞ではフコース結合型糖鎖の存在比が増加することが示されているため、当該フコース結合を触媒するフコース転移酵素の遺伝子をノックダウンしたHB611（三善チームより提供）の糖鎖構造についても解析を行う。

B. 研究方法

EndoM-N175Q を利用した糖鎖改変

まず、実験系を確立するため、モデルタンパク質としてウシ由来リボヌクレアーゼ B (RNaseB) を受容体基質とし糖鎖改変を行った。RNaseB に付加されている高マンノース型糖鎖をエンド-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ H (EndoH) で加水分解し、高温条件下で EndoH を失活した。次に、供与体基質としてシアル酸 (Sia) 2 残基、ガラクトース (Gal) 2 残基、*N*-アセチルグルコサ

ミン (GlcNAc) 2 残基、マンノース (Man) 3 残基、GlcNAc が 2 残基から成る糖鎖 Sia<sub>2</sub>Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (シアリルバイアンテナ型) を持つシアリルグリコペプチドを添加し、EndoM-N175Q を用いて 30 で 12 時間インキュベートした。酵素反応産物に対して電気泳動し染色することで糖転移効率を確認した。また、糖転移効率を上げるためグリコペプチドの代替供与体基質としてオキサゾリン化シアリルバイアンテナ型糖鎖を用いて同様の糖転移を行った。

#### 昆虫細胞を利用した HBV 様粒子の作成

昆虫培養細胞 Sf9 株を宿主として、バキュロウイルスタンパク質発現系を用いて HBV 様粒子の生産を試みた。L タンパク質に加え、S および C タンパク質発現用ベクターを作成し、全てのベクターをコトランスフェクションすることで HBV 様粒子の生産および培養液中への分泌を試みた。最適な生産効率を得るために培養期間を適宜振り分け、培養液については培養終了後にアセトン沈殿することでタンパク質を回収し、ウエスタンブロッティングにより目的タンパク質の生産・分泌を確認した。

#### 糖鎖プロファイルの作成

培養後の細胞を PBS で入念に洗浄し、グルタルアルデヒドで固定した。メタノール・クロロホルム処理した固定化細胞試料に対し、グリコペプチダーゼ F を添加し膜タンパク質由来の糖鎖を切り出した。調製した糖鎖に対して 2-アミノピリジンを付加し還元することで糖鎖のピリジルアミノ (PA) 化蛍光標識を行った。次に、試料をフェノール・クロロホルム抽出し、未反応 2-アミノピリジンを除去した。

糖鎖構造の分析には、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) を用いた。上記において調製した PA 化糖鎖について、まず酸性糖の分離・精製を行うために陰イオン交換カラムを用いた HPLC に供した。得ら

れたピークを回収し乾燥後、続いてオクタデシルシリル基を有するカラムを用いた逆相 HPLC に供した (中性糖の分離・精製)。同様に得られたピークを回収し、アミノカラムを用いた液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) に供して糖鎖の分子量を決定した。更に、MS/MS を行うことで糖鎖構造を解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究課題で使用する研究材料については、培養細胞等について一般的なものであ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されない) 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%)、 $\text{SiaGalGlcNAcMan}_4\text{GlcNAc}_2$  (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  $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$  (63.1%)、

$\text{GalGlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$  (1.1%)、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (1.4%)、 $\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$  (2.7%)、 $\text{GalGlcNAcMan}_3\text{FucGlcNAc}_2$  (0.9%)、 $\text{GalGlcNAcMan}_4\text{FucGlcNAc}_2$  (4.6%)、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$  (2.9%)、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$  (18.8%)、 $\text{SiaGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$  (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ロックダウンした HB611 細胞およびロックダウン (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。フコースロックダウン細胞では、 $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$  (52.6%)、 $\text{Man}_{1-4}\text{GlcNAc}_2$  (0.2%)、 $\text{GluMan}_9\text{GlcNAc}_2$  (1.5%)、 $\text{GlcNAc}_n\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (3.1%)、 $\text{GalGlcNAcMan}_{3-5}\text{GlcNAc}_2$  (1.3%)、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (3.9%)、 $\text{Gal}_3\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (0.7%)、 $\text{SiaGalGlcNAc}_2\text{Man}_n\text{GlcNAc}_2$  (0.4%)、 $\text{SiaGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (4.3%)、 $\text{Man}_n\text{FucGlcNAc}_2$  (4.9%)、 $\text{GlcNAc}_n\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$  (5.2%)、 $\text{GalGlcNAcMan}_n\text{FucGlcNAc}_2$  (1.5%)、 $\text{GalGlcNAc}_2\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$  (0.3%)、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$  (1.7%)、 $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2$  (1.0%)、 $\text{Gal}_3\text{GlcNAc}_3\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$  (1.8%)、 $\text{SiaGalGlcNAcMan}_n\text{FucGlcNAc}_2$  (1.4%)、 $\text{SiaGalGlcNAc}_2\text{Man}_n\text{FucGlcNAc}_2$  (0.5%)、 $\text{SiaGal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{FucGlcNAc}_2$  (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、 $\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$  (39.4%)、 $\text{Man}_{1-4}\text{GlcNAc}_2$  (2.6%)、 $\text{GluMan}_9\text{GlcNAc}_2$  (0.9%)、 $\text{GlcNAc}_n\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (0.5%)、 $\text{GalGlcNAcMan}_{3-5}\text{GlcNAc}_2$  (1.9%)、

GalGlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ( 1.2% ) 、  
 Gal<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ( 2.2% ) 、  
 Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ( 0.6% ) 、  
 SiaGal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ( 0.6% ) 、  
 Man<sub>n</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 2.0% ) 、  
 GlcNAc<sub>n</sub>Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 6.5% ) 、  
 GalGlcNAcMan<sub>n</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 0.9% ) 、  
 Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 19.7% ) 、  
 Gal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>Fuc<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub> ( 1.5% ) 、  
 Gal<sub>3</sub>GlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 6.1% ) 、  
 Gal<sub>4</sub>GlcNAc<sub>4</sub>Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 1.0% ) 、  
 SiaGalGlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>n</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 1.0% ) 、  
 SiaGal<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 1.8% ) 、  
 SiaGal<sub>3</sub>GlcNAc<sub>3</sub>Man<sub>3</sub>FucGlcNAc<sub>2</sub> ( 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

糖鎖改変を經由した 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

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型慢性肝炎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持続感染に關与している。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、その機能に関する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<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>細胞)、T細胞(CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>細胞)、NKT細胞(CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>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。

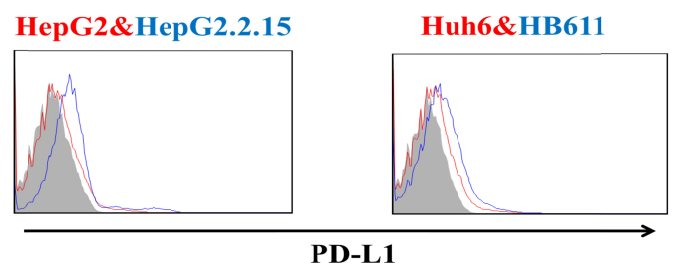


図1.HBV発現細胞株におけるPD-L1発現

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。

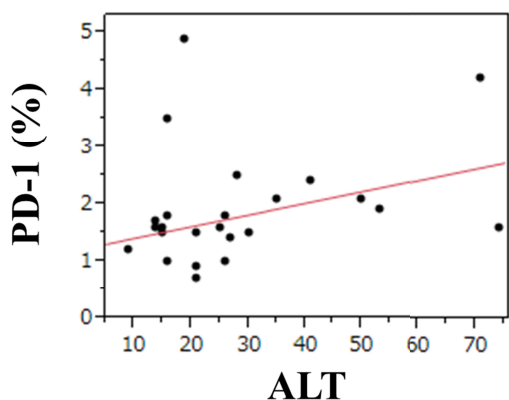


図 2. NK 細胞における PD-1 発現頻度と血清 ALT 値

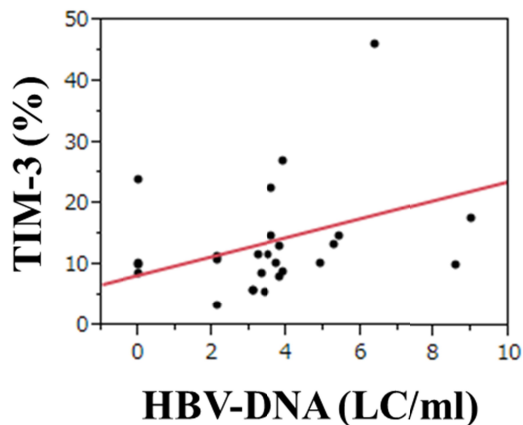


図 3. T 細胞における Tim-3 発現頻度と血清 HBV-DNA 量

#### 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関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、肝細胞傷害に関連すること、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 細胞が関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・持続感染に関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。

#### 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髄由来抑制性免疫細胞 (MDSC) の役割

JDDW2014 (第22回日本消化器関連学会週間、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 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業) 分担研究報告書

### 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

分担研究者 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- $\gamma$  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- $\gamma$  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- $\lambda$ 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 11<sup>th</sup> 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 2<sup>nd</sup> 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（B型肝炎創薬実用化等研究事業）  
分担研究報告書

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

大阪大学大学院医学系研究科 ウイルス学 助教 大崎恵理子

**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こり，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メラ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
- 2) 該当なし
- 2.学会発表
- 3) 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 斉藤 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<sub>Brevi</sub>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

G．研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

なし

