

201423033A

厚生労働省科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた
感染阻害低分子化合物およびレセプター探索

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠

平成27(2015)年5月

厚生労働省科学研究費補助金

B型肝炎創薬実用化等研究事業

HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた
感染阻害低分子化合物およびレセプター探索

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠

平成27(2015)年5月

目 次

I. 総括研究報告

- HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物およびレセプター探索…………… 1
下遠野 邦忠 (国立国際医療研究センター)

II. 分担研究報告

1. 蛍光発色遺伝子を発現するHBV様粒子の産生とそれを用いた感染初期過程の解析…………… 11
下遠野 邦忠 (国立国際医療研究センター)
2. HBV感染モデル細胞系の樹立…………… 15
落谷 孝広 (国立がん研究センター研究所)
3. 蛍光標識HBVを用いた感染評価と受容体探索…………… 19
杉山 真也 (国立国際医療研究センター)
4. HBV感染を阻害する低分子化合物のスクリーニング…………… 21
長田 裕之 (理化学研究所基幹研究所)
5. HBV感染、複製機構解析のためのアデノウイルスベクターの開発…………… 23
近藤 小貴 (東京大学医科学研究所)

III. 研究成果の刊行に関する一覧表…………… 27

IV. 研究成果の刊行物・別刷り…………… 31

I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)
HBVの感染初期過程を評価する系の開発とそれを用いた感染阻害低分子化合物および
レセプター探索

26年度 総合分担研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠 国立国際医療研究センター 特任部長

要旨

研究要旨：これまでに NanoLuc ルシフェラーゼ遺伝子をゲノムに組み込んだ HBV 様粒子 (HBV/NL)の産生を行い、それがヒト初代肝細胞や NTCP を発現する HepG2, HuH7 細胞に効率よく感染することを明らかにした。今年度はこの系を用いて、宿主細胞の中で HBV の生活環に影響を与える因子を siRNA ライブラリーの中から選択した。宿主遺伝子 18,000 をカバーする siRNA ライブラリーに HBV/NL の系を用いて解析し、HBV 感染複製に影響を与える約 100 種類の宿主因子を同定した。一方、HBV 感染を阻害する抗体の探索を開始した。HBV 受容体の探索を目的として、HBV 感染し易いのとにくい細胞毎に分別し、それらの間での膜蛋白質産生の違いを調べた。その結果、4 種類の膜蛋白質に産生の違いを見いだした。スクリーニングに用いる感染細胞を開発する目的で、(1)成熟肝細胞から増殖能および成熟肝細胞・胆管上皮細胞への分化能を持つ肝幹細胞様細胞の最適培養条件、保存条件を確立した。(2) 肝幹細胞様細胞のリプログラミングのメカニズム解明のため、ステム関係遺伝子群などの網羅的解析を行ない、複数のステム細胞特異的遺伝子の発現を明らかにし、それがステム細胞様に変化している事を明らかにした。

抗 HBV 剤開発のひとつとして、微生物や植物の二次代謝産物、およびその誘導体を中心に収集した化合物ライブラリーについて HBV/NL 系を用いて評価をおこなった。

HBV/NL 系はウイルス複製の初期過程のみを評価できる系である。ウイルス複製の評価範囲を広げる目的でアデノウイルスを用いた感染系の開発も行った。肝細胞への遺伝子導入効率が極めて高いアデノウイルスベクター (AdV) から HBV 遺伝子を高発現する系について検討を行った。まず、プレゲノム RNA を CMV プロモーターから発現する AdV を作製し肝細胞由来 HuH-7 細胞へ感染した結果、感染 3 日で複製ゲノムの生成を確認することに成功した。また、HBV コード遺伝子 4 種類 (Pol、Core、S、X) をそれぞれ発現する AdV の作製も行い、Pol 遺伝子についてはその活性を確認した。

分担研究者

落谷 孝広

国立がん研究センター研究所

分野長

杉山 真也

国立国際医療研究センター

上級研究員

長田 裕之

理化学研究所基幹研究所 施設長

近藤 小貴
東京大学・医科学研究所 助教

研究協力者
上仲 一義
化学及血清療法研究所
菊池研究所 上級研究員

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）感染を認識して宿主の免疫機構が産生する中和抗体（HBs抗体）が陽性になる事により、ウイルス血症が抑制される。しかし、その様な状況でも肝組織内にウイルス DNA が検出されたり、量的な違いがあるものの、ウイルス DNA が血流中に検出される場合もあるので HBs 抗体の出現がウイルスを完全に排除している事にはならない。

現在の HBV 感染者への治療はウイルスポリメラーゼを標的にした阻害剤やインターフェロンを用いたものが主流であるが、これらの治療によってもウイルスの完全排除は困難であり、抜本的な治療法の開発が求められている。

従来の核酸化合物による治療に加えてウイルス複製過程の異なる点を標的にした治療薬が開発されればそれとの併用療法によるウイルスの排除が可能になると期待される。そこで本研究では HBV が標的細胞に感染する初期過程（ウイルスが細胞を認識して吸着し、細胞の中に入り込むまで）を明らかにして、その過程を阻止する新たな方策を探ることを目的とした研究を行う。そのひとつとして、レポーター遺伝子を組み込んだ HBV ゲノムを作成し、それからウイルス粒子を作成して、簡便に HBV 感染をスクリーニングすることができるようにすることで、探索効率を上げることを目指した。一方、HBV 複製領域を広くカバーする目的で、アデノウイルスベクターを活用した HBV 遺伝子発現系の開発も行う。

HBV 感染系を用いた抗 HBV 阻害剤の開発には、HBV が感染増殖する細胞の選択が重要である。そこで感染効率の高い細胞株を得る事、あるいは肝幹細胞や成体幹細胞からの肝細胞分化技術を駆使するなどして感染効率の高い培養細胞の獲得をおこなう事も目指す。HBV 感染を阻害する低分子化合物の探索のために、微生物および植物成分を材料と下スクリーニングを行う。主に、①これまでに収集した微生物生合成遺伝子改変技術を用いた天然化合物やそのフラクシオンライブラリーについて NanoLuc 遺伝子を導入した発光型組換え HBV 粒子を用いたスクリーニング系の確立を目的とした。

B. 研究方法

(1) NanoLuc 遺伝子を組み込んだ HBV ゲノムの調製と改良。

HBV ゲノムから Core をコードする領域内の DR1, DR2 シス因子を保存し、残りの領域を NanoLuc 遺伝子と置き換えた組み換えウイルス粒子を産生させる。

- (2) ルシフェラーゼ(NL)活性を指標にした HBV 感染の検証。ルシフェラーゼ活性が HBV 感染を反映するかについて、HBV 感染阻害剤等を用いて検証する。
- (3) 蛍光発光遺伝子を組み込んだゲノムからウイルス産生を行い、感染効率や感染評価を行う細胞の選択をおこなう。
- (4) siRNA ラブラリーを用いて、HBV 感染/複製を制御する宿主因子を探索する。
- (5) HBV 感染を阻害する抗体探索をおこなう。
- (6) 感染し易い細胞としにくい細胞を、一細胞レベルで分別して膜蛋白質の発現の違いを基にして、新たな受容体の解析を行う。d
- (7) 分担研究者（落谷）が独自に発見した 4 種のシグナル伝達阻害剤カクテルである YPAC (PNAS, 2010) を応用する事で、HBV 感染のために有用な細胞系を提供する。具体的には、ヒト肝細胞の長期機能維持培養を可能にするインヒビターカクテルを同定する。さらに、エピジェネティクス制御因子によるヒト肝細胞誘導を試みる。
- (8) HBV コード遺伝子及びプレゲノム RNA 発現する AdV を作製する。それを HuH-7 細胞へ感染させ、複製ゲノムの検出をおこなう。
- (9) 理研天然化合物バンク NPDepo から提供された標準化合物ライブラリー（作用既知薬剤 80 種）を用いて、HBV/NL を感染させて抗 HBV 作用を示す化合物の同定を行う。また生合成遺伝子改変微生物やフラクシオンライブラリー、天然化合物データベース NPPlot についても感染実験を行い、新規天然化合物を探索した。

（倫理面への配慮）

各施設に倫理に関する申請をし、承認を得て研究を進める。本研究で使用する細胞は、いずれもインフォームドコンセントのもとに倫理審査を得て採取されている。市販されているヒト肝細胞については、倫理的な問題点はない。ラットの肝細胞に関しては、所内の動物倫理委員会の承認を得て、動物愛護に基づく実験を実施する。

C. 研究結果

- (1) NanoLuc 遺伝子を組み込んだ HBV ゲノムの調製と改良。

HBV ゲノムに NanoLuc(NL)遺伝子を挿入したゲノムを作成した。NL 遺伝子が 500 ヌクレオチドを超えるために、ゲノム全体の大きさが 3,700 ヌクレオチドを超過し、粒子産生に影響を与えたと考えられたために、pol をコードする一部分の配列を欠失させて、ゲノムサイズを 3,400 ヌクレオチドの範囲に抑えた。それにより、組み換えウイルスの産生を野生型のウイルスにほぼ匹敵する効率で産生させる事が可能になった。しかし、pol 遺伝子を欠損させたために、HBV/NL による野生型 HBV の複製の全過程を反映させる事は出来ない。

- (2) ルシフェラーゼ(NL)活性を指標にした HBV 感染の検証。ルシフェラーゼ活性が HBV の本来の感染を反映するかについて、HBV 感染阻害剤等を用いて検証した。インターフェロン(100 IU/ml)で約 70%阻害、ヘパリンで 70%阻害、中和抗体で 80%阻

害、エンテカビルで 30%の阻害が見られたが、これらの阻害剤存在条件下で、HBV RNA の量は NL 活性と呼応している事が分かった。

(3) 蛍光発光遺伝子を組み込んだゲノムからウイルス産生を行い、感染効率や感染評価を行う細胞の選択をおこなった。

径 10cm の培養器の細胞を用いて HBV/NL を調製したときに、96 well プレート 3-4 枚分の細胞に感染させて感染を評価できる事が分かった。また、NTCP を形質導入した HepG2 あるいは HuH7 を用いる事で、簡便に評価が可能になる事も分かった。

(4) siRNA ラブラリーを用いて、HBV 感染/複製を制御する宿主因子を探索した。Dharmacon社から購入した siRNA ライブラリーを用いて宿主因子のスクリーニングを行った。このライブラリーは 18,000 遺伝子を標的にしているので、HBV の生活環を制御する遺伝子の多くが含まれると期待された。HepG2/NTCP を siRNA 処理し、それに HBV/NL を感染させ評価を行った。三次評価までおこない、約 100 種類の遺伝子を得た。

(5) HBV 感染を阻害する抗体探索の準備を行った。

PXB 細胞を抗原としてマウスに免疫し、そのハイブリドーマを得た。これらの中から、ハイブリドーマのクローニングを行っている。

(6) アルブミン発現と HNF3 遺伝子発現のある肝細胞であること、HBV 遺伝子発現の有無、SLC10A1 発現の有無で細胞を層別化した。両者での遺伝子発現の差を解析した。その結果、感染受容体の候補探索では、4つの膜タンパクが得られた。これらが感染に関与しているか検討するために、CRISPR で細胞株をノックアウトクローン細胞の樹立を進めた。

(7) これまでに明らかにした 3 種のシグナル伝達阻害剤カクテルをラット初代培養肝細胞に添加することでリプログラミングした肝幹細胞の性質を持つ細胞の最適培養条件を設定した。その結果、DMEM をベースにした無血清培地で 100 倍以上に増殖させる事が可能になった。この細胞は通常の 10% DMSO を含む不凍結液での保存が可能であった。成熟肝細胞と胆管細胞の二方向性分化能の最適条件も設定し、それぞれ 100% に近い状態での誘導が可能となった。

(8) 肝幹細胞様細胞のリプログラミングのメカニズム解明のため、ステム関係遺伝子群などの網羅的解析を行ない、複数のステム細胞特異的遺伝子の発現を確認できたことから、これらの細胞はステム細胞様に変化している事が明らかとなった。

(9) HBV プレゲノム RNA 及び HBV がコードする Core、Pol、S、X 遺伝子を各々発現する組み換えアデノウイルス(AdV)の作製を行い、Southern blot 法、PCR 又は western blot により発現の確認、及び評価を行った。

(10) Pol 領域を一部欠失することでゲノム複製が起こらないように設計した HBV ゲノムを Pol 発現 AdV と同時に HuH-7 細胞へ導入することで Pol 発現 AdV 依存的なゲノム複製を検出できた。この事により AdV から発現した Pol が活性型であることを確認した。

(11) HBV 感染のスクリーニング系の確立

迅速かつ定量性よく活性を評価するため、ウイルス量と培養日数を検討した。その系を用いて NPDepo から提供された標準化合物について抗ウイルス活性を評価した。その結果、タンパク質合成や DNA 合成阻害剤、微小管重合阻害剤、抗ウイルス物質で顕著な活性が見られた。また、フラクショナルライブラリーから見出した新規化合物を中心に、NPDepo 化合物ライブラリーの一部について予備スクリーニングを開始し、環状ペプチドやカルボリン系化合物など複数のヒットを得た。またこれらの化合物については宿主に対して毒性を示さないことを確認した。

D. 考察

1. レポーター-HBV を用いた感染評価を可能にした。

蛍光を発色する遺伝子 (NanoLuc) を内包する HBV 様粒子の産生を行った。本レポーターウイルスのレポーター活性が HBVRNA 量を反映している事を明らかにした。粒子の集合や放出などの、生活環の後期過程は反映していないと考えられるが、この系を用いた HBV 感染初期過程を評価しつつ、その過程を阻害する薬剤の開発に寄与すると期待される。この系を用いて、siRNA ライブラリーを用いた宿主因子の探索を行った。数回に亘る評価実験を行い、HBV 複製を制御する約 100 種類の宿主遺伝子を明らかにした。これらの遺伝子が実際に HBV 感染複製に作用しているか否かについて現在解析中である。抗 HBV 作用を示す低分子化合物のマスクリーニングが可能になった。

2. HBV に感染する細胞の開発

本年度の研究成果は、未だラットの肝細胞であるが、この肝細胞の表面に人工的に NTCP の発現を導入する事で、簡易的に HBV の感染をモニターできる細胞が可能かもしれない。今後の検討課題である。さらに、この低分子化合物によるリプログラミング手法が、ヒトの成熟肝細胞から未分化肝幹細胞の誘導にも有効であるかどうかは、今後の研究次第である。

3. アデノウイルスベクターを用いた HBV 感染機構の解析と、ウイルス蛋白質の機能解析。

AdV は特に肝臓由来細胞への導入効率が高いため、薬剤誘導やトランスフェクション法など一般的に用いられている手法と比べて迅速かつ定量的に HBV ゲノム複製を検出することが可能であることから抗 HBV 薬のスクリーニング等にも有用性が高いと考える。

4. 微生物代謝成分、植物成分内の抗 HBV 因子の探索

NPDepo の標準ライブラリーの阻害活性を評価した結果、HBV の生活環からヒットが予想される化合物群で活性が見られ、評価系がワークしていることを確認した。化合物ライブラリーを評価する準備が整ったので、今後、大規模スクリーニングを本格化させる。また予備的検討で得た候補化合物のうち、カルボリン系化合物については純度が低かったため、活性本体を精製し、抗ウイルス活性を再評価する。

E. 結論

蛍光を発色する遺伝子 (NanoLuc) を内包する HBV 様粒子の産生を行い、これを用いて 96 well 規模での感染評価の実験条件を整えた。上の評価条件下において、siRNA ライブラリーを用いた宿主因子の探索を行い、HBV 複製に重要と思われる宿主因子を明らかにした。これまでに開発した HBV 感染複製評価系が、抗 HBV 剤の開発に有効である事が示せた。エピジェネティクス制御因子が、肝がん細胞を正常な肝細胞様細胞にリプログラミング可能な事を明らかにした。

プレゲノム発現 AdV は HBV ゲノム複製の研究に応用可能であると考えられる。また、Pol 遺伝子発現 AdV においてはその活性を確認出来たため、今後は他のコード遺伝子発現 AdV についても評価を行っていくとともに班員への供給を進める。HBV/NL 粒子、HepG2/NTCP 細胞を用いたハイスループットスクリーニング系を確立し、大規模スクリーニングを開始する準備を整えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Arimoto KI, Hishiki T, Kiyonari H, Abe T, Cheng C, Yan M, Fan JB, Futakuchi M, Tsuda H, Murakami Y, Suzuki H, Zhang DE, Shimotohno k. Murine Herc6 Plays a Critical Role in Protein ISGylation In Vivo and Has an ISGylation-Independent Function in Seminal Vesicles. J Interferon Cytokine Res. 2014 Nov 19. [Epub ahead of print]
2. Shimizu Y, Nishitsuji H, Marusawa H, Ujino S, Takaku H, Shimotohno k. The RNA-editing enzyme APOBEC1 requires heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q isoform 6 for efficient interaction with interleukin-8 mRNA. J Biol Chem. 289(38): 26226-26238, 2014
3. Nakai M, Seya T, Matsumoto M, Shimotohno k., Sakamoto N, Aly HH. The J6JFH1 Strain of Hepatitis C Virus Infects Human B-Cells with Low Replication Efficacy. Viral Immunol. 2014 May 22. Tsugawa Y, Kato H, Fujita T, Shimotohno k., Hijikata M. Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection. PLoS One. 2014 Feb 26;9(2):e89869.

4. Katsuda T, Kurata H, Tamai R, Banas A, Ishii T, Ishikawa S, Ochiya T*. The in vivo evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for acute liver disease. *Methods Mol Biol*, 1213:57-67, 2014
5. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. *PLoS One*. 2014 Feb 10;9(2):e86449.
6. Xeuatvongsa A, Komada K, Kitamura T, Vongphrachanh P, Pathammavong C, Phounphenghak K, Sisouk T, Phonekeo D, Sengkeopaseuth B, Som-Oulay V, Ishii K, Wakita T, Sugiyama M, Hachiya M. Chronic hepatitis B prevalence among children and mothers: results from a nationwide, population-based survey in Lao People's Democratic Republic. *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2):e88829.
7. Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T. Dysregulation of retinoic acid receptor diminishes hepatocyte permissiveness to hepatitis B virus infection through modulation of sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) expression. *J Biol Chem*. 2015 Feb 27;290(9):5673-84.
8. Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T*, Iizasa H. MicroRNAs and oncogenic human viruses. In: Babashah S (ed), *MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis*. Switzerland, Springer, pp 155-182, 2014
9. Kondo S*, Yoshida K, Suzuki M, Saito I, Kanegae Y. Adenovirus-encoding virus-associated RNAs suppress HDGF gene expression to support efficient viral replication. *Plos One*, 9, e108627, 2014.
10. Gozdecka M, Lyons S, Kondo S*, Taylor J, Li Y, Walczynski J, Thiel G, Breitwieser W, Jones N. JNK suppresses tumour formation via a gene expression programme mediated by ATF2. *Cell Rep.*, 9(4):1361-1374, 2014.
11. Suzuki M, Kondo S*, Pei Z, Maekawa A, Saito I, Kanegae Y. Preferable sites and orientations of transgene inserted in the adenovirus vector genome: the E3 site may be unfavorable for transgene position. *Gen. Ther.*, 124, 2014.
12. Jang JP, Nogawa T, Uramoto M, Okano A, Futamura Y, Shimizu T, Takahashi S, Jang JH, Ahn JS, Osada H. RK-270A-C, new oxindole derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library of *Streptomyces* sp. RK85-270. *J Antibiot.* in press, 2014. (doi: 10.1038/ja.2014.141.)

2. 学会発表

1. 西辻 裕紀、清水 裕子、宇治野 真之、原田 圭輔、椎名 律子、山本 祐美、杉山 真也、溝上 雅史、下遠野 邦忠・HBV複製に關与する宿主因子の探索・第62回日本ウイルス学会学術集会・パシフィコ横浜會議センター・平成26年11月10-12日
2. 清水 裕子、西辻 裕紀、宇治野 真之、原田 圭輔、椎名 律子、山本 祐美、杉山 真也、溝上 雅史、下遠野 邦忠・レポーター遺伝子を用いたHBV感染評価系の構築・第62回日本ウイルス学会学術集会・パシフィコ横浜會議センター・平成26年11月10-12日
3. 杉山真也、田中靖人、溝上雅史 「宿主因子を標的とした新規抗B型肝炎ウイルス製剤の開発と作用機序の解析」第50回日本肝臓学会總會 シンポジウム ホテルニューオオタニ赤坂 2014年5月30日 SY-2-15
4. 「A novel genetic maker to improve the prediction of HCV spontaneous clearance: Polymorphisms consisting of (TA)_n dinucleotide repeat near IL28B gene」Masaya Sugiyama, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, and Masashi Mizokami The International Liver Congress 2014: 49th Annual Meeting of EASL in London, P-722 13th April 2014
5. Clinical Significance of Host Factors in Viral Hepatitis」Masashi Mizokami, Nao Nishida, and Masaya Sugiyama The 2nd International Symposium of Catholic University Liver Research Center Symposium 26th July 2014
6. Association of sphingolipid biosynthesis pathway as a novel therapeutic target for HBV replication. Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, Makoto Nakanishi, Masayuki Sudoh, and Masashi Mizokami. Poster P-159, 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep 4 2014, Los Angeles
7. Incidence of HBV infection in MSM cohort in Ulaanbaatar and new therapies for hepatitis B and C. Masaya Sugiyama Oral-4, Japan-Mongolia Collaborative Study for HIV and Hepatitis in MSM in Mongolia. October 23rd, 2014. Ulaanbaatar
8. Association between (TA)_n dinucleotide repeat near IL28B gene and HCV spontaneous clearance. Masaya Sugiyama, Satoshi Hiramine, Norihiro Furusyo, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, Tatsuya Kanto, Jun Hayashi, David L Thomas and Masashi Mizokami. Poster P-1464 The 65th Annual Meeting of the AASLD Nov 10th 2014 Boston
9. 落谷孝広 マイクロ RNA による肝疾患の新しい理解と治療戦略、第8回東京肝疾患研究会 講演・東京・平成26年6月14日
10. Yoshioka T, Maekawa A, Suzuki M, Kondo S, Kanegae Y, and Saito I. Development of a novel adenovirus vector for cancer-specific and stable

- expression: mini-adenovirus vector (mini-AdV). The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
11. Maekawa A, Pei Z, Kondo S, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
 12. Kondo S, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, and Kanegae Y. Dually safer adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes with significantly low immune responses. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
 13. Suzuki M, Kondo S, Saito I, and Kanegae Y. Best insertion sites and orientation for the single and double expression unit in the adenovirus vector genome. The 20th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy, The Jikei University, Tokyo, August 6-8
 14. Suzuki M, Kondo S, Yamasaki M, Kanegae Y, Nomoto A, and Saito I. Development of new methods to detect the replication HBV genome in the cells infected with adenovirus vector expressing pregenome RNA. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Virus, UCLA, Los Angeles, September 3-6
 15. 近藤小貴, 鈴木まりこ, 前川文, 斎藤泉, 鐘ヶ江裕美, アデノウイルス感染初期における virus-associated RNA の役割, 第 62 回日本ウイルス学会学術総会, 横浜, 11 月 10-12 日, 2014
 16. 鈴木まりこ, 近藤小貴, 山崎学, 鐘ヶ江裕美, 野本明男, 斎藤泉, アデノウイルスベクターを用いた効率的な HBV ゲノム複製解析システムの開発: cocally closed circular DNA (CCC)の検出, 第 62 回日本ウイルス学会学術総会, 横浜, 11 月 10-12 日, 2014
 17. 近藤小貴, 鈴木まりこ, 山崎学, 鐘ヶ江裕美, 野本明男, 斎藤泉, アデノウイルスベクターを用いた定量的 HBV 複製 ccc 及び rc ゲノム検出法の開発, 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 11 月 25-27 日, 2014
 18. Osada H · Profiling for target identification of bioactive small molecules · The 3rd RIKEN- SNU Workshop on Chemical Biology for Health and Resource Sciences · 理研和光事業所 · 平成 26 年 4 月 21 日
 19. 川谷 誠, 室井 誠, 二村 友史, 青野 晴美, 長田 裕之 · ChemProteoBase を用いた collismycin A の作用標的の同定 · 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会 · 仙台市情報産業プラザ · 平成 26 年 6 月 25-27 日
 20. Osada H · In vitro reconstitution of biosynthetic machinery for reveromycin · ISBA17 · Kusadasi · Turkey · 平成 26 年 10 月 8-12 日

21. 野川 俊彦, Jun-Pil Jang, 本郷 やよい, 清水 猛, 浦本 昌和, 岡野 亜紀子, 二村 友史, 高橋 俊二, Jong Seog Ahn, 長田 裕之・微生物代謝産物フラクションライブラリーより単離した新規環状デプシペプチドの構造・第 56 回天然有機物討論会・高知県立県民文化ホール・平成 26 年 10 月 15-17 日
22. Osada H, Takahashi S, Kawatani M・Biosynthesis study of reveromycin: Aiming at a therapeutic agent to osteoclast related diseases・Natural product discovery & development in the post genomic era・San Diego・平成 27 年 1 月 11-14 日
23. Nogawa T, Okano A, Lim CL, Takahashi S, Osada H・Construction of a microbial metabolite fraction library with NPPlot for discovery of novel metabolites・Natural product discovery & development in the post genomic era・San Diego・平成 27 年 1 月 11-14 日
24. 長田 裕之・破骨細胞を標的とするリベロマイシン A・日本農芸化学会 2015 年度大会・岡山大学・平成 27 年 3 月 26-29 日
25. 野川 俊彦, 高橋 俊二, 高木 海, 関山 恭代, 岡野 亜紀子, 川谷 誠, 清水 猛, 長田 裕之・アルコール添加による新規リベロマイシン誘導体の創製と生合成機構の考察・日本農芸化学会 2015 年度大会・岡山大学・平成 27 年 3 月 26-29 日

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

II 分担者研究報告

蛍光発色遺伝子を発現するHBV様粒子の産生とそれを用いた感染初期過程の解析

分担研究者 下遠野 邦忠 国立国際医療研究センター 特任部長

研究要旨: これまでに NanoLuc ルシフェラーゼ遺伝子をゲノムに組み込んだ HBV 様粒子(HBV/NL)の産生を行い、それがヒト初代肝細胞や NTCP を発現する HepG2, HuH7 細胞に効率よく感染することを明らかにした。今年度はこの系を用いて、宿主細胞の中で HBV の生活環に影響を与える因子を siRNA ライブラリーの中から選択した。宿主遺伝子 18,000 をカバーする siRNA ライブラリーに HBV/NL の系を用いて解析し、HBV 感染複製に影響を与える約 100 種類の宿主因子を同定した。一方、HBV 感染を阻害する抗体の探索を開始した。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染を認識して宿主の免疫機構が産生する中和抗体 (HBs 抗体) が陽性になる事により、ウイルス血症が抑制される。しかし、その様な状況でも肝組織内にウイルス DNA が検出されたり、量的な違いがあるものの、ウイルス DNA が血流中に検出される場合もあるので HBs 抗体の出現がウイルスを完全に排除している事にはならない。

現在の HBV 感染者への治療はウイルスポリメラーゼを標的にした阻害剤やインターフェロンを用いたものが主流であるが、これらの治療によってもウイルスの完全排除は困難であり、抜本的な治療法の開発が求められている。

従来の核酸化合物による治療に加えてウイルス複製過程の異なる点を標的にした治療薬が開発されればそれとの併用療法によるウイルスの排除が可能になると期待される。そこで本研究では HBV が標的細胞に感染する初期過程(ウイルスが細胞を認識して吸着し、細胞の中に入り込むまで)を明らかにして、その過程を阻止する新たな方策を探ることを目的とした研究を行う。

本研究はレポーター遺伝子を組み込んだ HBV ゲノムを作成し、それからウイルス粒子を作成して、簡便に HBV 感染をス

クリーニングすることができるようにすることで、探索効率を上げた。

B. 研究方法

(1) NanoLuc 遺伝子を組み込んだ HBV ゲノムの調製と改良。

HBV ゲノムから Core をコードする領域内の DR1, DR2 シス因子を保存し、残りの領域を NanoLuc 遺伝子と置き換えた組み換えウイルス粒子を産生させる。

(2) ルシフェラーゼ(NL)活性を指標にした HBV 感染の検証。ルシフェラーゼ活性が HBV 感染を反映するかについて、HBV 感染阻害剤等を用いて検証する。

(3) 蛍光発光遺伝子を組み込んだゲノムからウイルス産生を行い、感染効率や感染評価を行う細胞の選択をおこなう。

(4) siRNA ラブラリーを用いて、HBV 感染/複製を制御する宿主因子を探索する。

(5) HBV 感染を阻害する抗体探索をおこなう。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床検体、あるいは動物実験を含まない。

C. 研究結果

(1) NanoLuc 遺伝子を組み込んだ HBV ゲ

ノムの調製と改良。

HBVゲノムからCoreをコードする領域内のDR1, DR2 シス因子を保存し、残りの領域に NanoLuc(NL)遺伝子を挿入したゲノムを作成した。NL 遺伝子が 500 ヌクレオチドを超えるために、ゲノム全体の大きさが 3,700 ヌクレオチドを超過し、粒子産生に影響を与えると考えられたために、pol をコードする一部分の配列を欠失させて、ゲノムサイズを 3,400 ヌクレオチドの範囲に抑えた。それにより、組み換えウイルスの産生を野生型のウイルスにほぼ匹敵する効率で産生させる事が可能になった。しかし、pol 遺伝子を欠損させたために、感染細胞の中で HBVDNA の合成は起こらないために、HBV/NL により野生型 HBV の複製の全過程を反映させる事は出来ない。

(2) ルシフェラーゼ(NL)活性を指標にした HBV 感染の検証。ルシフェラーゼ活性が HBV の本来の感染を反映するかについて、HBV 感染阻害剤等を用いて検証した。HBV 複製を阻害するインターフェロン、逆転写酵素活性阻害剤のエンテカビル、中和抗体、ヘパリンなどによる感染阻害をレポーター活性で調べた。その結果、インターフェロン(100 IU/ml)で約 70%阻害、ヘパリンで 70%阻害、中和抗体で 80%阻害、エンテカビルで 30%の阻害が見られた。以上の実験は昨年度も行ったが、本年度は、これらの阻害剤存在条件下で、HBV RNA の量を測定した。その結果 HBV RNA 量は NL 活性と呼応している事が分かった。

(3) 蛍光発光遺伝子を組み込んだゲノムからウイルス産生を行い、感染効率や感染評価を行う細胞の選択をおこなった。径 10cm の培養器の細胞を用いて HBV/NL を調製したときに、96 well プレート 3-4 枚分の細胞に感染させて感染を評価できる事が分かった。また、NTCP を形質導入した HepG2 あるいは HuH7 を用いる事で、簡便に評価が可能になる事も分かった。

(4) siRNA ラブラリーを用いて、HBV 感染/複製を制御する宿主因子を探索した。Dharmacon 社から siRNA ラブラリーを購入した。このライブラリーは 18,000 遺伝子を標的にしているため、HBV の生活環を制御する遺伝子の多くが含まれると期待された。HepG2/NTCP を siRNA 処理し、それに HBV/NL を感染させた。感染 7 日目に細胞抽出液を調製し、NL 活性を測定した。NL 活性を 60%以下あるいは 200%以上にすることを一次評価結果とし、次に HuH7/NTCP を用いて二次評価をおこなった。同じ基準で得られたのをさらに PXB を用いて評価実験を行い、約 100 種類の遺伝子を得た。

(5) HBV 感染を阻害する抗体探索の準備を行った。

PXB 細胞を抗原としてマウスに免疫し、そのハイブリドーマを得た。これらの中から、ハイブリドーマのクローニングを行っている。

D. 考察

蛍光を発色する遺伝子 (NanoLuc) を内包する HBV 様粒子の産生を行った。培養上清を濃縮し、それを感染させた肝細胞において Luc 活性が観察されたことから、擬粒子が産生されそれが感染性を示す事が示された。本レポーターウイルスが HBV 本来の感染様式を示すことも、HBV 感染阻害剤を用いた実験で明らかになった。このレポーター系が HBVRNA 量を反映している事を明らかにした。粒子の集合や放出などの、生活環の後期過程は反映していないと考えられるが、この系を用いた HBV 感染初期過程を評価しつつ、その過程を阻害する薬剤の開発に寄与すると期待される。

この系を用いて、siRNA ラブラリーを用いた宿主因子の探索を行った。その前に、本評価系が siRNA ラブラリー評価に有効に使えるか否かを、HBV 複製に重要な遺伝子である事が既に明らかになった遺伝子 (HNF4a, NTCP) をもちいて検証を行っ

た。何れの遺伝子の mRNA を siRNA で抑制した後に HBV/NL を感染させると NL 活性が低下する事が確認できたので、ライブラリー評価が可能である事を確認した。数次に亘る評価実験を行い、HBV 複製を制御する約 100 種類の宿主遺伝子を明らかにした。これらの遺伝子が実際に HBV 感染複製に作用しているか否かについて現在解析中である。

E. 結論

蛍光を発色する遺伝子 (NanoLuc) を内包する HBV 様粒子の産生を行った。HepG2/NTCP, HuH7/NTCP を用いて感染実験を行い 96 well 規模での感染評価の実験条件を整えた。

上の評価条件下において、siRNA ライブラリーを用いた宿主因子の探索を行い、HBV 複製に重要と思われる宿主因子を明らかにした。これまでに開発した HBV 感染複製評価系が、抗 HBV 剤の開発に有効である事が示せた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Arimoto KI, Hishiki T, Kiyonari H, Abe T, Cheng C, Yan M, Fan JB, Futakuchi M, Tsuda H, Murakami Y, Suzuki H, Zhang DE, Shimotohno K. Murine Herc6 Plays a Critical Role in Protein ISGylation In Vivo and Has an ISGylation-Independent Function in Seminal Vesicles. *J Interferon Cytokine Res.* 2014 Nov 19. [Epub ahead of print]
2. Shimizu Y, Nishitsuji H, Marusawa H, Ujino S, Takaku H, Shimotohno K. The RNA-editing enzyme APOBEC1 requires heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q isoform 6 for efficient interaction with

interleukin-8 mRNA. *J Biol Chem.* 289(38): 26226-26238, 2014

3. Nakai M, Seya T, Matsumoto M, Shimotohno K, Sakamoto N, Aly HH. The J6JFH1 Strain of Hepatitis C Virus Infects Human B-Cells with Low Replication Efficacy. *Viral Immunol.* 2014 May 22.
4. Tsugawa Y, Kato H, Fujita T, Shimotohno K, Hijikata M. Critical role of interferon- α constitutively produced in human hepatocytes in response to RNA virus infection. *PLoS One.* 2014 Feb 26;9(2):e89869.

2. 学会発表

1. 西辻 裕紀、清水 裕子、宇治野 真之、原田 圭輔、椎名 律子、山本 祐美、杉山 真也、溝上 雅史、下遠野 邦忠・HBV 複製に関する宿主因子の探索・第 62 回日本ウイルス学会学術集会・パシフィコ横浜会議センター・平成 26 年 11 月 10-12 日
2. 清水 裕子、西辻 裕紀、宇治野 真之、原田 圭輔、椎名 律子、山本 祐美、杉山 真也、溝上 雅史、下遠野 邦忠・レポーター遺伝子を用いた HBV 感染評価系の構築・第 62 回日本ウイルス学会学術集会・パシフィコ横浜会議センター・平成 26 年 11 月 10-12 日

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

研究要旨：本研究では、SLC10A1と同様に感染受容体としての機能をもつ受容体の探索と同定を行うことを目的とする。前年までに作成した蛍光遺伝子を有するHBV粒子と患者血清由来の感染源を用いることで、初代培養肝細胞への感染を行った。感染が一定レベルに達した後に細胞を分離して、1細胞解析へ供した。そこで得られた96個の細胞を個々にタグ付けして、高速シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を実施した。データ解析では、アルブミン発現とHNF3遺伝子発現のある肝細胞であること、HBV遺伝子発現の有無、SLC10A1発現の有無で層別化した。今回の解析では、肝細胞、SLC10A1の発現の全てがあるものを抽出し、HBV発現の有無で二群化して遺伝子発現の差を解析した。その結果、感染受容体の候補探索では、4つの膜タンパクが得られた。これらが感染に関与しているか検討するために、CRISPRで細胞株をノックアウトすることとして、配列の設計と投与を行いクローン細胞の樹立を進めた。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルスの感染受容体は長い間不明のままであった。その中で、Yanら (Yan et al. eLife 2012) によってSLC10A1分子がその候補であることが報告され、追試によってそれが感染受容体の一つであることが確認された。一方で、SLC10A1が発現していながらも感染が成立しない細胞もあり、他にも重要な分子が存在することが示唆されている。感染が効率的で取り扱い易い実験系の確立は薬剤スクリーニングなどで有用であり、優先的に解明すべき事項である。昨年度までに、蛍光分子を用いたHBV粒子の作製を終えたため、それらを用いて感染感受性細胞と非感受性細胞の分離を行うことを目的とした。さらに、RNA-seqによる遺伝子発現解析を実施し、細胞間の遺伝子発現の違いを定量化した。

B. 研究方法

初代培養肝細胞を用いて、感染実験によるアッセイを実施した。感染源としては、

患者血清とプラスミド由来のウイルス粒子を利用した。プラスミド由来の粒子としては、昨年までに作成した蛍光遺伝子を有する改変ウイルスを利用した。

感染後に、HBs抗原をモニターすることで感染の成立を確認した。HBs抗原がプラトーに達したのちに、細胞を分離して1細胞解析装置で細胞の分離を行った。そこからRNAを取り出した後に、サンプルの処理を行い、HiSeq2500によってRNA-seq解析を実施した。データ解析では、SLC10A1発現があり、アルブミン、HNF3Aの発現がある細胞を肝細胞として抽出した。その中で、さらにHBV感染の有無で層別化し、その間での細胞の遺伝子発現の差を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用する細胞は、いずれもインフォームドコンセントのもとに倫理審査を得て採取され、市販されているヒト肝細胞であるため、倫理的な問題点はない。

培養細胞に関しては、所内のバイオセーフティ委員会の承認を得て、実験を実施した。

C. 研究結果

初代培養肝細胞へ蛍光ウイルスと患者血清由来のHBV感染血清を投与した。約2週間後にHBs抗原がプラトーに達した。

そこから細胞の分離を行い、クオリティーチェックの後に、RNA-seqによるトランスクリプトーム解析を実施した。その解析の結果から、感染実験を行っていても、全ての肝細胞にウイルスが感染していないことが明らかとなった。

また、SLC10A1遺伝子の発現が確認できるものでも感染が成立していないものが多数あることがわかった(図1)。

SLC10A1の発現量は、細胞間で大きな差はなく、感染を規定する因子としては、SLC10A1以外にも存在していることが推察された。

HBV感染のあった肝細胞とHBV非感染の肝細胞の遺伝子発現データを解析すると、4つの膜タンパク(遺伝子)の発現量が大きく異なっていることが明らかとなった。それらの遺伝子をノックアウトした細胞をCRISPRで作成することとして、遺伝子改変の準備を進めた。

D. 考察

SLC10A1以外にも感染を規定する因子があることが推察された。それらの候補として、今回のトランスクリプトーム解析から4つの膜タンパク(遺伝子)を抽出した。これらのノックアウト細胞を作成することで、SLC10A1と同様に感染に関わる遺伝子であるか否かを検討し、新しい受容体の候補を調べる必要がある。

E. 結論

SLC10A1の発現は感染には必要であるが、それ以外にも受容体因子の存在が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T,

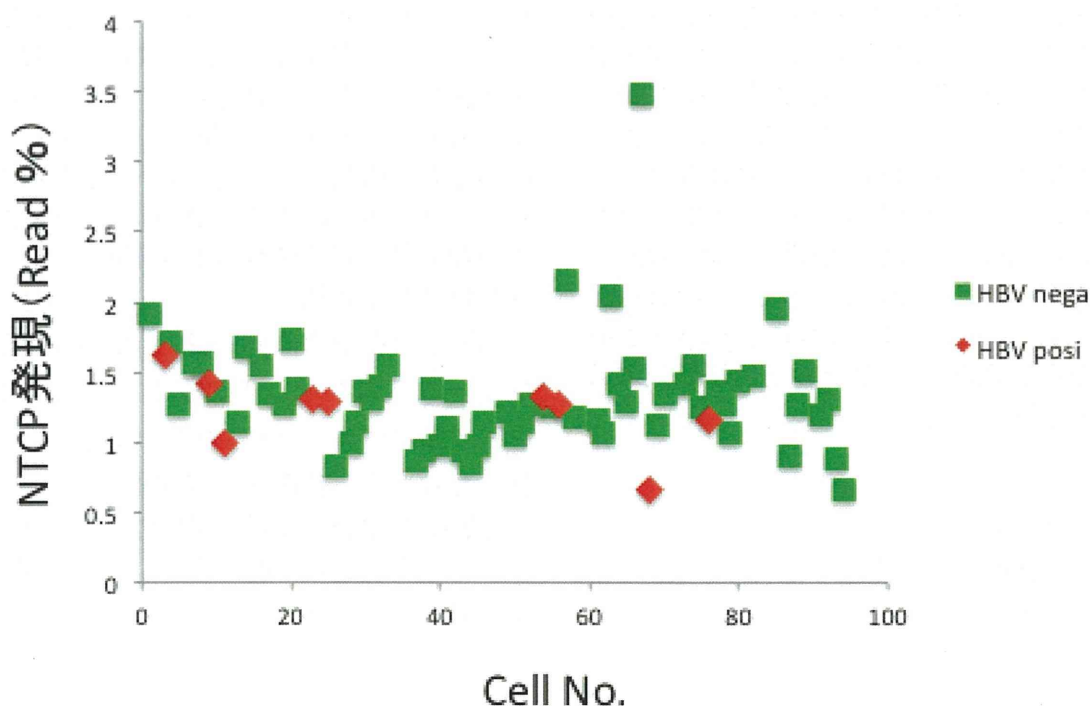


図1: NTCP (SLC10A1) 遺伝子の発現量と HBV 感染の有無
HBV 感染細胞を赤、非感染を緑とした。