

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業(B型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書(平成26年度)

B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

分担研究者：土方 誠 京都大学ウイルス研究所 准教授
研究協力者：金 ソルイ 京都大学ウイルス研究所 非常勤研究員
研究協力者：赤堀 祐一 京都大学大学院生命科学研究科 大学院生

分担研究課題：培養肝細胞によるHBVの高効率感染増殖実験系の開発とこれを用いた新規抗HBV薬剤の評価および開発

研究要旨：本年度は培養条件が安価、簡便であり、安定しているヒト不死化肝細胞、HuS-E/2細胞を主に用いて、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染増殖を高効率で再現することが可能な非癌培養細胞システムの構築を進めた。この細胞に1.24倍長のHBVゲノムを含むプラスミドを導入し、メビオールゲルを用いて立体培養すると、プラスミド導入後7日以降に、HBVゲノム複製依存的にゲル上に重層した培養液中にHBV DNAが検出された。従って、この系は非癌細胞を用いた抗HCV薬のスクリーニングや評価が可能である新しい培養細胞系になると考えられた。さらに、HuS-E/2細胞にtGFPを融合させたHBV受容体分子NTCPを発現させた培養細胞を樹立した。この細胞は組換え体HBV感染感受性を有するため、HBV持続感染系の構築に有用であると考えられた。また、HBV感染性粒子を持続的に産生するHepG2.2.15.7細胞と薬剤ライブラリーを用いて、抗HBV効果を示す宿主因子に対する薬剤のスクリーニングをおこなった。その結果、細胞毒性を示さずにHBV感染性粒子産生を阻害する数種類の薬剤を見出した。そのうちの一つは脂肪酸合成酵素阻害薬であり、これまでのところ、感染性粒子の細胞外への放出を抑制する効果を示すことが示され、宿主因子を標的とした新たな抗HBV薬の候補と考えられた。

A. 研究目的

我々がこれまで独自に樹立したヒト不死化肝細胞 HuS-E/2 細胞やヒト肝幹細胞様細胞 HMY1 細胞を用いて、種々の遺伝子型や株の B 型肝炎ウイルス(HBV)の生活環を簡便に効率良く再現する新たな非癌細胞を用いた HBV 培養系構築を目的とした。このような HBV 培養系を利用することで、HBV 感染増殖に関わる細胞側因子の詳細を明らかにし、これを効果的に抑制する薬剤を抗 HBV 薬候補として同定し、また HBV 薬評価することを第二の目的とした。

また、HBV の持続感染を再現することで、HBV の発癌機構の解析とその知見を基盤とした発癌抑制薬の開発を第三の目的とした。

B. 研究方法

1) 前年度において HuS-E/2 細胞において HBV 遺伝子の転写が確認されたため、この細胞に 1.24 倍長の各遺伝子型の HBV ゲノムを含むプラスミドを導入し、通常の平面培養法を用いて 2 日間培養し、培養上

清を回収した。その後、この細胞をマルチウェルプレートに継代し、さらに10日間培養した。継代培養後、経時的にそれぞれ培養上清を回収した。回収した培養上清からDNAを回収し、定量PCRによって、HBV DNAのコピー数を測定した。また、同様の実験を行い、細胞内のHBV pgRNAの産生を測定した。

2) 1)同様のプラスミドを導入したHuS-E/2細胞をメビオールゲル中に移し、立体培養した。ゲル上に重層した培養液を、経時的に回収し、ヌクレアーゼ処理後、そこからDNA抽出した。定量PCRによって、HBV DNAコピー数を測定した。また、複製に依存したHBV DNA放出量を推定するため、立体培養時にHBVゲノム複製阻害剤であるエンテカビル(37 nM)を含む培地をゲルに重層させ、2日間処理をおこなった。

3) hNTCP-tGFP (tGFPを融合させたhNTCP (HBV受容体分子)発現プラスミド)をHuS-E/2細胞にトランスフェクションし、G418でセレクトションすることでhNTCP-tGFPを恒常的に発現しているHuS-E/2細胞(HuS-E/2-hNTCP-tGFP細胞)を樹立した。

4) HuS-E/2-hNTCP-tGFP細胞に、HepG2.2.15.7細胞の培養上清由来の組換え体HBVあるいはHBV感染ヒト肝細胞キメラマウス血清中のHBVを感染させた。感染後、経時的に細胞を回収した。回収した細胞からHBV RNAを単離し、定量RT-PCRによって、HBV RNAのコピー数を測定した。NTCP依存的なHBV感染を解析するために、野性型HBV preS合成ペプチドと変

異型ペプチドを感染実験時に培地に添加した。

5) HepG2.2.15.7細胞の培地に薬剤ライブラリーの薬剤を各1 microMの濃度で添加し、3日後の培養液中のDNAを回収した。このDNAを鋳型に用いた定量PCRによって、HBV DNAのコピー数を測定した。

加えた薬剤の代わりにDMSOを加えて得た結果を対照として用いて、HBV DNAを低下させる薬剤を選択し、その作用機序の解析を行った。

C. 研究結果

1) 前年度HBVゲノムを挿入したプラスミドをHuS-E/2細胞にトランスフェクションし、その培養上清にHBV DNAの産生を確認した。今年度はHBVゲノムからの転写の維持が可能であるか否かについて検討した。その結果、遺伝子型AからDまでの4種の遺伝子型について検討したが、それぞれのゲノムからの転写はトランスフェクション後、次第に低下していき、長期間維持される事はなかった。

2) 1)と同様にHuS-E/2細胞にHBVゲノムを挿入したプラスミドを導入した後、メビオールゲルを用いて立体培養して、その重層培地中のHBV DNA量の計測をおこなった。遺伝子型によって検出パターンは異なるものの、立体培養下5日前後までは重層培地中HBV DNA量は低下するものの、7日以降はその量が上昇するパターンが観察された。

3) 2)においてメビオールゲル中で立体培養されたHuS-E/2細胞からゲル上の重層培地

中に放出されたとと思われる HBV DNA 量は、重層培地中にエンテカビルを加えることで著しく低下した。

4) HuS-E/2 細胞に hNTCP-tGFP を恒常的に発現させた細胞をクローニングし、hNTCP-tGFP の発現が確認された 8 株をクローニングした。これらの HuS-E/2hNTCPtGFP 細胞株に HepG2.2.15.7 細胞培養上清中の組換え体 HBV あるいは HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウス由来の血清を用いた感染実験をおこない、HBV の感染に阻害的に働くヘパリン共存下、非共存下において感染後の細胞内 HBV pgRNA 産生の経過観察を行った。その結果、すべての細胞株において、ヘパリン非共存下においてのみ、感染 1 日目から pgRNA を検出した。しかしながら、この pgRNA 量は感染後 3 日では、急速に低下し、それ以降維持される事はなかった。

5) 3)、4)で得られた結果から、培養条件を変える事により、HuS-E/2 細胞中の HBV ゲノム複製が維持されることが考えられた。そこでまずは各 HuS-E/2hNTCP-tGFP 細胞株を肝細胞由来培養細胞の肝分化を誘導する効果を持つことが知られる DMSO を 3% になるように加えた培地を用いて培養し、上記同様の実験を行った。その結果、HuS-E/2hNTCPtGFP 細胞株 222 において感染後 7 日まで pgRNA の発現が維持された。

6) 組換え体 HBV を恒常的に産生している HepG2.2.15.7 細胞を用いて薬剤ライブラリーのスクリーニングを行った。この細胞の培養液中に 1 microM の濃度で各種薬剤を添加し、3 日間培養した後、その培地に

存在する HBV DNA 量を定量し、有意に低下する薬剤を選択した。3 種類の薬剤を候補薬剤として選択したが、そのうちの 2 つは脂肪酸生合成系であるマロニル CoA 経路に存在するアシル CoA カルボキシダーゼ(ACC)と脂肪酸合成酵素(FASN)に対する阻害薬であった。そこで、各酵素に対する他の異なる薬剤をいくつか用いて、同様の実験をおこなったところ、同様に培地中の HBV DNA 量の産生抑制効果を認めた。

この FASN 阻害剤による抑制効果は用量依存的であることがわかった。しかしながら、FASN で合成された長鎖飽和脂肪酸の不飽和化に機能し、近年 HCV のゲノム複製に関与する事が報告されたステアリル CoA 不飽和化酵素(SCD)に阻害剤については、むしろ、培養上清中の HBV DNA 量を増加させる効果を示した。したがって、HBV に関しては HCV の場合とは異なり、長鎖不飽和脂肪酸は、そのゲノム複製に利用されていないことがわかった。FASN 阻害薬を用いて HepG2.2.15.7 細胞を処理し、抗 HBs 抗体を用いた蛍光抗体法による観察を行ったところ、FASN 阻害剤処理により、細胞内への HBs 抗原の蓄積が観察された。

D. 考察

1) 前年度、HBV ゲノムを含むプラスミドを一過性に導入した HuS-E/2 細胞から HBV DNA が培養上清中に産生する結果が得られていた。しかしながら、平面培養した HuS-E/2 細胞では HBV pgRNA の産生は維持されないという本年度の結果からそれはプラスミド由来の DNA の検出であった可能性が考えられた。メビオールゲルを用

いた立体培養下においては、一過性に HBV ゲノム plasmid を導入した場合に1週間以上に渡り、重層培地中にヌクレアーゼ抵抗性の HBV DNA が検出された。この重層培地中の HBV DNA 産生は、HBV ゲノム複製阻害剤エンテカビルを重層培地に添加することで有意に低下することから、HBV ゲノム複製に依存していることがわかった。つまり、立体培養したこの細胞では、一週間以上にわたり、HBV ゲノムが複製し、粒子産生を行っていることが考えられた。またゲルの重層培地に薬剤を添加することで非癌肝細胞を用いた抗 HBV 薬剤のスクリーニングやその評価をおこなうことが可能であると考えられた。

2) HBV 受容体 NTCP 発現 HuS-E/2 細胞を樹立し、組換え体 HBV やヒト肝細胞キメラマウス血清由来 HBV を用いた感染実験をおこなったが、平面培養では HBV ゲノム複製は認められなかった。細胞株によって、HBV pgRNA が長期培養後に認められるものもあり、また 3%DMSO を培地に加えて培養する事で HBV pgRNA 量が経時的に上昇したことから、特定の細胞株を特定の条件下で培養することで HBV の感染増殖を再現する培養系が構築できる可能性が考えられた。上記のように立体培養によって、HuS-E/2 細胞においても HBV ゲノム複製の維持が可能になることが示唆されていることから、次年度においては、NTCP 発現 HuS-E/2 細胞を立体培養することで HBV の生活環の再現を試みる必要があると考えられた。

3) 宿主因子を標的とした抗 HBV 薬剤のスクリーニングから、その候補としてマロニル CoA 経路の酵素が見出された。長鎖飽和脂肪酸の生合成に関与する FASN の阻害は培養上清中の HBV DNA 量の低下を引き起

こし、HBs 抗原の細胞内蓄積を誘導したことから、長鎖飽和脂肪酸合成は HBV 粒子の細胞外放出に機能することが考えられた。HCV のゲノム複製にこのマロニル CoA 経路が関与することが知られている。近年、マロニル CoA 経路によって産生された長鎖飽和脂肪酸を不飽和化し、長鎖一価不飽和脂肪酸を産生する SCD1 が HCV ゲノム複製複合体の形成に機能することが報告されている。しかしながら、HBV に関しては、SCD1 阻害剤はかえって細胞外への HBV 粒子の産生量を増加させることになった。この結果から、ACC1 や FASN に対する阻害薬は HBV と HCV の双方に効果を示すことが考えられ、両ウイルスの共感染患者に対する治療薬のひとつとして使用可能であるが、SCD1 阻害薬は共感染患者の治療には使用が難しいものと考えられた。今後、FASN 阻害薬が実際に抗 HBV 薬としてどの程度の効率で効果を有するのかについて動物モデル等を用いた検証する必要があると考えられた。また、同様の方法を用いて、異なる抗 HBV 効果を示す他の薬剤を同定することが必要であると考えられた。

E. 結論

HuS-E/2 細胞は立体培養することで HBV ゲノム複製や粒子産生が可能であり、非癌細胞を用いた HBV ゲノム複製や粒子産生機構の解析に用いる事が可能である事がわかった。同時に進めていた抗 HBV 薬剤のスクリーニングにより、いくつかの候補薬剤が得られ、宿主因子を標的とした新たな抗 HBV 薬剤の同定が可能になると期待された。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1) Akahori Y., Kato H., Fujita T., K. Watashi K., Wakita, Hijikata M. : Development of hepatitis B virus cell culture system using immortalized human hepatocytes producing exogenous Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide. 2014 International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, Los Angels, USA Sept. 4-6, 2014

2) 赤堀祐一、加藤博己、藤田尚志、渡士幸一、脇田隆宇、土方 誠：ヒト NTCP 恒常発現不死化ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス培養細胞感染系の構築、第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜 2014 年 11 月 10-12 日

3) 岡村 瞳、赤堀祐一、田中靖人、土方 誠：不死化ヒト肝細胞を用いた HBV 培養細胞系の構築、第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜 2014 年 11 月 10-12 日

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特許申請

土方 誠、阿部雄一、山口達哉、内胚葉性幹細胞の製造方法、特願 2014-121780 号、登録日：平成 26 年 6 月 12 日

B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

分担研究者：渡士 幸一 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

分担研究課題：HBV 感染阻害剤の同定および作用機序の解析

研究要旨:HBV感染許容性細胞株HepG2-hNTCP-C4細胞を用いて新たなHBV感染阻害化合物を同定した。スクリーニングの結果、proanthocyanidin (PAC)が用量依存的にHBV感染を阻害することが明らかとなった。PACはHBV複製にはほとんど影響することなく、HBVの宿主細胞への吸着を有意に低下させた。HBV吸着にはLHBsタンパク質内preS1領域が関与するが、PACはこの領域からなるペプチドの細胞への吸着も阻害した。またPACは宿主細胞ではなく、むしろHBV粒子を標的として、HBVの細胞への感染を阻害することが示唆された。この結果と一致して、PACはHBV受容体であるNTCPのトランスポーター活性にはほとんど影響を与えなかった。以上のように本研究では、新たなHBV感染阻害剤としてPACを同定し、その作用機序の解析をおこなった。

A. 研究目的

現在抗HBV治療薬としては核酸アナログとインターフェロン類が主に存在し、HBV感染予防に用いられるものとしてHBVワクチンやHBsヒト免疫グロブリンが挙げられる。本研究では新たな抗HBV治療を提案するために、これらとは異なった作用点を有する低分子化合物を同定し、またその抗HBV作用機序を明らかにすること、これによりさらに有効な抗HBV化合物を開発することを目的とした。

B. 研究方法

(1) HBV感染阻害剤の同定

HBV感染阻害化合物のスクリーニングには、HBV感染許容性細胞株HepG2-hNTCP-C4細胞に各化合物を24時間前処理、さらにHBVと化合物を16時間処理し、これらを洗浄した後に化合物を含まない培地で12日

間培養し、培養上清中HBs抗原をELISAで定量することによりおこなった。

(2) PACの抗HBV効果

細胞内HBVDNA, cccDNAはリアルタイムPCRで、HBc抗原は免疫蛍光法で測定した。

(3) PACによるHBV吸着阻害

HBV複製を再現するHep38.7-Tet細胞をテトラサイクリン非存在下で化合物を6日間処理し、細胞内HBVDNAを定量することにより、化合物のHBV複製に与える影響を調べた。また化合物のHBV吸着への影響は、HepG2-hNTCP-C4細胞に化合物およびHBVを4度で1時間処理することによりHBVを細胞に吸着させ、細胞表面HBVDNAをリアルタイムPCRで定量することにより評価した。

(4) PACによるpreS1結合阻害

preS1と宿主細胞の吸着はpreS1 binding assayにより評価した。化合物存在下で

TAMRA 標識 preS1 (2-48aa) ペプチドを HepG2-hNTCP-C4 細胞に 30 分処理し、パラホルムアルデヒド固定、DAPI 染色の後、蛍光顕微鏡で細胞に吸着した TAMRA 標識 preS1 ペプチドを観察した。

(5) HBV 粒子を標的とした PAC の抗 HBV 作用

PAC の宿主細胞への作用を検討するために、PAC を 2 時間前処理した HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いて、上記と同様に HBV 感染をおこなった。一方 HBV 粒子への PAC 処理効果を検証するために、HBV を PAC で 30 分前処理し、これを PBS で 2 回限外濾過することで化合物を除き、これを HepG2-hNTCP-C4 細胞へ感染させた。また NTCP のトランスポーター活性は、化合物を 15 分前処理した HepG2-hNTCP-C4 細胞に [^3H]-タウロコール酸を 37 度 10 分取り込ませ、細胞を洗浄、溶解後、細胞内 [^3H] 活性を液体シンチレーションカウンターで測定することにより評価した。

C. 研究結果

(1) HBV 感染阻害剤の同定

HBV 感染許容性細胞株 HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いて HBV 感染阻害化合物のスクリーニングをおこなった。その結果 proanthocyanidin (PAC) を処理することにより HBV 感染後の HBs 抗原を低下させることが明らかとなった。

(2) PAC の抗 HBV 効果

PAC を処理することにより、HBs 抗原だけでなく、細胞内 HBV DNA, cccDNA, HBc 抗原を低下させることが示された。また初代ヒト肝細胞においても同様の結果を得た。以

上より PAC は HBV 感染を阻害することが示唆された。

(3) PAC による HBV 吸着阻害

PAC が HBV 生活環中のどの過程を阻害するかを調べた。まず HBV 吸着・侵入することなく HBV 複製を再現する Hep38.7-Tet 細胞を用いた検討により、PAC 処理はこの細胞中 HBV DNA 量に大きな影響を与えなかった。一方 HepG2-hNTCP-C4 細胞に HBV を 4 度で処理することにより HBV 吸着のみを評価したところ、PAC は細胞表面に吸着した HBV DNA 量を有意に減少させることが示された。以上より PAC は HBV 生活環中初期過程の HBV の細胞への吸着を阻害すると示唆された。

(4) PAC による preS1 結合阻害

HBV の細胞表面への吸着には、HBV 粒子と細胞表面のヘパラン硫酸の低親和性結合、およびそれにひき続く HBV LHBs 内 preS1 領域と細胞表面のレセプター NTCP の特異的結合が関与する。そこで PAC の preS1-NTCP 結合に与える影響を preS1 binding assays で調べたところ、PAC は用量依存的に蛍光 preS1 ペプチドの宿主細胞への吸着を阻害することが示された。これにより PAC は preS1 依存的な HBV 吸着を阻害することが示唆された。

(5) HBV 粒子を標的とした PAC の抗 HBV 作用

PAC は宿主細胞に作用するのか、あるいは HBV 粒子を標的として HBV 感染を阻害するのかを検討した。その結果、PAC を前処理した HepG2-hNTCP-C4 細胞では HBV 感染は未処理と同程度に観察されたが、PAC 前処

理した HBV は感染性が有意に低下していた。これにより PAC は HBV 粒子に作用して HBV 感染を低下させることが示唆された。

また NTCP の胆汁酸取り込み活性をトランスポーターアッセイで調べたところ、これまで報告されている既存の HBV 侵入阻害剤である preS1 ペプチドやシクロスポリンは胆汁酸取り込み活性を顕著に低下させたが、PAC はほとんど影響を与えなかった。これは PAC が宿主には影響を与えないことを支持している。

D. 考察

以上のことより、PAC は HBV の HepG2-hNTCP-C4 細胞および初代ヒト肝細胞への感染を阻害することが明らかとなった。PAC は HBV 生活環の最初期過程である HBV の宿主細胞への吸着を阻害するが、それは HBV 粒子上 LHBs タンパク質の preS1 領域を介した細胞への吸着の阻害によるものであることが示唆された。また PAC は HBV 粒子へ作用し、その感染能を低下させた。

E. 結論

これまで HBV 吸着・侵入を阻害するものとしては HBs ヒト免疫グロブリンが存在し、また preS1 ペプチドが臨床試験中であるが、この過程を阻害することで抗 HBV 作用が確認されている低分子化合物は存在しない。本研究で同定した PAC は新たな抗 HBV 剤開発に貢献できると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato

Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A.: The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus. **Immunity** (in press)

2) Watashi K*, Wakita T.: HBV/HDV entry, species specificity and tissue tropism. **Hepatitis B and Delta Virus (Cold Spring Harbor Laboratory Press)** (in press) (* corresponding author)

3) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C.: Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. **Am J Pathol** (in press)

4) 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 NTCP Expression. **J Biol Chem** (in press) (* corresponding author)

5) Ogura N, Watashi K, Noguchi T, Wakita T.: Formation of covalently closed circular DNA in Hep38.7-Tet cells, a tetracycline inducible hepatitis B virus expression cell line. **Biochem Biophys Res Commun** 452: 315-321 (2014)

6) Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T.: Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. **J Gen Virol** 95 (Pt 12): 2658-2667 (2014)

- 7) Daito T, Watashi K*, Sluder A, Ohashi H, Nakajima S, Borroto-Esoda K, Fujita T, Wakita T.: Cyclophilin inhibitors reduce phosphorylation of RNA-dependent protein kinase to restore expression of IFN-stimulated genes in HCV-infected cells. **Gastroenterology** 147: 463-472 (2014)
(* corresponding author)
- 8) 渡士幸一。肝炎の基礎 HBV 感染生活環と培養系。肝疾患 review 2014-2015、20-26 (2014)
- 9) 渡士幸一。B 型肝炎ウイルス感染を抑制するサイトカインの同定とその分子メカニズムの解析。Liver Forum in Kyoto 第 16 回学術集会記録集、13-17 (2014)
- 10) 渡士幸一。第 6 章 抗ウイルス薬。生命科学のためのウイルス学、143-176 (2015)
2. 学会発表
- 1) K. Watashi. Anti-HBV Approach by Interfering the Interaction between HBV large surface protein and NTCP. **2nd Japan-Taiwan Research Symposium on Hepatitis B virus**, Taipei (Taiwan), April, 2014
- 2) Watashi K, Iwamoto M, Sluder A, Matsunaga S, Ryo A, Morishita R, Kwon ATJ, Suzuki H, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Characterization of a culture system reproducing the NTCP-mediated HBV entry and its application to drug development. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 3) Iwamoto M, Watashi K, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Koiwai O, Wakita T. Microtubule-dependent hepatitis B virus (HBV) replication revealed by chemical screening on an efficient HBV-replicating cell line. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 4) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to HBV infection by modulating NTCP expression. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 5) Matsunaga S, Miyakawa K, Watashi K, Wakita T, Ryo A. Wheat germ cell-free system-based production of hepatitis B virus X (HBx) protein for generation and characterization of monoclonal antibody. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 6) Fukasawa M, Shimizu Y, Shirasago Y, Iwamoto M, Watashi K, Tanaka Y, Wakita T, Kondoh M, Yagi K, Hanada K. Efficient HBV infection system in cell cultured cells. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses**, Los Angeles (USA), Sep, 2014
- 7) Akahori Y, Kato H, Fujita T, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Development of hepatitis B virus cell culture system using immortalized human hepatocytes producing exogenous Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide. **2014 International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B**

Viruses, Los Angeles (USA), Sep, 2014

- 8) 渡士幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字。B型肝炎ウイルス(HBV) Lタンパク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
- 9) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字。HBV 感染受容体 NTCP の発現調節機構の解析およびこれを阻害する低分子化合物の抗 HBV 効果。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
- 10) 外山政明、濱崎隆之、岡本実佳、渡士幸一、脇田隆字、馬場昌範。HBV カプシドタンパク質を標的とした新規抗 HBV 薬の探索。第 24 回抗ウイルス療法研究会総会、富士急、2014 年 5 月
- 11) 中嶋翔、渡士幸一。ウイルス感染培養系を基盤とした天然化合物の生理活性同定。天然物ケミカルバイオロジー 分子標的と活性制御 第 6 回公開シンポジウム、名古屋、2014 年 5 月
- 12) 渡士幸一、相崎英樹、脇田隆字。培養系を用いた抗 B 型肝炎ウイルス化合物の同定と作用機序解析。第 50 回日本肝臓学会総会、東京、2014 年 5 月
- 13) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、Hussein Aly、藤本陽、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字、深澤征義、小祝修、楠原洋之。ヒト NTCP 安定発現による B 型肝炎ウイルス(HBV) 感染許容性の獲得とそれを用いた HBV 侵入機構の解析。第 22 回肝病態生理研究会、東京、2014 年 5 月
- 14) 渡士幸一。肝炎ウイルス生活環を標的とした抗ウイルス剤探索と分子基盤解明。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、札幌、2014 年 7 月
- 15) 渡士幸一。低分子化合物を通して理解する肝炎ウイルス生活環。ウイルス学キャンプ in 湯河原、湯河原、2014 年 9 月
- 16) 渡士幸一。宿主細胞における肝炎ウイルス感染増殖機構とこれを標的とした創薬。第 87 回日本生化学会大会、京都、2014 年 10 月
- 17) 渡士幸一、Ann Sluder、松永智子、梁明秀、森下了、岩本将士、九十田千子、鈴木亮介、相崎英樹、Katyna Borroto-Esoda、田中靖人、楠原洋之、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字。B 型肝炎ウイルス(HBV) large S タンパク質と NTCP の相互作用阻害による抗 HBV 戦略。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 18) 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、杉山真也、田中靖人、溝上雅史、脇田隆字。レチノイド阻害剤は NTCP 発現修飾を介して宿主細胞の B 型肝炎ウイルス感染感受性を消失させる。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 19) 岩本将士、渡士幸一、杉山真也、鈴木亮介、相崎英樹、田中靖人、溝上雅史、大谷直子、小祝修、脇田隆字。効率的な B 型肝炎ウイルス(HBV) 複製評価系を用いた微小管依存的な HBV 複製機構の解析。第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 年 11 月
- 20) Hussein Aly、渡士幸一、茶山一彰、脇田隆字。The identification of a new interferon-independent host

- mechanism suppressing hepatitis B virus replication. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 21) 松田麻未、鈴木亮介、嵯峨涼平、藤本陽、渡士幸一、相崎英樹、森石恆司、岡本徹、松浦善治、黒田俊一、脇田隆字。遺伝子組換え酵母由来B型肝炎ウイルス様粒子の細胞表面への結合に関する宿主因子の解析。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 22) 宮川敬、松永智子、渡士幸一、杉山真也、溝上雅史、脇田隆字、梁明秀。宿主防御因子 Tetherin-BST2 による B 型肝炎ウイルス感染抑制とその回避機構の解明。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 23) 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、横浜、2014年11月
- 24) 山本達郎、櫻井文教、高山和雄、立花雅史、渡士幸一、脇田隆字、飯島沙幸、田中靖人、水口裕之。ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス感染評価系の開発。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 25) 赤堀祐一、加藤博己、藤田尚志、渡士幸一、脇田隆字、土方誠。ヒト NTCP 恒常発現不死化ヒト肝細胞を用いた B 型肝炎ウイルス培養細胞感染系の構築。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 26) 深澤征義、清水芳実、白砂圭崇、岩本将士、渡士幸一、田中靖人、脇田隆字、近藤昌夫、八木清仁、花田賢太郎。効率的な HBV 感染培養細胞系の構築に関する研究。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月
- 27) 安本順、葛西宏威、土橋香織、山下篤哉、渡士幸一、脇田隆字、田中智久、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、横浜、2014年11月
- 28) 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、横浜、2014年11月
- 29) 外山政明、濱崎隆之、岡本実佳、渡士幸一、脇田隆字、馬場昌範。新規 7-deazaneplanocin A 及び 7-deaza-8-azaneplanocin A 誘導体の抗 HBV 効果。第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
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(B型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書(平成26年度)

B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究

分担研究者：濱田 剛 長崎大学 先端計算研究センター 准教授
研究協力者：田中 義正 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 准教授

分担研究課題：GPGPU型スーパーコンピューターを用いたB型肝炎に対する理論計算創薬

研究要旨：B型肝炎ウイルスの感染機構において、ホスト側のアミノアルコールリン酸エステル化酵素(AAK)が重要な役割を果たしている。本研究課題においては、AAKのX線結晶解析構造を元に、AAK阻害剤のリードホッピングを行い、新規AAK阻害剤を見出すことにより、B型肝炎治療薬の開発を行う。平成26年度は、東京大学ライブラリー、市販化合物ライブラリー、長崎大学ライブラリーからそれぞれ4,000万、200万化合物、20万コンフォメーションライブラリーを発生させ、それらの一つ一つを、AAK活性部位にドッキングさせた。この際、長崎大学で独自に開発したGPGPU型スーパーコンピューターDEGIMA-2を用いた。そして、エネルギー計算の結果に基づき、上位500コンフォメーションに関して化合物抽出を行った。一方、AAK活性測定のために、ADP定量法を導入し、ウェットスクリーニングのためのアッセイ法を確立した。次年度においては、リードホッピングにより得られたAAK阻害剤に関して、合成最適化を行い、B型肝炎治療薬開発のための前臨床試験を目指した研究を行う。

A. 研究目的

B型肝炎は、20歳代から65歳までの罹患率が平均しており、典型的なSTDの感染パターンを示す。これは、65歳以上の罹患率が55%であるC型肝炎と大きく異なる。また、B型肝炎に起因する肝臓がんに関しては、1970年代から2000年代において、ほぼ増減がなく、本邦に蔓延するSTDとなっている。

現在、B型肝炎治療薬として用いられているLVD、ADV、ETVはウイルス由来の逆転写酵素阻害剤であるが、1~3アミノ酸残基の変異により耐性が獲得されることから、新しいメカニズムに基づく治療薬の開発が急務となっている。一つの方法として、ホ

スト側のウイルス複製に関与する酵素の阻害剤の開発が検討されている。本研究課題においては、ホスト由来のアミノアルコールリン酸エステル化酵素AAK阻害剤を開発することにより、B型肝炎治療薬の創出を目指している。

B. 研究方法

AAKは2Åの解像度でX線結晶構造解析がなされており、理論計算創薬を行う基盤ができています。そこで、長崎大学先端計算研究センターで構築が進んでいるGPGPU型スーパーコンピューターを用いた理論創薬を行うことにしました。これまで、活性は低

いが、AAK を阻害する化合物が知られており、その結合部位も特定されていることから、別骨格の化合物へのリードホッピングを目的として、インシリコスクリーニングを行うことにした。

まず、東京大学化合物ライブラリー21万化合物の構造データを元に、真空中 100°C の条件で、各化合物当たり、200 コンフォメーションを発生させ、それぞれについてエネルギー最小化を行い、図1のように、約 4,000 万コンフォメーションライブラリーを作成した。同様に、Sigma 社の市販 1 万化合物ライブラリーおよび長崎大学 1 千オリジナル化合物ライブラリーの構造データを元に、各化合物当たり、200 コンフォメーションを発生させ、それぞれについてエネルギー最小化を行い、約 200 万および 20 万のコンフォメーションライブラリーを作成した。

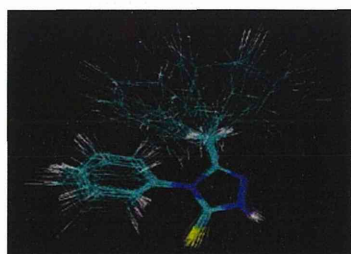
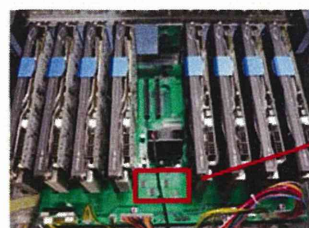


図1

次に、長崎大学においてプログラムを GPU 化したドッキングプログラム (Nagasaki Docking) を GPGPU 型スーパーコンピュータ DEGIMA に実装させた。この GPGPU 型スーパーコンピュータは、図2のように単精度の超高速 GPU を独自に設計・開発した基盤を用いて並列に配置したものであり、約 2,000 万円の材料費で、日本最速のスーパーコンピュータである京(構築費 1,000~2,000 億円:10 PFLOPS)の

6分の1の計算速度(1.6 PFLOPS)を達成し、運用するための使用量を京(2,400 万円/日)の 2,000 分の1 (1 万円/日) 程度に抑えることができるため、創薬に特化したものである。また、基本的に、化合物の入手も東京大学からの実費だけになるので、10,000 化合物を抽出してもプレート代のみの 2 万 5 千円程度ですむ。このため、1 回のインシリコスクリーニングで 3 日間の計算を行ったとしても、6 万円程度で行うことが可能となる。今回は、このシステム構築と、実際の AAK 構造に基づくインシリコスクリーニング、それに続くウェットスクリーニングを行うことにした。



独自開発部品

汎用部品 (GPU)

図2

C. 研究結果

まず、ドッキングに用いる座標を、既知の低活性化合物と AAK との共結晶構造を元にセンタリングした。このセンタリングした座標情報に対して、東京大学化合物コンフォメーションライブラリー4,000 万種、および、Sigma 化合物ライブラリー200 万種に関してドッキング計算を行った。その結果、それぞれのコンフォメーションライブラリーから 500 化合物を選択することができた。

また、これらの化合物に対して、ウェットスクリーニングを実施するため、アッセイ

系の構築を行った。AAK は基質である長鎖アミノアルコールと ATP に作用し、長鎖アミノアルコールリン酸エステルと ADP を生成させる。アッセイ法としては、この生成された ADP を定量することとした。具体的には、ADP に酵素を作用させ、過酸化水素を発生させ、そこに ADHP とペルオキシダーゼを作用させ、蛍光基質プロドラッグを resorufin にコンバージョンさせる。この蛍光を 530nm と 590nm のフィルターで測定することにより、ADP 含量を測定する系を確立した。

D. 考察

B 型肝炎ウイルスはヒトの自然免疫系受容体に認識される。そして、NF- κ B の活性化を経て、TNF- α などの炎症性サイトカインが産生されるが、この際に AAK が活性化される。ここで、AAK を阻害すると、NF- κ B の活性化が阻害され、TNF- α の産生が抑制されることから、B 型肝炎に伴う炎症を抑制することが可能となる。

適応性免疫に対する作用も解析されつつある。AAK が活性化され、長鎖アミノアルコールリン酸エステルが過剰産生されると、長鎖アミノアルコールリン酸エステル受容体の発現が抑制されるが、これにより、制御性 T 細胞の数および機能が亢進する。これは、B 型肝炎ウイルスによる肝臓がんの発症に関わっている現象であり、AAK の阻害剤を開発することができれば、B 型肝炎誘導性肝がん発症を抑えられる可能性がある。

E. 結論

平成 26 年度は、GPGPU 型スーパーコンピュータによるインシリコ理論計算創薬の基盤整備、AAK を標的としたインシリコスクリーニングによる 500 化合物の抽出、AAK 酵素活性測定システムの構築が終了した。今後、Z 値と SB 比の最適化を行った後、実際のウェットスクリーニングを行い、ヒット化合物の取得、合成最適化を行っていく。さらに、B 型肝炎ウイルスに対するスーパーコンピュータ理論計算創薬を適応可能な他のターゲットに関しても、理論計算創薬を行っていく。

III. 研究成果の刊行一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
渡邊 綱正, 田中 靖人.	9・6 ウイルス性肝炎	荒川宜親, 神谷茂, 柳雄介.	病原微生物学基礎と臨床	東京化学同人	東京都	2014	263-268
Higuchi M, Mizuguchi H.	Hepatic differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by two- and three-dimensional culture systems in vitro.	M. Akashi, T. Akagi, M. Matsusaki.	Engineered Cell Manipulation for Biomedical Application	Springer	Japan	2014	147-158
Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T.	Micro RNAs and oncogenic human viruses.	Babashah S.	Micro RNAs: Key Regulators of Oncogenesis.	Springer	Switzerland	2014	155-182
Watashi K, Wakita T.	HBV/HDV entry, species specificity and tissue tropism.	Christoph Seeger, Stephen Locarnini	Hepatitis B and Delta Virus	Cold Spring Harbor Laboratory Press	USA	2015	in press
渡土 幸一.	肝炎の基礎 HBV 感染生活環と培養系	小俣 政男. (監修) 椎名秀一朗, 坂本 直哉, 丸澤 宏之. (編集)	肝疾患 Review 2014-2015	日本メディカルセンター	東京都	2014	20-26
渡土 幸一.	第6章 抗ウイルス薬	下遠野邦忠, 瀬谷 司. (監訳)	生命科学のためのウイルス学	南江堂	東京都	2015	143-176

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
* Watashi K. Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y. Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T.	Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP).	Hepatology	59(5)	1726-1737	2014
*Wong DK, Kopaniszen M, Omagari K, Tanaka Y. Fong DY, Seto WK, Fung J, Huang FY, Zhang AY, Hung IF, Lai CL, Yuen MF.	Effect of hepatitis B virus reverse transcriptase variations on entecavir treatment response.	J Infect Dis.	210(5)	701-707	2014
*Isogawa M, Tanaka Y.	Immunobiology of hepatitis B virus infection.	Hepatol Res.	45(2)	179-189	2015
*Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y. Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K. Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice CM, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y. Takaoka A.	The RNA Sensor RIG-I Dually Functions as an Innate Sensor and Direct Antiviral Factor for Hepatitis B Virus.	Immunity	42(1)	123-132	2015

*Watanabe T, Hamada-Tsutsu mi S, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y.	Postexposure Prophylactic Effect of Hepatitis B Virus (HBV)-Active Antiretroviral Therapy against HBV Infection.	Antimicrob Agents Chemother.	59(2)	1292-1298	2015
*Hamada-Tsutsu umi S, Iio E, Watanabe T, Murakami S, Isogawa M, Iijima S, Inoue T, Matsunami K, Tajiri K, Ozawa T, Kishi H, Muraguchi A, Joh T, Tanaka Y.	Validation of cross-genotype neutralization by hepatitis B virus-specific monoclonal antibodies by in vitro and in vivo infection.	PLoS One.	10(2)	e0118062	2015
*Matsumoto A, Yatsushashi H, Nagaoka S, Suzuki Y, Hosaka T, Tsuge M, Chayama K, Kanda T, Yokosuka O, Nishiguchi S, Saito M, Miyase S, Kang JH, Shinkai N, Tanaka Y. Umemura T, Tanaka E.	Factors associated with the effect of interferon- α sequential therapy in order to discontinue nucleoside/nucleotide analog treatment in patients with chronic hepatitis B.	Hepatol Res.	in press		2015
Totani H, Kusumoto S, Ishida T, Masuda A, Yoshida T, Ito A, Ri M, Komatsu H, Murakami S, Mizokami M, Ueda R, Niimi A, Inagaki H, Tanaka Y. , Iida S.	Reactivation of hepatitis B virus (HBV) infection in adult T-cell leukemia-lymphoma patients with resolved HBV infection following systemic chemotherapy.	Int J Hematol.	101(4)	398-404	2015

Ifuku H, Kusumoto S, Tanaka Y , Totani H, Ishida T, Okada M, Murakami S, Mizokami M, Ueda R, Iida S.	Fatal reactivation of hepatitis B virus infection in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab.	Hepatol Res.	in press		2015
*Bae SK, Shimoda S, Ikegami T, Yoshizumi T, Harimoto N, Itoh S, Soejima Y, Uchiyama H, Shirabe K , Maehara Y.	Risk factors for hepatitis B virus recurrence after living donor liver transplantation: A 17-year experience at a single center.	Hepatol Res.	in press		2015
*Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, Ohtaka M, Nishimura K, Imagawa K, Sakurai F, Tachibana M, Sumazaki R, Noguchi E, Nakanishi M, Hirata K, Kawabata K, Mizuguchi H .	Prediction of inter-individual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPS-derived hepatocytes.	Proc Natl Acad Sci USA.	111(47)	16772-777	2014
Nagamoto Y, Takayama K, Tashiro K, Tateno C, Sakurai F, Tachibana M, Kawabata K, Ikeda K, Tanaka Y, Mizuguchi H .	Efficient engraftment of human iPS cell-derived hepatocyte-like cells in uPA/SCID mice by overexpression of FNK, a Bcl-xL mutant gene.	Cell Transplant.	in press		2014

Ishida Y , Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K , Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C.	Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice.	Am J Pathol.	185(5)	1275-1285	2015
Tateno C, Yamamoto T, Utoh R, Yamasaki C, Ishida Y , Myoken Y, Oofusa K, Okada M, Tsutsui N, Yoshizato K.	Chimeric Mice with Hepatocyte-humanized Liver as an Appropriate Model to Study Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α .	Toxicol Pathol.	43(2)	233-248	2015
Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T , Ohmori S	An efficient method for differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells retaining drug metabolizing activity.	Drug Metab Pharmacokin.	29(3)	237-243	2014
Kondo Y, Yoshihashi S, Mimori K, Ogihara R, Kanehama Y, Maki Y, Enosawa S, Kurose K, Iwao T, Nakamura K, Matsunaga T	Selective culture method for hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells.	Drug Metab Pharmacokin.	29(5)	407-413	2014