

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 下遠野 邦忠

平成26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

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

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

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

杉山 真也 (肝炎・免疫研究センター)

4. HBV感染を阻害する低分子化合物のスクリーニング

長田 裕之 (理化学研究所基幹研究所)

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

### IV. 研究成果の刊行物・別刷り

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

25年度 総合分担研究報告書

研究分担者 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：HBV が感染可能な細胞には、ウイルスに特異的な受容体が発現していると考えられる。既に、NTCP (SLC10A1)がその候補遺伝子として報告されているが、それだけでは感染が成立しないことも知られているので、その他の受容体遺伝子等の探索が求められている。HBV の感染が容易に判別できる系を構築する事により、その様な受容体探索が容易になると考えられるので、蛍光発光、ルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子をゲノムに組み込んだ HBV 様粒子を産生させ、それを用いたヒト初代肝細胞あるいは培養株への感染をおこなった。その結果、得られたレポーターウイルスは効率よく目的の細胞に感染する事が分かった。また、この感染様式が HBV 本来の感染を模擬している事を、HBV 阻害剤を用いた実験で明らかにした。ヒト肝由来各種培養株に NTCP 遺伝子を導入し、上記ウイルスを感染させ、感染性を評価した。その結果 HepG2 等を含む数種類の細胞が効率よい感染性を示し、これらの細胞を用いた感染評価が可能である事を示した。感染評価がこれまでの HBV 感染系よりも簡便に行える事になり、HBV 感染阻害剤の効率よい評価系になると期待される。一方で、ウイルス産生の効率化には、POL 遺伝子の発現量を最適化することが重要であることが明らかとなった。NTCP 発現細胞を作成し、感染感受性と非感受性の細胞を樹立することで、受容体探索のための差分解析をする準備を進めた。

上記レポーターウイルスを用いて抗 HBV 作用を示す薬剤のスクリーニングには効率のよい感染培養細胞が必要である。そこで、既に樹立されている肝細胞の培養条件を検討し、感染効率の高い培養細胞の樹立の試みをおこなった。これまでに、(1) 最終分化を遂げた成熟肝細胞から、小分子シグナル阻害剤刺激下で、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を誘導した。(2) 形態的、機能的にも肝細胞様の細胞を分化誘導する事に成功、HBV の受容体とされる NTCP も分化誘導前に比較して 40 倍以上、mRNA 発現量が増大していた。これらの細胞に対する HBV 感染効率を解析できる状況になった。

抗 HBV 剤スクリーニングの為に天然物由来化合物ライブラリーの収集、それを用いた抗 HBV 作用物質の探索を開始した。レポーター-HBV を用いて、マススクリーニングのための予備実験を行い、96 ウエルプレートの規模でのスクリーニングが可能である事が分かった。

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

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方策を探ることを目的とした研究を行う。近年、Yan ら (Yan et al. eLife 2012) によって NTCP 分子がその候補であることが報告された。一方で、NTCP が発現していながらも感染が成立しない細胞もあり、他にも重要な受容体関連分子が存在することが示唆されている。本研究を進めるにあたり、HBV 感染を簡便にモニターできる系の開発が重要である。そのために、レポーター遺伝子を組み込んだ HBV ゲノムを作成し、それを組み込んだ HBV 模擬粒子を構築する事、それを用いてフローサイトメトリーなどによる効率的な感受性細胞の選別と受容体分子の同定ができると考えられる。また、レポーターウイルスを効率よく感染させる細胞の開発を行う。これまでに、ヒト初代肝細胞に対する HBV 感染が認められているので、この系を用いて評価を行いつつ、既に樹立されている肝細胞の培養条件を検討し、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。抗 HBV 活性を示す低分子化合物のライブラリーとしては多様性に富んだケミカルライブラリーが必要である。またそのようなライブラリー構築には、質の高い化合物群と構造や活性情報が充実したデータベースやデータマイニング技術、などの創薬基盤の整備が不可欠である。本年度は、微生物生合成遺伝子改変技術やフラクシ

ョンライブラリーを用い、天然化合物の収集を加速する。また細胞表現型を利用して薬剤の作用機序解析を実施し、HBV 感染阻害薬探索に資する化合物ライブラリーの整備・拡充を行う。

## B . 研究方法

(1) レポーター遺伝子を組み込んだウイルス粒子の産生と感染。

レポーター遺伝子を持つ HBV ゲノムを内包する Dane 粒子様粒子産生。本粒子が産生される事が分かったら、それが HBV の感染様式を反映するか否かを検証する。その為に以下の実験を行う。

(i) 蛍光発色蛋白質、ルシフェラーゼあるいは分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) 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、残りの領域を蛍光発光あるいはルシフェラーゼ遺伝子と置き換える。

(ii) 組み換え HBV ゲノムの長さを変え、粒子産生の高い構築物を得る。

(iii) 組み換え体ウイルスの産生。

上の(i)(ii)で得られたプラスミドを、ヘルパーHBV (粒子産生機能をなくし、ウイルス蛋白質のみを産生するもの)プラスミドと共に HepG2 に導入して、培養上清を回収し HBV 様粒子を部分精製する。

(iv) 感染実験。

ヒト肝臓の初代細胞 (FXB)、HBV 受容体候補遺伝子 (NTCP) を各種培養ヒト肝細胞に導入し、それに(iii)で得られたウイルス液を感染させ、レポーター活性で感染性を評価する。

(v) ルシフェラーゼ活性を指標にした 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。

(vi) 蛍光発光遺伝子を組み込んだゲノムを構築し、ウイルス産生を試みる。また、それを感染させて感染効率を調べる。

(2) HBV 感染培養細胞の樹立。

HBV 感染過程を再現するために最適かつ

安定な肝細胞の培養系を得るために、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、初期感染過程を標的とした新規治療薬の開発に有用な細胞系を提供する。具体的には、この4種類の低分子化合物の組み合わせを変える事で、最も効率的に、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。

(3) 抗 HBV 剤スクリーニングのための化合物の整備と HBV 阻害評価の予備実験を行う。

天然化合物の網羅的な収集し、細胞形態変化を指標とした作用機序解明をおこなう。また計画に先行して HBV 様擬粒子を用いたパイロットスクリーニングを実施する。そのために NanoLuc 遺伝子を導入した組換え HBV 粒子を PXB 細胞に感染させ、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)のウイルス感染阻害活性を評価する。

(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。遺伝子組み換え生物等の使用、動物実験に関しては、機関の規則、指針を遵守する。

## C. 研究結果

(1) レポーター遺伝子を組み込んだウイルス粒子の産生と感染。レポーター遺伝子を組み込んだウイルス粒子の産生と感染。

HBV ゲノムから Core をコードする領域内に蛍光遺伝子として DsRED、ルシフェラーゼ遺伝子として NanoLuc(NL)、分泌性アルカリフォスファターゼ遺伝子を選んだ。昨年度までに、NL 遺伝子を組み込んだ HBV ゲノムを導入した細胞からウイルス粒子が産生する事を確認したが、粒子産

生効率を上げるために、ゲノム上の異なる箇所にレポーター遺伝子を挿入して、産生量が最大になる構築を行った。

(i) 組み換え HBV ゲノムの長さを変え、粒子産生の高い構築物を得た。

ゲノムの大きさを変化させ、それらからの粒子産生をレポーター活性で評価し、3.7kb よりも小さい事が重要である事が分かった。

(ii) 組み換え体ウイルスの産生。

上の(i)で得られたプラスミドを HepG2 に導入して HBV 様粒子を超速心にて濃縮し部分精製した。

(iii) 初代肝細胞への感染実験

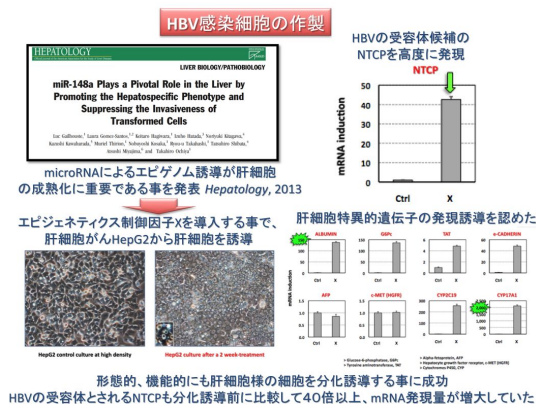
ヒト肝臓の初代細胞(FXB)に(ii)で得られたウイルス液を感染させ、感染後1週間レポーター活性が増加する事を確かめた。

(iv) ルシフェラーゼ活性を指標にした 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、HBV に対して抗ウイルス作用を示すものはレポーター活性も低下した。感染細胞内では本ウイルスの pol が機能しないために cccDNA 増幅は起こらないと考えられるが、エンテカビルによる阻害活性が顕著でなかったのはそのためであると考えられた。

(v) HBV 受容体候補遺伝子(NTCP)を各種培養ヒト肝細胞に導入し、感染性を評価した。NTCP 遺伝子を安定的に産生するヒト肝臓由来細胞株を 15 種類樹立した。それらについて、HBV/NL 感染を行い、感染性を調べ、HepG2/NTCP, HuH7/NTCP が他の肝細胞に比べて有意に高い感染性を示した。

(2) HBV 感受性を示す肝細胞株樹立の試み。

microRNA148a が、エピゲノムの制御を介して、肝細胞の成熟化を担う事が明らかとなった(Hepatology, 2013)。この成果をもとに、エピジェネティクス制御因子 X を導入する事で、肝細胞がん HepG2 から成熟肝細胞の性質を有する細胞を誘導する事に成功した(下図)。



(3) HBV 阻害剤スクリーニング用の天然化合物の網羅的な収集とその一致部を用いた抗 HBV 活性評価のための予備実験。微生物代謝産物を系統的に収集したフラクションライブラリーと天然化合物データベース NPPlot を用いた新規天然化合物探索を実施し、ピロリジジノン系新規代謝産物ピロリジラクトン (Nogawa et al) や新規キノマイシン類縁体 (Lim et al) など、様々な新規物質を取得した。また、NPDepo から提供された標準化合物についてウイルス感染阻害活性の予備実験を行った。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、抗ウイルス物質を含む 11 化合物で顕著な活性が見られた。HBV の生活環を考えると、ヒットが予想される化合物群であり、本評価系がワークしていることが示唆された。

#### D . 考察

蛍光を発色する遺伝子 (NanoLuc) を内包する HBV 様粒子が産生され、それを用いたレポーターアッセイにより、HBV 感染過程を評価可能になった。HBV 感染阻害剤を用いた評価実験から、この系は、ウイルス感染初期から転写反応までをレポーター活性で評価できる事が分かった。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。

NTCP(SLC10A1)をある種のヒト肝臓由来細胞に導入すると、感染性を示すようになることを確認した。今回作製したレポータ

ーHBV においても同様の経路で感染することが確認でき、改変 HBV の有用性が示された。感染効率を改善する必要があり、ゲノムサイズの最適化、トランスに供給するウイルスタンパク質の量について、来年度以降に検討する。感染感受性細胞の取得も進めることができ、クローンの中から感染感受性の異なるものを複数樹立することで必要な受容体分子の探索が可能となると考えられる。HBV が効率よく感染する培養細胞の取得は、スクリーニングに必須である。エピジェネティクス制御因子 X を導入する事で、肝細胞がん HepG2 から成熟肝細胞の性質を有する細胞を誘導する事が可能な事が判明した。この細胞をさらに改良して HBV 感染系に出来る可能性がある。HBV 感染阻害薬の探索源に資する化合物を多数 ( 3 万種類以上を目標 ) 整えることを目的として順調に進んだ。また、HBV 擬粒子を用いた評価系の検証を実施し、大規模スクリーニングを開始するめどをつけた。

#### E . 結論

蛍光を発色する遺伝子 (NanoLuc) を内包する HBV 様粒子を感染させ、レポーター活性による HBV 複製を評価できる簡便な系を構築した。これを用いた抗 HBV 剤スクリーニングが容易に行えるようになった。また様々な種類の感染感受性もしくは、非感受性細胞を取得することで、差分解析を行うことが可能となる。

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される事を見だし、HBV 感染細胞の獲得に向けて大きく前進した。

生合成遺伝子改変微生物、微生物培養物や植物エキスのフラクションライブラリー作製により、化合物ライブラリーを整備・拡充し、抗 HBV 薬のスクリーニング体制を整えた。

#### F . 健康危険情報

なし

#### G . 研究発表

1. 論文発表

1. Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N., PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem Biophys Res Commun.* 430(2) :592-597, 2013.
2. Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers. *Gastroenterology.* 145: 658-667, 2013
3. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells. *J. Virol* 87: 8169-8178, 2013
4. Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK. 2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: in vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 Jan 15;23(2):503-6.
5. Sunbul M, Sugiyama M\*, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol.* 2013 Feb;57(2):122-9. \*corresponding author
6. Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsunami H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; the Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology.* 2013 Jul 29.
7. Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, Mizokami M, Oubiña JR. In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behavior regarding its parental genotypes. *J Gen Virol.* 2013 Dec;94 Pt 12:2724-8.
8. Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T, and Iizasa H. MicroRNAs and oncogenic human viruses (in press). In S. Babashah (Ed.), *MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis.* Springer. ISBN 978-3-319-03724-0.
9. Thirion M and Ochiya T. Roles of microRNAs in the Hepatitis B Virus Infection and Related Diseases. *Viruses* 2013; 5(11), 2690-703; doi:10.3390/v5112690.
10. Gailhouste L, Gomez-Santos L, Kitagawa N, Kawaraha K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi R, Shibata T, Miyajima A, and Ochiya T. MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. *Hepatology.* 2013; 58(3), 1153-65.
11. Thirion M and Ochiya T. Extracellular microRNAs as

- potential biomarkers and therapeutic tools in cancer. In *MicroRNAs in cancer* (pp. 308-332). 2013; Enfield, New Hampshire, Science Publishers.
12. Gailhouste L, Gomez-Santos L, Ochiya T. Potential applications of miRNAs as diagnostic and prognostic markers in liver cancer. *Front Biosci*, 18:199-223, 2013
  13. Gailhouste L, Ochiya T. Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular carcinoma. *Histol histopathol*, 28:437-451, 2013
  14. Gailhouste L, Ochiya T. MicroRNAs: new tools to tackle liver cancer progression. *Cancer Diagnostics*, pp 12-14, 2013
  15. Nogawa T, Kawatani M, Uramoto M, Okano A, Aono H, Futamura Y, Koshino H, Takahashi S, Osada H. Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite produced by a fungus. *J Antibiot*, 66: 621-3, 2013
  16. Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Aono H, Nogawa T, Osada H. Identification of a molecular target of a novel fungal metabolite, pyrrolizilactone, by phenotypic profiling systems. *ChemBioChem*, 14: 2456-63, 2013
  17. Lim CL, Nogawa T, Uramoto M, Okano A, Hongo Y, Nakamura T, Koshino H, Takahashi S, Ibrahim D, Osada H. RK-1355A and B, novel quinomycin derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library based on NPPlot screening. *J Antibiot*, in press. doi: 10.1038/ja.2013.144.
2. 学会発表
    1. 宇治野 真之、西辻 裕紀、清水 洋子、山本 裕美、鈴木 律子、月本あつ子、日紫喜 隆行、高久 洋、下遠野 邦忠・低酸素培養条件下における新たな HCV 感染様式・第 61 回日本ウイルス学会学術集会・神戸国際会場・平成 25 年 11 月 10-12 日
    2. B 型肝炎ウイルス複製に関連する脂質分子の同定とその効果」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 第 49 回日本肝臓学会総会 シンポジウム 京王プラザホテル 2013 年 6 月 7 日
    3. Polymorphisms consisting of (TA)<sub>n</sub> dinucleotide repeat near IL28B gene could improve the predictive value for HCV spontaneous clearance with IL28B SNPs. Masaya Sugiyama, Satoshi Hiramine, Norihiro Furusyo, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, Jun Hayashi, and Masashi Mizokami The 64th Annual Meeting of the AASLD P-1426 Nov 4th 2013 Washington DC
    4. Clinical and virological analysis on Hepatitis B virus genotype D. Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, and Masashi Mizokami Symposium. Japan-Taiwan Research Symposium on Hepatitis B. Tokyo, Japan April 14th, 2013
    5. Prediction improvement on the effect of interferon-based therapy and spontaneous clearance of hepatitis C using rs72258881 near IL-28B following rs8099917. Masaya Sugiyama, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, and Masashi Mizokami The International Liver Congress 2013: 48th Annual Meeting of EASL in Amsterdam, P-26th April 2013
    6. The therapeutic potential of



- mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles.」、落谷孝広、第20回肝細胞研究会 イブニングセミナー（2013.9.26 大阪）
7. Ochiya T. 「Hepatocyte from other sources of stem cell」. APASL Liver Week 2013, Suntec.Singapore. June 6-10
  8. 長田裕之，二村友史，室井誠「細胞形態とプロテオーム変化を指標にした新規抗がん剤の分指標的予測」第17回日本がん分子標的治療学会学術集会，京都，6月，2013
  9. 川谷誠，青野晴美，二村友史，室井誠，渡辺信元，長田裕之「糸状菌由来新規抗がん活性物質 pyrrolizilactone の標的同定」第17回日本がん分子標的治療学会学術集会，京都，6月，2013
  10. Lim CL，野川俊彦，浦本昌和，岡野亜紀子，本郷やよい，中村健道，越野広雪，高橋俊二，Ibrahim D，長田裕之「Isolation of novel bioactive compounds from fraction library of microorganisms based on NPPlot screening」第55回天然有機化合物討論会，京都，9月，2013
  11. Osada H. “Isolation of New Microbial Metabolites for Natural Product Depository (NPDepo)” 2<sup>nd</sup> Annual Conference ICBS2013, 京都，10月，2013
  12. Futamura Y，Kawatani M，Muroi M，Aono H，Osada H. “Development and utilization of a cell morphology database, MorphoBase, for drug target identification” AACR-NCI-EORTC International Conference Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston, Oct 2013.
  13. 長田裕之「抗がん剤のケミカルバイオロジー」第72回日本癌学会学術総会，横浜，10月，2013
  14. 二村友史，川谷誠，室井誠，青野晴美，長田裕之「モルフォベースを利用した抗がん剤探索：特異な線状構造体を誘導する NPD4152 の発見」第72回日本癌学会学術総会，横浜，10月，2013
  15. 長田裕之，二村友史，室井誠「細胞形態とプロテオーム変化を指標にした新規抗がん剤の分指標的予測」第17回日本がん分子標的治療学会学術集会，京都，6月，2013
  16. 川谷誠，青野晴美，二村友史，室井誠，渡辺信元，長田裕之「糸状菌由来新規抗がん活性物質 pyrrolizilactone の標的同定」第17回日本がん分子標的治療学会学術集会，京都，6月，2013
  17. Lim CL，野川俊彦，浦本昌和，岡野亜紀子，本郷やよい，中村健道，越野広雪，高橋俊二，Ibrahim D，長田裕之「Isolation of novel bioactive compounds from fraction library of microorganisms based on NPPlot screening」第55回天然有機化合物討論会，京都，9月，2013
  18. Osada H. “Isolation of New Microbial Metabolites for Natural Product Depository (NPDepo)” 2<sup>nd</sup> Annual Conference ICBS2013, 京都，10月，2013
  19. Futamura Y，Kawatani M，Muroi M，Aono H，Osada H. “Development and utilization of a cell morphology database, MorphoBase, for drug target identification” AACR-NCI-EORTC International Conference Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston, Oct 2013.
  20. 長田裕之「抗がん剤のケミカルバイオロジー」第72回日本癌学会学術総会，横浜，10月，2013
  21. 二村友史，川谷誠，室井誠，青野晴美，長田裕之「モルフォベースを利用した抗がん剤探索：特異な線状構造体を誘導する NPD4152 の発見」第72回日本癌学会学術総会，横浜，10月，2013
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得

出願名称： ラット胚性幹細胞を用いたキ  
メララットの作製法

出願人：国立がん研究センター；DSファーマ  
マバイオメディカル株式会社

発明者 落谷 孝広、川又 理樹

出願日時 平成22年7月23日

出願番号 特願 2010-166571

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業  
H25 年度 分担研究報告書

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  
研究分担者 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：蛍光発光、ルシフェラーゼ遺伝子をゲノムに組み込んだ HBV 様粒子の産生を行い、それがヒト初代肝細胞に効率よく感染する事を明らかにした。また、この感染系は HBV そのものの感染初期過程を模擬している事を HBV の感染および複製阻害剤で示した。ヒト肝由来各種培養株に NTCP 遺伝子を導入し、上記ウイルスを感染させ、感染性を評価した。その結果 HepG2 等を含む数種類の細胞が効率よい感染性を示し、これらの細胞を用いた感染評価が可能である事を示した。感染評価がこれまでの HBV 感染系よりも簡便に行える事になり、HBV 感染阻害剤の効率よい評価系になると期待される。

#### 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方策を探ることを目的とした研究を行う。

本研究を進めるにあたり、HBV 感染を簡便にモニターできる系の開発が重要である。そのために、レポーター遺伝子を組み込んだ HBV ゲノムを作成し、それを組み込

んだ HBV 模擬粒子を構築する事を第一の目的とする。

#### B．研究方法

HBV 感染者の血清中には僅かな HBV 粒子 (Dane 粒子) の他に、HBs 蛋白質の凝集塊が圧倒的多数存在する。この血清は高い感染性を有するので、HBs 蛋白質凝集塊は Dane 粒子感染に阻害的に働かないと考えられる。むしろ、Dane 粒子表面の HBs 蛋白質は HBs 抗原凝集塊よりも感染の反応に優先すると考えられる。そこでレポーター遺伝子を持つ HBV ゲノムを内包する Dane 粒子様粒子産生を行う。本粒子が産生される事が分かったら、それが HBV の感染様式を反映するか否かを検証する。その為に以下の実験を行う。

(1) 蛍光発色蛋白質あるいはルシフェラーゼ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、残りの領域を蛍光発光あるいはルシフェラーゼ遺伝子と置き換える。

(2) 組み換え HBV ゲノムの長さを変え、粒子産生の高い構築物を得る。

(3) 組み換え体ウイルスの産生上の(1)(2)で得られたプラスミドを HepG2 に導入して、培養上清を回収し HBV 様粒子

を濃縮する。

(4) 感染実験

ヒト肝臓の初代細胞(FXB)に(3)で得られたウイルス液を感染させる。感染後経時的に細胞液を抽出して、ルシフェラーゼ活性を調べて感染を評価する。

(5) ルシフェラーゼ活性を指標にした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。

(6) 蛍光発光遺伝子を組み込んだゲノムを構築し、ウイルス産生を試みる。また、それを感染させて感染効率を調べる。

(7) 近年になり報告されたHBV受容体候補遺伝子(NTCP)を各種培養ヒト肝細胞に導入し、感染性を評価する。

(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) 蛍光発色蛋白質あるいはルシフェラーゼ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、残りの領域を蛍光発光あるいはルシフェラーゼ遺伝子と置き換える。蛍光遺伝子としてDsRED、ルシフェラーゼ遺伝子としてNanoLuc(NL)を選んだ。昨年度までに、NL遺伝子を組み込んだHBVゲノムからウイルス粒子を算する事を確認したが、粒子産生効率を上げるために、ゲノム上の異なる箇所に挿入して、今までのところ産生量が最大になる構築を行った。

(2) 組み換えHBVゲノムの長さを変え、粒子産生の高い構築物を得る。

ゲノムの大きさを変化させ、それらからの粒子産生をレポーター活性で評価した。その結果、3.7kbよりも大きくすると産生が抑制されたので、構築はこれよりも小さくすることにした。

(3) 組み換え体ウイルスの産生。

上の(1)(2)で得られたプラスミドをヘルパーウイルスを産生するプラスミドと共にHepG2に導入して、3日目に培養上清を回収しHBV様粒子を超遠心にて濃縮し部分精製した。

(4) 初代肝細胞への感染実験

ヒト肝臓の初代細胞(FXB)に(3)で得られたウイルス液を感染させた。感染後経時的に細胞液を抽出して、ルシフェラーゼ活性を調べて感染を評価し、感染後1週間レポーター活性が増加する事を確かめた。

(5) ルシフェラーゼ活性を指標にした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。調製したNLを産生する組み換えHBV(HBV/NL)はpolの一部が欠失しているために、感染細胞内ではpolが機能しないためにcccDNA増幅は起こらないと考えられる。エンテカビルによる阻害活性が顕著でなかったのはそのためであると考えられた。

(6) 蛍光発光遺伝子を組み込んだ組み換えHBVゲノムの構築と、ウイルス産生。HBV/NLのDsRED遺伝子をNLと取り替えたプラスミドを構築し、ウイルス粒子産生を行わせた。

(7) 近年報告されたHBV受容体候補遺伝子(NTCP)を各種培養ヒト肝細胞に導入し、感染性を評価する。NTCP遺伝子を安定的に産生するヒト肝臓由来細胞株を15種類樹立した。それらについて、HBV/NL感染を行い、感染性を調べたところ、HepG2/NTCP, HuH7/NTCPが他の肝細胞に比べて有意に高い感染性を示した。これらの細胞を用いた感染評価系が可能である事を示した。

#### 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 HBV の生活環をどの部分を反映するかについても解析し、感染初期から cccDNA 合成、転写活性を含めた範囲が反映されると考えられる。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。

#### 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。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。その活性は HBV 複製を阻害する薬剤処理の一部で阻害された事から、レポーター活性による HBV 複製を評価できる簡便な系を構築したといえる。

また、NTCP を発現する各種培養ヒト肝細胞を樹立した。その中の幾つかは上記レポーターウイルス感染が効率よく見られるので、これらの細胞を感染評価系として用いる事が可能になったので、これまで困難であった抗 HBV 剤スクリーニングが容易になったといえる。

#### F . 健康危険情報

なし

#### G . 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N., PML tumor

suppressor protein is required for HCV production. *Biochem Biophys Res Commun.* 430(2) :592-597, 2013.

2. Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M. Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers. *Gastroenterology.* 145: 658-667, 2013
3. Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells. *J. Virol* 87: 8169-8178, 2013

##### 2. 学会発表

宇治野 真之、西辻 裕紀、清水 洋子、山本 裕美、鈴木 律子、月本 あつ子、日紫喜 隆行、高久 洋、下遠野 邦忠・低酸素培養条件下における新たな HCV 感染様式・第 61 回日本ウイルス学会学術集会・神戸国際会場・平成 25 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

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

蛍光標識 HBV を用いた感染評価と受容体探索

分担研究者 氏名：杉山真也  
所属：国立国際医療研究センター  
職名：上級研究員

研究要旨：HBV が感染可能な細胞には、特異的な受容体が発現していると考えられる。既に、SLC10A1 が報告されているが、それだけでは感染が成立しないことも知られており、その他に必要な遺伝子等の探索が求められている。本年度の研究で、HBV ゲノムを改変したウイルスを効率的に感染させること、また、改変 HBV を効率的に作製するための条件を検討した。その結果、SLC10A1 発現細胞では感染が認められ、レポーターや傾向遺伝子の発現が観察された。さらには、初代培養肝細胞を利用することでより効率的なウイルス感染を認めた。一方で、ウイルス作成の効率化では、POL 遺伝子の発現量を最適化することが重要であることが明らかとなった。SLC10A1 発現細胞を作成し、感染感受性とは感受性の細胞を樹立することで、受容体探索のための差分解析をする準備を進めた。

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。そこで、本研究では、(1)HBV 感染受容体の探索を目的とし、蛍光分子を用いた HBV 粒子の作製、もしくは蛍光遺伝子をキメラに持つ HBV ゲノムの作製により、感染感受性細胞の選別を行う。(2)上記ウイルスが完成した際には、フローサイトメトリーなどによる効率的な感受性細胞の選別と受容体分子の同定ができると考えられる。そのための

mRNA と蛋白の発現スクリーニング系を確立する。

B . 研究方法

HBV コア遺伝子を分泌型のアルカリフォスファターゼ（SEAP）に置換した改変 HBV ゲノムを作成した（pUC19/HBV-SEAP）。また、昨年作成した CMV-GFP-pA のカセットを挿入した改変 HBV ゲノム保有プラスミドも準備した（pUC19/HBV-GFP）。これらの改変で失われたウイルス遺伝子を補充するために、パッケージングシグナルであるイプシロンの機能を欠損させた HBV ゲノムを準備した（pUC19/HBV-）。このイプシロン欠損ゲノムは粒子内に取り込まれないことを昨年までに確認している。加えて、HBV の POL 遺伝子を強制発現するプラスミドも準備した。

細胞としては、ヒト由来の初代培養肝細胞（PXB cell）、培養細胞株の HuH7、HepG2 を利用した。培養細胞株へは一過性のトラ

ンスフェクションを行い、SLC10A1 分子を発現させた。また、レンチウイルス感染系を用いて、SLC10A1 の定常発現細胞を作成した。

(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

新規に作成した改変 HBV である pUC19/HBV-SEAP と pUC19/HBV-GFP を pUC19/HBV- と組み合わせることでウイルス粒子を作成した。培養細胞株には、SLC10A1 をトランスフェクションし、遺伝子発現を確認した。その細胞に作成したそれぞれの組み換えウイルスを感染させ、隔日で培養上清を回収し、HBs 抗原を測定した。その結果、pUC19/HBV-SEAP 由来のウイルスでは、HBs 抗原のレベルは低値であり、感染効率が低かったが、SEAP の値は確認でき、感染を簡易にモニターすることは可能であった。pUC19/HBV-GFP においては、GFP で確認したところ、数個の細胞で感染が確認できたが、感染のレベルは低値であった。細胞を初代培養肝細胞に変更することで感染の効率は 5 倍程度上昇した。

蛍光遺伝子保有 HBV (複製能なし) の発現系を利用して効率的にウイルス産生が行われる条件を検討した。粒子形成に不足している HBV 遺伝子をトランスに供給する必要があるが、強制的に Pol 遺伝子を発現するコンストラクトを併せて供給した

場合は複製効率が改善した。また、複製能が有るコンストラクトを Pol のトランス供給用として使用することでも改善が認められた。このことから、複製の効率化には Pol 濃度が重要な因子の一つであることが示唆された。

SLC10A1 の恒常発現細胞の樹立を目指して、レンチウイルスベクターで遺伝子導入した細胞をクローニングし、複数の株を取得した。それらの SLC10A1 発現量をウエスタンブロットで確認した。感染効率の異なる細胞株を選択するために HBV 感染をさせて、感染効率の確認を進めた。

### D. 考察

既報のように、SLC10A1 を細胞に導入することで、感染性が得られることを確認した。今回作製した改変 HBV においても同様の経路で感染することが確認でき、改変 HBV の有用性が伺えた。感染効率を改善する必要があり、ゲノムサイズの最適化、トランスに供給するウイルスタンパク質の量について、来年度以降に検討する必要がある。感染感受性細胞の取得も進めることができ、クローンの中から感染感受性の異なるものを複数樹立することで必要な受容体分子の探索が可能となると考えられる。

### E. 結論

改変 HBV を感染させることに成功した。様々な種類の感染感受性もしくは、非感受性細胞を取得することで、差分解析をすることが可能となる。

### F. 健康危険情報

特に無し.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK.

2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: in vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism of action. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 Jan 15;23(2):503-6.

(2) Sunbul M, Sugiyama M\*, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M. Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subgenotype D1 prevalent in Turkey. *Microbiol Immunol*. 2013 Feb;57(2):122-9. **\*corresponding author**

(3) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; the Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology*. 2013 Jul 29.

(4) Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, Mizokami M, Oubiña JR. In vitro

replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behavior regarding its parental genotypes. *J Gen Virol*. 2013 Dec;94 Pt 12:2724-8.

### 2. 学会発表

#### 国内

1. B型肝炎ウイルス複製に関連する脂質分子の同定とその効果」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 第49回日本肝臓学会総会 シンポジウム 京王プラザホテル 2013年6月7日

#### 国際

2. 「 Polymorphisms consisting of (TA)<sub>n</sub> dinucleotide repeat near IL28B gene could improve the predictive value for HCV spontaneous clearance with IL28B SNPs.」 Masaya Sugiyama, Satoshi Hiramane, Norihiro Furusyo, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, Jun Hayashi, and Masashi Mizokami The 64th Annual Meeting of the AASLD P-1426 Nov 4th 2013 Washington DC
3. 「 Clinical and virological analysis on Hepatitis B virus genotype D」 Masaya Sugiyama, Yasuhito Tanaka, and Masashi Mizokami Symposium. Japan-Taiwan Research Symposium on Hepatitis B. Tokyo, Japan April 14th, 2013
4. 「 Prediction improvement on the effect of interferon-based



therapy and spontaneous clearance  
of hepatitis C using rs72258881  
near IL-28B following rs8099917」  
Masaya Sugiyama, Akio Ido,  
Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi  
Watanabe, Yoshiyuki Ueno,  
Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga,  
and Masashi Mizokami The  
International Liver Congress  
2013: 48th Annual Meeting of EASL

in Amsterdam, P-26th April 2013

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 感染モデル細胞系の樹立

分担研究者 落谷孝広 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野 分野長

研究要旨：スクリーニングに用いる感染細胞の利用については、これまでの研究からヒト初代肝細胞に対する HBV 感染が認められているので、この系を用いて評価を行いつつ、既に樹立されている肝細胞の培養条件を検討し、落谷らは独自に開発した YPAC などの因子（インヒビターカクテル）を用いた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。平成 25 年度の成果は以下の通りである：（1）最終分化を遂げた成熟肝細胞から、小分子シグナル阻害剤刺激下で、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を誘導した。（2）形態的、機能的にも肝細胞様の細胞を分化誘導する事に成功、HBV の受容体とされる NTCP も分化誘導前に比較して 40 倍以上、mRNA 発現量が増大していた

A．研究目的

抗ウイルス薬開発のスクリーニングに用いる感染細胞の利用については、これまでの研究からヒト初代肝細胞に対する HBV 感染が認められているので、この系を用いて評価を行いつつ、既に樹立されている肝細胞の培養条件を検討し、分担研究者らは独自に開発した YPAC などのインヒビター（低分子化合物）を用いた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。

B．研究方法

HBV 感染過程を再現するために最適かつ安定な肝細胞の培養系が確立されていない。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、初期感染過程を標的とした新規治療薬の

開発に有用な細胞系を提供する。具体的には、この 4 種類の低分子化合物の組み合わせを変える事で、最も効率的に、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。

（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。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。

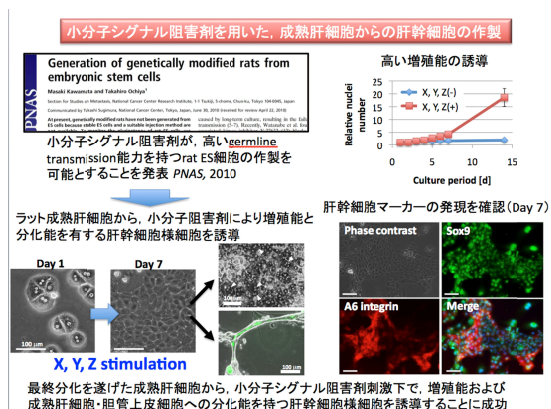
C．研究結果

1) 4 種のシグナル伝達阻害剤カクテル

である YPAC をラット初代培養肝細胞に添加し、その細胞増殖、肝細胞様形態の維持を観察した結果、YPAC 未処理の細胞は培養 1 4 日後には 9 7 % が細胞老化用の形態を示して死滅したのに対し、YPAC 処理群では、正常な染色体数を保ちながら、7 0 % の肝細胞が正常な肝細胞様の形態と生存率を保持しており、YPAC の有効性が示唆された。

2) YPAC 処理によって、成熟肝細胞の指標となる microRNA122 の発現も、培養 1 4 日間に渡って維持されていた。

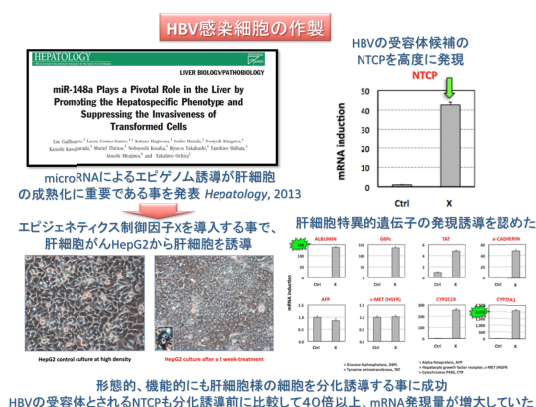
図 1



3) さらに、図 1 に示す様に、小分子阻害剤の組み合わせで誘導された細胞は、肝幹細胞の性質を持ち、最適な環境下で、成熟肝細胞と胆管細胞の二方向性分化能を示した。

4) 本年度の成果として、microRNA148a が、エピゲノムの制御を介して、肝細胞の成熟化を担う事が明らかとなった (*Hepatology*, 2013)。この成果をもとに、エピジェネティクス制御因子 X を導入する事で、肝細胞がん HepG2 から成熟肝細胞の性質を有する細胞を誘導する事に成功した (図 2)。

図 2



#### D. 考察

(1) YPAC の肝細胞形態・機能維持の能力に加えて、インヒビターの組み合わせが、ラット肝幹細胞様に細胞を誘導できる事が明らかとなった。

(2) エピジェネティクス制御因子 X を導入する事で、肝細胞がん HepG2 から成熟肝細胞の性質を有する細胞を誘導する事が可能な事が判明した。この細胞をうまく利用する事で、HBV 感染の初期過程や持続感染を再現できる可能性を検討するチャンスが生まれた。

#### E. 結論

インヒビターによる遺伝子発現変化の誘導が、肝細胞の分化機能維持や長期培養に貢献する可能性が明らかとなった。さらに、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も明らかになった事は大きな成果である。

#### F. 健康危険情報

特に無し。

#### G. 研究発表

1. 論文発表

1.Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T, and Iizasa H. MicroRNAs and oncogenic human viruses (in press). In S. Babashah (Ed.), MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis. Springer. ISBN 978-3-319-03724-0.

2.Thirion M and Ochiya T. Roles of micrnas in the Hepatitis B Virus Infection and Related Diseases. Viruses 2013; 5(11), 2690-703; doi:10.3390/v5112690.

3.Gailhouste L, Gomez-Santos L, Kitagawa N, Kawarahada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi R, Shibata T, Miyajima A, and Ochiya T. MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. Hepatology. 2013; 58(3), 1153-65.

4.Thirion M and Ochiya T. Extracellular microRNAs as potential biomarkers and therapeutic tools in cancer. In MicroRNAs in cancer (pp. 308-332). 2013; Enfield, New Hampshire, Science Publishers.

5.Gailhouste L, Gomez-Santos L, Ochiya T. Potential applications of miRNAs as diagnostic and prognostic markers in liver cancer. Front Biosci, 18:199-223, 2013

6.Gailhouste L, Ochiya T. Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular

carcinoma. Histol histopathol, 28:437-451, 2013

7.Gailhouste L, Ochiya T. MicroRNAs: new tools to tackle liver cancer progression. Cancer Diagnostics, pp 12-14, 2013

## 2. 学会発表

1. 「The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-deriver extracellular vesicles.」、落谷孝広、第20回肝細胞研究会 イブニングセミナー (2013.9.26 大阪)

2. Ochiya T. 「Hepatocyte from other sources of stem cell」。APASL Liver Week 2013, Suntec.Singapore. June 6-10

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

出願名称： ラット胚性幹細胞を用いたキメララットの作製法

出願人：国立がん研究センター；DSファーマバイオメディカル株式会社

発明者 落谷 孝広、川又 理樹

出願日時 平成22年7月23日

出願番号 特願 2010-166571

### 2. 実用新案登録

なし

### 1. 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 感染を阻害する低分子化合物のスクリーニング

長田 裕之（理研 環境資源科学研究センター 副センター長）

研究要旨：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を用いて新規抗 HBV 薬を探索する。この探索においては、HBV の感染初期過程を高感度に検出できる感染モデル系を利用し、従来の治療薬（インターフェロンや核酸アナログ）とは作用点が異なる新たなタイプの HBV 治療薬の開発を目的とする。研究前期（H24-25）は微生物生合成遺伝子改変技術やフラクシオンライブラリー、表現型スクリーニング基盤を利用し、新規天然化合物の創製を行う。研究中期（H26-）から HBV 様擬粒子を用いたスクリーニングを実施し、阻害活性を示す化合物をバイオプローブとしたケミカルバイオロジー研究を展開する。これら一連の研究を通じて、HBV 治療に資する候補化合物の創製と新規創薬標的（HBV 受容体など）の提示を目指す。

A. 研究目的

HBV 感染阻害物質の探索を実施するためには、多様性に富んだケミカルライブラリーが必要である。またそのようなライブラリー構築には、質の高い化合物群と構造や活性情報が充実したデータベースやデータマイニング技術、などの創薬基盤の整備が不可欠である。本年度は、微生物生合成遺伝子改変技術やフラクシオンライブラリーを用い、天然化合物の収集を加速する。また細胞表現型を利用して薬剤の作用機序解析を実施し、HBV 感染阻害薬探索に資する化合物ライブラリーの整備・拡充を行う。

B. 研究方法

化合物ライブラリーの整備を目的とし、天然化合物の網羅的な収集と細胞形態変化を指標とした作用機序解明を計画した。では、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 を用いて新規天然化合物を探索した。では細胞形態変化データベース「モルフォベース」を利用し、で取得した天然化合物の作用機序を検証した。また計画に先行して HBV 様擬粒子を用いたパイロットスクリーニングを実施した（実施場所：国立国際医療研究センタ

ー）。NanoLuc 遺伝子を導入した組換え HBV 粒子を PXB 細胞に感染させ、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）のウイルス感染阻害活性を評価した。

（倫理面への配慮）

遺伝子組み換え生物等の使用に際しては、理研の定める細則や指針を遵守した。

C. 研究結果

天然化合物の網羅的な収集

微生物代謝産物を系統的に収集したフラクシオンライブラリーと天然化合物データベース NPPlot を用いた新規天然化合物探索を実施し、ピロリジジノン系新規代謝産物ピロリジラクトン（Nogawa et al）や新規キノマイシン類縁体（Lim et al）など、様々な新規物質を取得した。

ピロリジラクトンの作用機序解析

細胞形態変化データベース「モルフォベース」を用い、ピロリジラクトンの作用メカニズムを解析した。ピロリジラクトンはトリプシン活性を選択的に阻害する新たなタイプのプロテアソーム阻害剤であった（Futamura et al）。

HBV 擬粒子を用いたスクリーニング

NPDepoから提供された標準化合物についてウイルス感染阻害活性を評価した。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、抗ウイルス物質を含む11化合物で顕著な活性が見られた。HBVの生活環を考えると、ヒットが予想される化合物群であり、本評価系がワークしていることが示唆された。

#### D. 考察

研究前期にHBV感染阻害薬の探索源に資する化合物を3万種類以上整えることをマイルストーンとしていた。今年度までに様々な新規微生物代謝産物を見出すと共に植物エキスのフラクションライブラリー作製も順調に進み、計画通りにサンプルの準備を整えた。さらにHBV擬粒子を用いた評価系の検証を実施し、大規模スクリーニングを開始するめどをつけた。

#### E. 結論

生合成遺伝子改変微生物やフラクションライブラリーからの新規代謝産物取得、微生物培養物や植物エキスのフラクションライブラリー作製により、化合物ライブラリーを整備・拡充し、抗HBV薬のスクリーニング体制を整えた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nogawa T, Kawatani M, Uramoto M, Okano A, Aono H, Futamura Y, Koshino H, Takahashi S, Osada H. Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite produced by a fungus. *J Antibiot*, 66: 621-3, 2013
- 2) Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Aono H, Nogawa T, Osada H. Identification of a molecular target of a novel fungal metabolite, pyrrolizilactone, by phenotypic profiling systems. *ChemBioChem*, 14: 2456-63, 2013
- 3) Lim CL, Nogawa T, Uramoto M, Okano A, Hongo Y, Nakamura T, Koshino H, Takahashi

S, Ibrahim D, Osada H. RK-1355A and B, novel quinomycin derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library based on NPPlot screening. *J Antibiot*, in press. doi: 10.1038/ja.2013.144.

##### 2. 学会発表

- 1) 長田裕之, 二村友史, 室井誠「細胞形態とプロテオーム変化を指標にした新規抗がん剤の分指標的予測」第17回日本がん分子標的治療学会学術集会, 京都, 6月, 2013
- 2) 川谷誠, 青野晴美, 二村友史, 室井誠, 渡辺信元, 長田裕之「糸状菌由来新規抗がん活性物質 pyrrolizilactone の標的同定」第17回日本がん分子標的治療学会学術集会, 京都, 6月, 2013
- 3) Lim CL, 野川俊彦, 浦本昌和, 岡野亜紀子, 本郷やよい, 中村健道, 越野広雪, 高橋俊二, Ibrahim D, 長田裕之「Isolation of novel bioactive compounds from fraction library of microorganisms based on NPPlot screening」第55回天然有機化合物討論会, 京都, 9月, 2013
- 4) Osada H. "Isolation of New Microbial Metabolites for Natural Product Depository (NPDepo)" 2<sup>nd</sup> Annual Conference ICBS2013, 京都, 10月, 2013
- 5) Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Aono H, Osada H. "Development and utilization of a cell morphology database, MorphoBase, for drug target identification" AACR-NCI-EORTC International Conference Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston, Oct 2013.
- 6) 長田裕之「抗がん剤のケミカルバイオロジー」第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 10月, 2013
- 7) 二村友史, 川谷誠, 室井誠, 青野晴美, 長田裕之「モルフォベースを利用した抗がん剤探索: 特異な線状構造体を誘導する NPD4152 の発見」第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 10月, 2013

#### 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

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

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
Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dainsako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N.,	PML tumor suppressor protein is required for HCV production.	Biochem Biophys Res Commun	430	592-597	2013
Abe Y, Aly HH, Hiraga N, Imamura M, Wakita T, Shimotohno K, Chayama K, Hijikata M.	Thromboxane A2 Synthase Inhibitors Prevent Production of Infectious Hepatitis C Virus in Mice With Humanized Livers.	Gastroenterology.	145	658-667	2013
Nishitsuji H, Funami K, Shimizu Y, Ujino S, Sugiyama K, Seya T, Takaku H, Shimotohno K.	Hepatitis C Virus Infection Induces Inflammatory Cytokines and Chemokines Mediated by the Cross Talk between Hepatocytes and Stellate Cells.	J. Virol	87	8169-8178	2013
Thirion M, Kanda T, Murakami Y, Ochiya T, and Iizasa H.	MicroRNAs and oncogenic human viruses (in press). In S. Babashah (Ed.), MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis.	Springer.		ISBN 978-3-319-03724-0.	in press
Thirion M and Ochiya T.	Roles of micromas in the Hepatitis B Virus Infection and Related Diseases.	Viruses	5(11)	2690-703	2013

Gailhouste L, Gomez-Santos L, Kitagawa N, Kawahada K, Thirion M, Kosaka N, Takahashi R, Shibata T, Miyajima A, and Ochiya T.	MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatocarcinoma specific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells.	Hepatology	58(3)	1153-65	2013
Thirion M and Ochiya T.	Extracellular microRNAs as potential biomarkers and therapeutic tools in cancer. In MicroRNAs in cancer	Enfield, New Hampshire, Science Publishers.		308-332	2013
Gailhouste L, Gomez-Santos L, Ochiya T.	Potential applications of miRNAs as diagnostic and prognostic markers in liver cancer.	Front Biosci	18	199-223	2013
Gailhouste L, Ochiya T.	Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular carcinoma.	Histol histopathol	28	437-451	2013
Gailhouste L, Ochiya T.	MicroRNAs: new tools to tackle liver cancer progression.	Cancer Diagnostics		12-14	2013
Rawal RK, Singh US, Chavre SN, Wang J, Sugiyama M, Hung W, Govindarajan R, Korba B, Tanaka Y, Chu CK.	2'-Fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine phosphoramidate (FMCAP) prodrug: in vitro anti-HBV activity against the lamivudine-entecavir resistant triple mutant and its mechanism	Bioorg Med Chem Lett.	15	2013	in press
Sunbul M, Sugiyama M*, Kurbanov F, Leblebicioğlu H, Khan A, Elkady A, Tanaka Y, Mizokami M.	Specific mutations of basal core promoter are associated with chronic liver disease in hepatitis B virus subtype D1 prevalent in Turkey.	Microbiol Immunol.	201	122-129	2013



Ito K, Yotsuyana gi H, Yatsuhashi H, Karino Y, Tum akikawa Y, Saito T, Arase Y, Imte azeki F, Kurosaka i M, Umemura T, Ichida T, Toy	Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults.	Hepatology	59	89-97	2013
Trinks J, Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, Mizokami M, Oubiña JR.	In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behavior regarding its parental genotypes.	J Gen Virol.	12	2724-2728	2013
Nogawa T, Kawatani M, Uramoto M, Okano A, Aono H, Futamura Y, Koshino H, Takahashi S, Osada H.	Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite produced by a fungus.	<i>J Antibiot</i>	66	621-623	2013
Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Aono H, Nogawa T, Osada H.	Identification of a molecular target of a novel fungal metabolite, pyrrolizilactone, by phenotypic screening.	<i>ChemBioChem</i> .	14	2456-2463	2013
Lim CL, Nogawa T, Uramoto M, Okano A, Hongo Y, Nakamura T, Koshino H, Takahashi S, Ibrahim D, Osada H.	RK-1355A and B, novel quinomycin derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library based on NP-144. Plot screening.	<i>J Antibiot</i> , in press. doi:10.1038/ja.2013.144.			In press