

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： B型肝炎ウイルス感染受容体の分離・同定と感染系の樹立及び感染系による病態機構の解析と新規抗 HBV 剤の開発
2. 研究開発代表者： 上田啓次（国立大学法人 大阪大学）
3. 研究開発の成果
  - (1) HBV の preS1~HBsN 末 (PS1-SSN) と相互作用因子として分離・同定した HBV-RX1 が、preS1 (2-47aa) と結合することを確認した。
  - (2) NTCP 発現 HepG2 細胞における HBV-RX1 のノックダウンにより HBV 感染性は低下し、HBV 生活環における機能が示唆された。また HBV-RX1 機能阻害剤が HBV 感染を抑制することから HBV-RX1 が治療標的になり得ることを見出した。
  - (3) NTCP 発現 HepG2 細胞株 HBV 感染系を用い、Digitalis 類に抗 HBV 活性を見出し、誘導体を作製し、抗 HBV 活性を解析した。
  - (4) いくつかの CDK inhibitor の抗 HBV 活性を解析し、その一つ (FIT-039) に抗 HBV 活性があり、感染後の投与でも抗 HBV 活性があることがわかった。
  - (5) Myr 化 BNC と非 Myr 化 BNC のヒト肝臓細胞表面結合能解析から、NTCP は細胞表面では機能していない可能性が高いことがわかった。
  - (6) HBV がエンドソームから細胞質へ脱出するステップ (脱殻ステップ) で、エンドソーム膜と相互作用する HBV 側膜透過ドメインを同定した。
  - (7) iPS 細胞より分化誘導した肝細胞を用いた HBV *in vitro* 感染系を確立し、NTCP 発現する時期に HBV 感染は成立しないこと、すなわち、NTCP 発現のみでは HBV 感染は成立しないことが示唆された。
  - (8) HepG2 細胞膜を免疫したマウスから得たモノクローナル抗体 4000 種のうち、4 種に HBV 感染中和活性を認めた。このうちクローン AI5-20 は、ヒト特異的であり、NTCP 以外の分子を認識している。NTCP 以外にも HBV 感染に関わる膜分子が存在することがわかった。
  - (9) コアフコースの増減によって NTCP との結合に差がでるタンパクの同定を試み、ミオシン 9 (MYH9) を同定した。MYH9 はコアフコースを減少させることにより、NTCP との結合活性が低下する。また、Fut8 をノックダウンすると、NTCP と MYH9 の結合は著しく減弱することを確認した。
  - (10) 擬似 HBV 粒子 (BNC) の表面糖鎖構造を 90% 以上の効率で改変することに成功した。
  - (11) トリミングした糖鎖の BNC は、宿主細胞への取り込み効率が増加することが解った。
  - (12) HBV 発現細胞と PBMC の共培養では、NK 細胞の活性化 (細胞傷害能、CD107a 発現、IFN- $\gamma$  発現) が抑制されること、HBV 発現細胞と NK 細胞単独での共培養における NK 細胞の活性化には、CD8 陽性 T 細胞が重要であり、cell-cell contact が関与している可能性が示唆された。
  - (13) B 型急性肝炎患者では ALT 極期と同時に IDO 活性が亢進しており、その後 HBs 抗原の消失とともにケモカイン、サイトカインが連続的に活性化する。一方、B 型慢性肝炎の急性増悪期には、ALT やケモカインが上昇しても IDO 活性は上昇せず、HBs 抗原量も低下しないことから、HBV 初感染の際の HBV 排除に IDO 活性の亢進と、それに続く自然免疫、獲得免疫の活性化が重要であること、すなわち、IDO 活性上昇は HBV 排除の免疫反応の Indicator であることが明らかになった。
  - (14) NTCP 発現 HepG2 感染系を用いた HBV 感染で、miRNA を含む遺伝子の発現変動 (増加 21、減少 40、20 の新規遺伝子を含む) を確認した。この変動は初代培養肝細胞感染系でも同様であった。
  - (15) 大腸菌発現精製 HBVpol-RT の 96 ウェルプレートによる活性測定系を確立し、タンパク量依存的、反応時間依存的な活性の増加を確認した。本アッセイ系を用いて 1280 化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、幾つかの活性を阻害する薬剤を見出した。
  - (16) HBVpol 末端蛋白 (HBVpol-TP) の発現・精製に成功した。
4. その他  
特になし