

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：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
2. 研究開発代表者：下遠野 邦忠（国立国際医療研究センター、肝炎免疫研究センター）
3. 研究開発の成果

培養細胞を用いて HBV 複製を簡便に評価する系を開発した。特に感染初期を簡便に解析する方法がない為に、感染初期過程を評価する系の開発に注力した。また、得られた評価系を用いて、HBV が感染し易い細胞の探索、HBV 増殖を制御する宿主因子の探索、HBV 増殖を阻害する低分子化合物の探索等も行った。得られた成果は以下の通りである。

### (1) 蛍光発光遺伝子を発現するレポーター-HBV の構築とその改良。

蛍光遺伝子として NanoLuc 遺伝子を持つ HBV 様粒子 (HBV/NL) 産生系を構築し、それが感染初期過程を忠実に反映する事を明らかにした (Cancer Sci., 2016)。本 NL は感染細胞内に留まる為に、蛍光を測定するには感染細胞を殺して抽出液内の酵素活性を測定する必要があるために、経時的に活性を調べるには向いていない。そこで、蛍光蛋白質が細胞外に分泌される系を開発した。シグナルペプチド配列を NL 遺伝子に付加した secNL を HBV ゲノムに挿入する事により得られたレポーター-HBV (HBV/secNL) を感染させる事により、感染細胞の培養上清中に NL 活性が認められた。この系を用いる事により感染細胞の経時的評価が簡便化され、大量スクリーニングが一層容易になった。

### (2) HBV に感染し易い細胞の探索と構築。

これまでに樹立されている種々の肝臓由来細胞への HBV 感染性を HBV/NL を用いて評価した。細胞の種類により違いが認められるが、多くは感染性が低かった。一方、HBV 受容体遺伝子 (NTCP) を導入した細胞の一部では、感染性が認められたが、NTCP を発現させても HBV が感染しない (あるいは複製しない) 細胞においては、HBV の感染、複製に必要な要因が欠失している可能性が考えられるので、それらの細胞の解析から HBV 生活環の分子機構が明らかにされる可能性が考えられた。また、iPS 細胞を用いて肝細胞に分化誘導させた時の HBV 感染性の変異性の解析を HBV/NL 系を用いることにより容易にした。さらに、通常は感染しない HepG2 をリプログラミングの技術によりヒト幹細胞様の状態にする事により、HBV 感染が成立し易い状態まで変化させる事に成功した。

### (3) レポーターウイルスを用いた HBV 増殖を制御する宿主因子の探索。

HBV/NL を用いた感染評価系を用いて、約 20,000 遺伝子を解析し、約 100 種類の遺伝子が HBV 感染/複製の制御に関わる事を明らかにした。それらの多くの遺伝子はこれまで HBV 生活環との関連が明らかにされていないものであることから、本研究で開発したレポーター-HBV の系が、HBV 感染を評価する系として有用である事が分かった。

### (4) レポーターウイルスを用いた HBV 増殖を制御する低分子化合物の探索。

市販の生理活性を有する低分子化合物約 2,000 種類をスクリーニングして、その中に HBV 感染を阻害する物質を数種類見いだした。その中には細胞膜蛋白質を標的にする薬剤も存在した。

### (5) HBV に感染し易い細胞内の遺伝子発現プロファイル解析。

HBV 感染に影響を与える宿主遺伝子発現を単細胞の遺伝子発現プロファイル法で解析した。これまでに数種類の細胞膜蛋白質発現と HBV 感染性との間に相関がある事を見いだした。

### (6) 天然物化合物由来化合物中の抗 HBV 活性因子の探索。

理化学研究が所有する NPDepo の化合物ライブラリーの中から従来の治療薬 (インターフェロンや核酸アナログ) とは作用が異なる新規抗 HBV 剤を HBV/NL を用いて大規模スクリーニングし、候補物質を複数取得した。