

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究
2. 研究開発代表者： 脇田 隆宇（国立感染症研究所 副所長・ウイルス第二部部长）
3. 研究開発の成果

本研究は新規 HBV 治療薬開発に向けて、HBV の感染複製増殖機構の解明を目指している。新規標的の同定、新規アッセイ系確立、アッセイのハイスループット化、化合物の大規模スクリーニング、宿主因子同定、発癌や他の病原性発現に係る新規分子機構の解明などを目指して研究を進めた。本年度の研究成果をまとめた。

1. ウイルス生活環の制御因子同定：HBV 増殖に関与する宿主因子として、ユビキチン E3 リガーゼ BUL1、Cullin-5、細胞周期を制御するフォスファターゼ CDC25C、HIV-1 インテグラーゼ結合因子 LEDGF/p75、ESCRT 関連因子 Vps28 及び Vps37A を同定した。HBV 蛋白発現時には、G0/G1 期の細胞が多く認められ、細胞周期や細胞分化が制御されていた。

2. 初期感染過程の解析：HBV 受容体 NTCP に結合する低分子化合物スクリーニングにより、HBV 感染を阻害する新規骨格を 3 つ同定した。HBV 受容体 NTCP に結合する特殊環状ペプチドを RAPID システムによりスクリーニングし、HBV 感染を強く阻害する環状ペプチドを同定した。この中には NTCP 本来の胆汁酸取り込み活性は阻害しないものがあった。

3. 遺伝子発現および転写機構、インテグレーション機構の解析：HBV PRE 結合因子 AUF1、hnRNPU による HBV 転写後制御機構を明らかにした。新たな HBV 転写後制御因子 PUF60 を見出した。I 型インターフェロン誘導性の抗ウイルス因子 Tetherin に対し HBs 蛋白質が拮抗的に働く新規機構を解明した。HBs 非結合型 Tetherin を発現した iPS 由来成熟肝細胞では極めて高い HBV 抑制能を示した。改変型抗ウイルス因子を肝細胞へ導入しウイルス抵抗性肝細胞を創るという細胞療法に向けた新たなコンセプトを提示した。

4. ウイルス蛋白質発現、機能および構造の解析：抗 HBV 活性を有する amodiaquine 誘導体を合成展開し、細胞毒性が低い化合物を同定した。また pyrimidotriazinone 誘導体はカプシド蛋白形成により抗 HBV を示した。HBV 逆転写酵素と RNase H の生化学的特徴を決定した。逆転写酵素は基質に対する親和性が低いため、基質アナログの阻害効果が低いことと、ウイルス粒子中ゲノムが DNA-RNA ハイブリッドになっていることを初めて科学的に説明した。HBV-RT 阻害剤スクリーニング系を開発し、HBV RNase H スクリーニング系とともにスクリーニングを実施する。HBV TP、逆転写酵素、RNase H の変性条件下での精製法を確立した。

5. HBx 抗原の発現、機能、構造の解析：HBx と相互作用する新規細胞側因子として、JMJD5 を同定した。JMJD5 と HBx は特異的に結合し、JMJD5 の 135 番目のグリシンがグルタミン酸への変異で HBx との相互作用が失われ、HBV 複製をサポートしなくなる。DNA マイクロアレイ解析により、HNF4A 等の遺伝子の発現に JMJD5 が関与していた。HBx 蛋白による NF- κ B シグナル伝達経路活性化を阻害する化合物を同定した。また、精製 GST-HBx 蛋白に結合する化合物のスクリーニングを行っている。組み込み HBx とヒト遺伝子との融合蛋白が肝細胞の癌化・癌の進展に重要だが、ATF4、ATF6 を介した ER stress 応答の抑制が関与している。

6. 病原性解析、線維化、オートファジーの影響：薬剤誘導性に肝細胞に HBV 全タンパク質を発現する Tg マウスを用いて、HBV に対する免疫応答反応を解析した。HBV に対する免疫応答を惹起するモデルマウス系により、HBV 排除に関わる宿主因子を特定した。HBV 感染ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内ストレス誘導・線維化には、免疫系の関与が考えられた。線維化機序を解析するため、肝細胞癌を発症することで知られる Large HBs 抗原発現 Tg マウスを導入した。

7. 新規治療法開発：B 型慢性肝炎患者に対する HBs・HBc 抗原治療ワクチン第三相臨床試験のワクチン投与終了後 2 年の観察期間が終了した。PEG-IFN 投与群と比較して、治療ワクチン群では、安全性、抗ウイルス効果、抗線維化効果が優れていた。治療ワクチンの著効群と無効群を比較すると、著効群は無効群と比較し、より強力な HBV 特異的な免疫反応がみられた。

8. 新規抗体作成：新規 NTCP 抗体を樹立した。細胞表面 NTCP を認識でき、FACS や免疫染色で有用である。また、高い HBV 侵入阻害活性をもつ HBs 抗体 Clone 33 の Fc 領域をヒトに置換したキメラ抗体を作成した。本キメラ抗体では抗 HBV 活性が維持された。

9. ヒト iPS 細胞由来肝芽を用いた新規 HBV 感染系：ヒト iPS 肝芽を用いて、新たな HBV 感染系を構築した。従来のヒト iPS 細胞由来肝細胞を用いた感染系と比較して、培養上清中に数十倍のウイルスが放出された。

10. 薬剤耐性 HBV 解析：ETV 耐性に関与している新規 HBV 変異を同定した。この耐性ウイルスによる薬剤感受性評価法は、薬剤耐性機序の同定や効果的な薬剤のスクリーニングに有用である。