

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659091

研究課題名（和文）HBV pseudotype による感染性を指標にした HBV 感染受容体の同定戦略

研究課題名（英文） A strategy for the identification of HBV receptors with HBV pseudotype

研究代表者

上田 啓次 (UEDA KEIJI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00221797

研究成果の概要（和文）：

本申請ではHBV pseudotypeの作製に成功し、感染性を指標にした新たなアッセイ系を用いてウイルス学上の最大の難問に挑んだ。

I) HBV pseudotype (HBV 膜粒子を被った *gfp* 遺伝子を含むレトロウイルスゲノムをもつ pseudotype ウイルス ; HBV-p) の作製に向けたパッケージング細胞と HBVp 産生系の確立。

a) パッケージング細胞の樹立. レトロウイルスゲノム産生ベクター (HyTc-*gfp*) 及び *gag-pol* 発現ベクター (*gp*) を培養細胞株へトランスフェクションし *gfp* 及びハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hygR*) をもつレトロウイルスゲノムを産生するパッケージング細胞を樹立した。

b) パッケージング細胞の活性の検討. a) で作製したパッケージング細胞で VSV-G pseudotype の作製を試みパッケージング細胞として活性をもつかどうかを検討した-すなわち、本細胞へ VSV-G 発現ベクターをトランスフェクションし、培養上清中に出現した VSV-G pseudotype を全く別の培養細胞株への感染性を検討した。

c) HBV-p 産生能の検討. 本パッケージング細胞へ HBV 粒子膜蛋白遺伝子発現ベクターをトランスフェクションし、分泌されるウイルス粒子を PEG 沈殿法、超遠心法、抗 HBs 抗体を用いた免疫沈降法などで回収し、粒子内ゲノム (RNA) を抽出する。RT-PCR 法による粒子内ゲノム *gfp* を標的とした RT-PCR 法で検討した。

d) HBV-p 産生効率の検討. GFP 産生を指標にトランスフェクション効率を評価し、トランスフェクションの最適化を図りつつ、産生量を定量 PCR 法で検討した。

II) HBV-p を用いた感染性を指標にした HBV 感染受容体のスクリーニング. レトロウイルス cDNA ライブラリーを HBV-p により、スクリーニングしたが、結果的にはまだ感染受容体の候補因子は見つかっていない。しかしながら、本実験過程で、肝癌由来培養細胞株に非活性型の受容体の存在が示唆される結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

It is near a half century since hepatitis B virus (HBV) was identified. An iceberg of HBV receptor has not been elucidated, though there are some reports on infection systems and on the receptor molecules. Thus, we still have not reached finding a real HBV receptor and there have been no useful and convenient infection system in vitro and in vivo for HBV, which makes it impossible for us to understand a precise HBV life cycle and HBV involved related diseases. Here, we designed and tried to generate an HBV pseudotype, which had a viral particle containing a retrovirus capsid and a genome inside surrounded by HBV membrane proteins. We proved successful generation of this pseudotype by immunoprecipitation with anti-HBVs antibodies and by CsCl density gradient ultracentrifugation, followed by RT-PCR targeting a retroviral gene, a *GFP* gene in this case, respectively. Though our established system is constructed on growth dependent integration of retroviral genomes and thus was very hard to observe its infection in a primary human hepatocytes culture system, successful generation of the HBV pseudotype will make it possible for us to perform a biological assay to clone an HBV receptor based

on infectivity and will facilitate its separation and identification.

We have not identified an HBV receptor candidate yet. It has been suggested, however, that there could be an attachment factor in ordinary cultured cell lines derived from hepatocellular carcinomas.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,700,000 | 360,000 | 3,060,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス、pseudotype、感染受容体

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス（HBV）はその発見から40年余経つが未だにその有効な感染系は存在せず、HBVレセプターはおろかHBV感染病態発症（急性肝炎、慢性肝炎、肝がん）機構の詳細は不明のままである。

2. 研究の目的

HBV感染受容体を分離・同定し、簡便な感染系の樹立を図ることを目的とする。

3. 研究の方法

これまででない新手法として、HBV pseudotypeの作製し、生物学的アッセイ法によるHBVレセプターの分離・同定を試み、それを利用して感染系の構築し病態発症機構の解析や治療法開発への応用を目指す。

4. 研究成果

HBV pseudotypeの作製に成功した。レトロウイルスcDNAライブラリーをHBV-pにより、スクリーニングしたが、結果的にはまだ感染受容体の候補因子は見つかっていない。しかしながら、本実験過程で、肝癌由来培養細胞株に非活性型の受容体の存在が示唆される結果を得た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

1. Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. “Kaposi’s sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell

transformation. ” In-Tech ” Herpesviruses”, Magel, D. G. and Tyring, S., ed., ISBN 978-953-51-0186-4 in press. 2012. 査読有

2. Ohsaki, E. and Ueda, K. “Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency. ” Frontiers in Virology. in press. doi: 10.3389/fmicb.2012.00007. 査読有

3. Noma, S., Ohya-Shimada, W., Kanai, M., Ueda, K., Nakamura, T., Funakoshi, H. “ Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7. ” Neuroscience Res. in press. 10.1016/j.neures.2012.03.001. 査読有

4. 上田啓次. HHV-8 「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会（編集）2012. 査読無
 5. 上田啓次. B型肝炎のウイルス学. 化学療法の領域（印刷中）2012. 査読無
 6. Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. “Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman’s Disease; Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II.” *Virology* 425:95-102, 2012.
doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.008 査読有
 7. Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. “Characterization of Kaposi’s sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis.” In “Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). in press.
doi:10.4061/2011/726964 査読有
 8. Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., Watanabe, S. “KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile.” *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 394: 482-487, 2010. 査読有
 9. Suzuki, T., Isobe, T., Kitagawa, M., and Ueda, K. “Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA positively affects on ubiquitylation of p53.” *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403: 194-197, 2010 査読有
 10. 上田啓次. ヘルペスウイルス学のエッセンス 化学療法の領域 26:265-270, 2010. 査読無
 11. 上田啓次. STEALTHING, PERSISTINGウイルスの謎「潜伏感染と再活性化」化学療法の領域. 上田啓次（企画）26:1178-1179, 2010. 査読無
 12. 上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）の潜伏感染、再活性化と病態. 化学療法の領域 26:1218-1226, 2010. 査読無
 13. 上田啓次. B型肝炎ウイルスレセプターの謎. *Hepatoday* No. 23, 12, 2010. 査読無
- [学会発表]（計6件）
1. 上田啓次、大崎恵理子、中野和司. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）潜伏感染における潜伏感染特異的遺伝子の発現機構の解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7～10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
 2. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. HIF-2 α によるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）がコードするviral interferon regulatory factor 3 (vIRF-3)の発現制御機構の解析. 第33回日本分子生物学会

年会. 2010年12月7～10日. 神戸ポートアイランド、神戸.

3. 大崎恵理子、中野和司、上田啓次. KSHV ゲノムの複製・分配に關与するLANAの細胞内局在動態解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7～10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
4. 上田啓次、大崎恵理子、中野和司. 培養細胞におけるB型肝炎ウイルスの感染能. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7～9日. あわぎんホール、徳島.
5. 大崎恵理子、中野和司、上田啓次. KSHV LANAの細胞内局在と複製・分配メカニズムとの関連動態解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7～9日. あわぎんホール、徳島.
6. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスの ν IRF-3/LANA2の発現制御機構の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7～9日. あわぎんホール、徳島.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 啓次 (UEDA KEIJI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00221797

(2) 研究分担者

中野 和司 (NAKANO KAZUSHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00521725

大崎 恵理子 (OHSAKI ERIKO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50447801