

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08981

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスの生活環に利用される小胞輸送経路の解明とその治療応用

研究課題名(英文) Analysis of vesicle trafficking pathways utilized for the life cycle of hepatitis B virus and its application for therapies

研究代表者

井上 淳 (INOUE, Jun)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：60455821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルスが肝細胞内で複製されるメカニズムを明らかにするため、細胞内で小胞輸送の分子スイッチとして働くRabファミリータンパク質について検討すると、Rab5BがB型肝炎ウイルスの放出を大きく制御していることが明らかになった。ウイルスの感染性エンベロープ形成にはLHBsが必要であるが、Rab5BはLHBsの小胞体から多胞体への輸送に関与していることや、HBVのmRNAの転写にも関与していることが明らかとなった。この成果はさらにB型肝炎の病態形成メカニズムの解明や治療応用につながる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of hepatitis B virus (HBV) replication in hepatocytes, we analyzed the involvements of Rab protein family that works as molecular switches in the vesicle trafficking. As a result of screening, it was revealed that Rab5B regulates the release of HBV significantly. Rab5B enhances the transport of LHBs, which is required for the formation of infectious envelope, from ER to multivesicular body (MVB). Also, Rab5B regulates the transcription of 2.4/2.1 kb mRNA of HBV via hepatocyte nuclear factor 4a. It is considered that the results of this study could lead to the elucidation of hepatitis B mechanisms and the possible application for the novel antiviral treatments.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：HBV Rab5B

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)感染は全世界に広がっている感染症であり、約20億人がHBVに暴露されたことがあると推定され、そのうち約4億人が慢性感染となっておりと考えられている。日本では約150万人の慢性感染者がいるとされ、その約10%が慢性肝炎を発症し、約3%が肝硬変や肝臓に進行していると推定されている。同じく肝硬変や肝臓の原因となるC型肝炎ウイルス(HCV)については近年の治療法の進歩により、ほとんどの患者でウイルス排除が可能となったが、それに比べるとB型肝炎の治療は遅れをとっている。近年のHCVによる肝臓の発生は低下傾向にあるが、HBVによる肝臓の発生が低下していないことは対策の必要性を示している。HBVの慢性感染者は核酸アナログ製剤の内服中はHBVの増殖が抑制されているが、中止すると高率に肝炎を再燃するため、多くの患者が長期間の内服を余儀なくされている。C型肝炎で高い効果を示したペグインターフェロンもB型肝炎に対して承認されているものの、満足した治療効果が認められるのは一部の患者のみであり、新たな治療法の確立が急務である。

HBVは様々な細胞の機能を利用して細胞に侵入し、細胞内で複製されて放出されるという生活環を形成するが、その過程には明らかになっていない部分が多く存在する。この生活環のメカニズムを詳細に検討することで、新たな治療ターゲットの解明につながる可能性が高いと思われる。最近、HBVのレセプターがsodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)であることが同定され(Yan et al., *eLife* 2012)、HBVの細胞内への侵入機構についての研究が多くの研究室で行われているが、HBVが細胞内へ侵入した後どのように輸送されてゲノムを核内に運ぶか、あるいは翻訳されたHBVタンパク質がどのように輸送されて組み立てられ、そしてどのように放出されるかという細胞内でのHBVの輸送経路についてはほとんど明らかになっていない。

申請者はこれまで、B型肝炎の難治性病態を明らかにするため、劇症肝炎患者や薬剤耐性患者のHBVに認められた変異がHBVの複製に与える影響について、主に培養細胞を用いて研究を行ってきた。また、2011年から2014年にかけての米国留学中にはHBVと宿主細胞との関係について研究を行った。その中で、細胞内の小胞輸送システムの分子スイッチとして考えられている低分子量GTPaseのRabタンパク質ファミリーの一つであるRab7が

HBV放出を抑制する方向に働いていることを明らかにした。HBVを発現する細胞において、HBVは多胞体やオートファゴソーム内に存在していたが、Rab7はこれらのオルガネラから伸びる管状構造を形成させ、これらがライソソームと融合することでHBVを分解する方向に向かわせていた。しかも、Rab7はHBV感染により有意に活性化されていたことから、HBVが自身の放出を制御しているという新しいメカニズムが明らかとなった(Inoue et al., *J Cell Sci* 2015)。

Rabタンパク質ファミリーはヒトでは60種類以上存在することが明らかとなっており、様々な小胞輸送の場面で異なるRabタンパク質がスイッチとして働いていると考えられている。一般的に、Rabタンパク質にGTPが結合するとRabタンパク質のスイッチ領域に構造変化が生じ、エフェクタータンパク質が結合できる活性化状態となり、GTPが加水分解されてGDPとなると不活性化状態となる。この活性の制御はRabタンパク質毎に異なるグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)およびGTPase活性化タンパク質(GAP)が行っている。HBVとRabタンパク質ファミリーについては申請者らの研究の他は、HBVの感染成立にRab5とRab7が必要であるという報告が一つあるのみであり(Macovei et al., *J Virol* 2013)、ほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究ではHBVの生活環におけるRabタンパク質ファミリーの役割を網羅的に検討し、HBV感染症の新たな治療法開発の基盤となる研究を行うことを目的とする。

- (1) HBVの複製から放出の過程に必要とされるRabタンパク質を同定し、HBVの生活環中期から後期の輸送経路を明らかにする。
- (2) HBVの有無によるRabタンパク質の発現や活性の変化を比較し、そのメカニズムを解析することで、HBVがどのようにRabタンパク質や関連する輸送経路を利用しているのかを検討する。

3. 研究の方法

- (1) HBV恒常発現株であるHepG2.2.15細胞を用いて、Rabファミリータンパク質をターゲットとしたsiRNAライブラリーを用いたノックダウンを行い、培養上清中に放出されたHBV DNAとHBs抗原を測定し、これらが大きく変化するRabタンパク質をスクリーニングする。
- (2) ノックダウンにより培養上清へのHBV放

出が大きく変化した Rab タンパク質について、細胞内でのウイルスタンパク質との共局在を共焦点蛍光顕微鏡を用いて検討し、ノックダウンによるウイルスタンパク質の局在の変化も検討する。

(3) Rab タンパク質のノックダウン後に培養上清中に放出された HBV の感染性について、NTCP 発現 HepG2 を用いて確認する。また、ウイルスのエンベロープの有無についてシヨ糖密度勾配遠心法によるウイルス浮上密度を測定して検討する。

(4) Rab タンパク質のノックダウンによる HBV 放出の変化のメカニズムについて検討するため、細胞内のウイルスのタンパク質、RNA、DNA 量を測定する。

4. 研究成果

(1) Rab タンパク質をターゲットとした siRNA のスクリーニングにより、61 の Rab タンパク質の中で Rab5B をノックダウンすると最も培養上清中の HBV DNA が増加することが分かった。

(2) Rab5B のノックダウン後に増加した HBV DNA はエンベロープを有した感染性 HBV 由来であった。

(3) Rab5B をノックダウンして細胞内のタンパク質を western blot で検討すると、エンベロープタンパク質のうち large HBs (LHBs) が著明に増加しており、これをコードする 2.4/2.1 kb mRNA の転写の亢進が一つの機序となっていると考えられた。その原因として、Rab5B のノックダウンによる hepatocyte nuclear factor (HNF) 4a の転写亢進が考えられた。

(4) LHBs は小胞体 (ER) から多胞体 (MVB) に輸送されてエンベロープを形成すると考えられているが、Rab5B をノックダウンすると LHBs は MVB への輸送が減少して ER へ蓄積すると考えられた。Rab5B のノックダウンによる著明な HBV 放出増加は ER に蓄積した LHBs によりエンベロープが形成された結果である可能性が示唆された。

(5) HBV 発現細胞では Rab5B の mRNA が低下しており、HBV 感染により Rab5B 発現が低下して HBV 放出は増加する方向に働く可能性が考えられた。

(6) 本研究の結果から、Rab5B は HBV の複製を制御する主要なタンパク質であることが明らかとなった。その発現や活性の変化が B 型肝炎の多様な病態に影響を与える可能性や、発現や活性の調節が治療応用に繋がる可能性があり、今後の検討課題と考えられた。

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3件)

Inoue J, Ninomiya M, Shimosegawa T, McNiven MA. Cellular membrane

trafficking machineries utilized by the hepatitis viruses. *Hepatology*. (査読有) 2018 (印刷中)

Inoue J, Kondo Y, Wakui Y, Kogure T, Morosawa T, Fujisaka Y, Umetsu T, Takai S, Nakamura T, Shimosegawa T. Reactivation of resolved hepatitis B virus infection with immune escape mutations after long-term

corticosteroid therapy. *Clin J Gastroenterol*. (査読有) 2016;9:93-8.

Inoue J, Kondo Y, Umetsu T, Yamamoto T, Miura M, Mano Y, Kobayashi T, Obara N, Niitsuma H, Kogure T, Nakagome Y, Kimura O, Iwata T, Morosawa T, Fujisaka Y, Shimosegawa T. Shifting hepatitis B virus genotypes of acute hepatitis B patients in northeast Japan. *J Med Virol*. (査読有) 2016;88:69-78.

[学会発表](計7件)

Jun Inoue, Teruyuki Umetsu, Takuya Nakamura, Masashi Ninomiya, Takayuki Kogure, Eiji Kakazu, Tomoaki Iwata, Tatsuki Morosawa, Satoshi Takai, Akitoshi Sano, Yasuhito Tanaka, Tooru Shimosegawa, Rab5B determines HBV release pathways by promoting transport of LHBs from ER to MVB, The 68th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), 2017年10月22日、ワシントンDC(アメリカ)

井上 淳, 二宮匡史, 梅津輝行, 中村琢也, 小暮高之, 嘉数英二, 諸沢 樹, 高井 智, 下瀬川 徹, 田中靖人, B型肝炎ウイルスの感染性粒子形成に利用される細胞内小胞輸送経路の解析、第53回日本肝臓学会総会、2017年6月9日、広島国際会議場(広島市)

Jun Inoue, Teruyuki Umetsu, Takuya Nakamura, Masashi Ninomiya, Takayuki Kogure, Eiji Kakazu, Tatsuki Morosawa, Satoshi Takai, Yasuhito Tanaka, Tooru Shimosegawa, Alteration of hepatitis B virus particle release after the manipulation of endocytosis-related proteins, The 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), 2016年11月11日、ボストン(アメリカ)

Jun Inoue, Teruyuki Umetsu, Takuya Nakamura, Masashi Ninomiya, Takayuki Kogure, Tatsuki Morosawa, Satoshi Takai, Yasuhito Tanaka, Tooru Shimosegawa, Enhanced release and infectivity of hepatitis B virus by the depletion of Rab5B, 2016 HBV International Meeting, 2016年9月23日、ソウル(韓国)

井上 淳、梅津輝行、中村琢也、二宮匡史、小暮高之、嘉数英二、諸沢 樹、高井 智、下瀬川 徹、B型肝炎ウイルスの感染性粒子形成に必要な小胞輸送機構の解析、第52回日本肝臓学会総会、2016年5月19日、ホテルニューオータニ幕張(千葉市)

Jun Inoue, Yasuteru Kondo, Teruyuki Umetsu, Takuya Nakamura, Takayuki Kogure, Yu Nakagome, Yuta Wakui, Tatsuki Morosawa, Yasuyuki Fujisaka, Satoshi Takai, Tooru Shimosegawa, Comprehensive analysis of the Rab family to screen membrane traffic pathways utilized by hepatitis B virus, The 66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD)、2015年11月16日、サンフランシスコ(アメリカ)

井上 淳、近藤泰輝、下瀬川 徹、B型肝炎ウイルスの生活環後期で作用するRabタンパク質の網羅的解析、第51回日本肝臓学会総会、2015年5月21日、ホテル日航熊本(熊本市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 淳 (INOUE, Jun)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：60455821