

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：34507

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08004

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルス感染性粒子(Dane粒子)の出芽部位の同定

研究課題名(英文) Identification of the budding site of hepatitis B virus infectious particles (Dane particles)

研究代表者

堀田 博(Hotta, Haku)

甲南女子大学・医療栄養学部・教授

研究者番号：40116249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)粒子の出芽、放出、細胞間伝播について、HBV粒子のホスホリパーゼA2感受性、超遠心後の浮遊密度、電子顕微鏡所見、小胞体や多胞体機能に関わる分子のノックダウン、エクソソームの関与を指標に解析し、C型及びD型肝炎ウイルス(HCV及びHDV)とも比較した。HBV感染性粒子の出芽部位の詳細な同定には至らなかったが、HBVとHCVのエンベロープの性状及びHBVとHDVの脱殻過程の差異を明らかにし、HBV感染細胞からの感染伝播は、個々のHBV粒子の放出のみならず、HBV粒子やHBVゲノムを包含するエクソソームを介する放出と標的細胞による貪食の経路が関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルス(HBV)とC型肝炎ウイルス(HCV)の感染性は、ある種のホスホリパーゼA2により非常に効率よく中和されるが、中和の機序は、HCVではエンベロープ破壊であるのに対して、HBVでは脱殻阻害であり、両ウイルスで明らかに異なることを実証した。また、HBVとD型肝炎ウイルス(HDV)は同じエンベロープを有しているが、細胞内侵入後の脱殻の過程が、両ウイルスで明らかに異なることを実証した。さらに、HBV感染細胞からの感染伝播に、HBV粒子やHBVゲノムを包含するエクソソームが関与することを実証した。これらの研究成果は、HBVのウイルス学的性質を明らかにするうえで重要なものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possible budding site(s) of the hepatitis B virus (HBV) virions as well as their release from the infected cells and the transmission to the uninfected target cells by means of their phospholipase A2 susceptibility, virion density, electron microscopic observations, knockdown experiments of the molecules involved in the functions of the endoplasmic reticulum (ER) and multivesicular body (MVB), and the exosome. We also performed comparative analyses between HBV and hepatitis C virus (HCV) as well as HBV and hepatitis D virus (HDV). Our results clearly demonstrated that the viral envelope properties differed between HBV and HCV, and that the uncoating process of the viral particles differed between HBV and HDV. Our results also suggested that the exosome pathway is involved in the release and transmission of HBV infectivity from the infected cells to the uninfected target cells. The precise determination of the HBV budding site(s) remains to be investigated.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス(HBV) 感染性粒子(Dane粒子) エンベロープリン脂質 出芽・放出部位 小胞体(ER) 多胞体(MVB) エクソソーム 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)の感染性粒子(ビリオン; Dane粒子)の出芽部位については、多胞体(MVB; multivesicular body)の機能を阻害するとHBVビリオンの放出が抑制されるという結果に基づいてMVBからの出芽が報告される一方で、電子顕微鏡解析により小胞体(ER; endoplasmic reticulum)や細胞膜(PM; plasma membrane)からの出芽も報告されていた。HBVビリオンの出芽部位を同定することはウイルス学的に重要な研究課題であった。

MVB、ER、PMはいずれもリン脂質を主とする脂質二重層から成るが、リン脂質の構成比率はMVB、ER、PMの間でそれぞれ異なっており、特定のホスホリパーゼに対する感受性の違いにも反映されている。

HBV感染細胞は、HBVビリオンのみならず、エンベロープタンパク質(HBs抗原)のみからなる小型球状粒子や管状粒子を細胞外に放出している。小型球状粒子や管状粒子はERから出芽すると考えられているが、それらはHBVビリオンよりもはるかに多量に放出されており、HBVビリオンの細胞内動態の詳細な解析を困難にする要因になっている。さらに、HBV感染性の伝播は、遊離のHBVビリオンのみならず、エクソソームを介した経路の可能性も示唆されており、このこともHBVビリオンの出芽部位の同定を困難にする要因であると考えられた。

2. 研究の目的

HBV感染性粒子の出芽部位を調べるとともに、HBVの感染性が他の細胞に伝播する様式について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養液中の遊離のHBVビリオンや、HBVと同じエンベロープを持つと考えられるD型肝炎ウイルス(HDV)及びER膜から出芽することが知られているC型肝炎ウイルス(HCV)並びにPMから出芽することが知られているインフルエンザウイルス(FLUV)を、それぞれヘビ毒由来のホスホリパーゼA₂(CM-II-PLA₂)で処理し、それらのウイルスの感染性に及ぼすCM-II-PLA₂の影響を調べた。HBV、HDV、HCV、FLUVの感染価(ffu/ml)は、ウイルスを感染させた細胞を一定時間培養した後、ウイルス特異的抗体とFITC標識二次抗体を用いた間接蛍光抗体法によりウイルス感染細胞数を計測することにより算出した。また、培養細胞(HepG2-NTCP細胞、Huh7it-1細胞)や赤血球のPMに及ぼすCM-II-PLA₂の影響(細胞傷害活性、溶血活性)についても調べた。

(2) 培養液中のHBV及びHCVをCM-II-PLA₂で処理し、密度勾配超遠心法で解析した。

(3) CM-II-PLA₂で処理したHBVビリオンを電子顕微鏡ネガティブ染色法で観察した。

(4) ER機能に重要な役割を果たしているSEC24の各アイソフォームに対するsiRNA、及びMVB機能に重要な役割を果たしているATG5やTSG101に対するsiRNAをそれぞれ、HBVビリオンを恒常的に培養液中に放出しているHep38.2-Tet細胞にトランスフェクションして、2及び3日後に、培養液中のHBVの感染価を測定し、細胞外へのHBVビリオンの放出を調べた。

(5) コレステロール輸送阻害剤かつMVB機能阻害剤として報告されている低分子化合物U18666A(2及び5µg/ml)でHep38.2-Tet細胞を処理し、2及び3日後に培養液中のHBVの感染価を測定し、細胞外へのHBVビリオンの放出を調べた。同様に、HCVを感染させたHuh7it-1細胞をU18666Aで処理し、2及び3日後に培養液中のHCVの感染価を測定し、細胞外へのHCVビリオンの放出を調べた。

(6) HBVを感染させたHepG2-NTCP細胞の培養液からエクソソームを回収し、新たなHepG2-NTCP細胞に接種してHBV感染性を測定した。

4. 研究成果

(1) HBVビリオンの感染性はCM-II-PLA₂により著しく阻害された(IC₅₀ = 0.25 ng/ml)。同様に、ER膜から出芽するHCVビリオンの感染性もCM-II-PLA₂により著しく阻害された(IC₅₀ = 0.04 ng/ml)。一方、HBVと同じエンベロープを有するHDVビリオンの感染性はCM-II-PLA₂によりほとんど阻害されなかった(IC₅₀ = >100 ng/ml)。また、PMから出芽するFLUVビリオンの感染性もCM-II-PLA₂により阻害されなかった(IC₅₀ = >10,000 ng/ml)。さらに、CM-II-PLA₂はHepG2-NTCP細胞やHuh7-it細胞に対して細胞傷害活性をほとんど示さず、ヒト赤血球に対する溶血活性も示さなかった(IC₅₀ = >10,000 ng/ml)。

(2) 密度勾配超遠心法により、CM-II-PLA₂で処理したHBVビリオンの密度は、非処理対照に比べて、少し大きい方にピークが移動した。一方、CM-II-PLA₂で処理したHCVビリオンは密度勾配超遠心法で全く検出されなくなり、ビリオンが破壊されたものと推測された。

(3) 電子顕微鏡ネガティブ染色法により、CM-II-PLA₂で処理したHBVビリオンの形態は、非処理対照と比べて、明らかな差異は認められなかった。

(4) Hep38.2-Tet細胞にSEC24の各アイソフォームに対するsiRNAを個別にトランスフェクションしてHBVビリオンの細胞外放出について解析したが、対照siRNAの場合と比べて、有意の低下は認められなかった。同様に、Hep38.2-Tet細胞にATG5やTSG101に対するsiRNAを個別

にトランスフェクションして HBV ビリオンの細胞外放出について解析したが、対照 siRNA の場合と比べて、有意の低下は認められなかった。

(5) Hep38.2-Tet 細胞を U18666A で処理して HBV ビリオンの細胞外放出について解析したところ、非処理対照細胞の場合と比べて、HBV ビリオンの細胞外放出が約 30% 抑制された。一方、HCV 感染細胞を U18666A で処理した場合には、非処理対照細胞の場合に比べて、HCV ビリオンの細胞外放出が 99.8% 抑制された。このように、U18666A 処理に対する感受性は HBV と HCV の間で著しい違いが認められた。

(6) HBV 感染細胞の培養液中に放出されたエクソソームを HepG2-NTCP 細胞に接種する感染実験により、HBV がエクソソームを介して感染・伝播することが明らかになった。

(7) 以上の結果より、HBV ビリオンのエンベロープ脂質二重層は ER 由来のものとは異なる可能性が示唆された。一方、HBV ビリオンの出芽部位が主に MVB であるとの確証は得られなかった。それに関連して、HBV の感染伝播には遊離の HBV ビリオンのみならずエクソソームを介した感染伝播経路も関与していることが明らかになり、このことが HBV ビリオンの主な出芽部位の同定を困難にしている要因の 1 つであると推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 El-Bitar AMH, Sarahan M, Abdel-Rahman MA, Quintero-Hernandez V, Aoki-Utsubo C, Moustafa MA, Possani LD, Hotta H	4. 巻 None (Online)
2. 論文標題 Smp76, a scorpine like-peptide isolated from the venom of the scorpion <i>Scorpio maurus palmatus</i> , with a potent antiviral activity against hepatitis C virus and dengue virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Peptide Research and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 None (Online)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10989-019-09888-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamani LN, Triani E, Amin M, Juniastuti, Utsumi T, Soetjipto, Nasronudin, Yano Y, Hotta H, Hayashi Y, Lusida MI	4. 巻 13
2. 論文標題 Prevalence and genotype distribution of hepatitis B virus among migrant workers in Lombok Island, Indonesia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Tropical Medicine	6. 最初と最後の頁 8-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1995-7645.273568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Deng L, Gan X, Ito M, Chen M, Aly HH, Matsui C, Abe T, Watashi K, Wakita T, Suzuki T, Okamoto T, Matsuura Y, Mizokami M, Shoji I, Hotta H	4. 巻 93
2. 論文標題 Peroxiredoxin 1, a novel HBx-interacting protein, interacts with exosome component 5 and negatively regulates hepatitis B virus (HBV) propagation through degradation of HBV RNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02203-e02218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02203-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wahyuni TS, Permatasari AA, Widiandani T, Fuad A, Widyawaruyanti A, Aoki-Utsubo C, Hotta H	4. 巻 13
2. 論文標題 Antiviral activities of Curcuma genus against hepatitis C virus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1579-1582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Aoki-Utsubo C, Chen M, Hotta H	4. 巻 8
2. 論文標題 Virucidal and neutralizing activity tests for antiviral substances and antibodies	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e2855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.2855	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoki-Utsubo C, Chen M, Hotta H	4. 巻 8
2. 論文標題 Time-of-addition and temperature-shift assays to determine particular step(s) in the viral life cycle that is blocked by antiviral substance(s)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e2830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.2830	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyashita M, Mitani N, Kitanaka A, Yakio M, Chen M, Nishimoto S, Uchiyama H, Sue M, Hotta H, Nakagawa Y, Miyagawa.	4. 巻 191
2. 論文標題 Identification of an antiviral component from the venom of the scorpion <i>Liocheles australasiae</i> using venom gland transcriptome analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicon	6. 最初と最後の頁 25-37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxicon.2020.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sarhan M, El-Bitar AMH, Hotta H.	4. 巻 188
2. 論文標題 Potent virucidal activity of honeybee <i>Apis mellifera</i> venom against hepatitis C virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicon	6. 最初と最後の頁 55-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxicon.202010.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Indrasetiawan P, Aoki-Utsubo C, Hanafi M, Hartati S, Wahyuni TS, Kameoka M, Yano Y, Hotta H, Hayashi Y	4. 巻 65
2. 論文標題 Antiviral activity of Cananga odorata against hepatitis B virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kobe Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 E71-E79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Deng L, Hotta H, Shoji I
2. 発表標題 Peroxiredoxin 1, a novel HBx-interacting protein, interacts with Exosc5 and negatively regulates HBV propagation through degradation of HBV RNA
3. 学会等名 The 7th Japan-Taiwan-Korea HBV Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hotta H, Aoki-Utsubo C, Chen M, Nishimoto S, Deng L, Miyayama Y, Hijikata M, Shindo K, Noda T, Kohara M, Tsukuda S, Watashi K, Wakita T
2. 発表標題 Further analysis of possible antiviral activity of CM-II-sPLA2 against HBV, HCV and HDV
3. 学会等名 The 2019 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyashita M, Mitani N, Kitanaka A, Yakio M, Chen M, Nishimoto S, Hotta H, Nakagawa Y, Miyagawa H
2. 発表標題 Identification of antimicrobial components from the venom of the scorpion <i>Liocheles australasiae</i> using an integrated mass spectrometric and transcriptomic approach
3. 学会等名 The 20th World Congress of the International Society on Toxinology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hotta, H, Aoki-Utsubo C, Nishimoto S, Fuchino H, Kawahara N, Masui R, Sugimoto C, Shimizu Y, Sudo K
2. 発表標題 Potent anti-HCV activity of bufalin and gamabufotalin obtained from dried toad cake
3. 学会等名 The 26th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyashita M, Mitani N, Kitanaka A, Yakio M, Chen M, Nishimoto S, Hotta H, Nakagawa Y, Miyagawa H
2. 発表標題 Venomics approach for identification of bioactive peptides from scorpion venom
3. 学会等名 Asia-Oceania Mass Spectrometry Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 靱千恵, Pugh Indrasetiawan, Yan Mardian, Muhammad Hanafi, Sri Hartati, Tutik Sri Wahyuni, 亀岡正典, 矢野嘉彦, 堀田博, 林祥剛
2. 発表標題 インドネシア原産薬用植物の抗B型肝炎ウイルス活性について
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aoki-Utsubo C, Hotta H
2. 発表標題 A chlorophyll derivative, methyl-pheophorbide A inhibits hepatitis C virus assembly by affecting apolipoprotein production
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hotta, H, Aoki-Utsubo C, Nishimoto S, Fuchino H, Kawahara N, Masui R, Sugimoto C, Shimizu Y, Sudo K
2. 発表標題 Antiviral activity of steroidal cardiac glycosides obtained from dried toad cake against hepatitis C virus
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hotta H, Chen M, Aoki-Utsubo C, Deng L, Miyayama Y, Hijikata M, Shindo K, Noda T, Kohara M, Watashi K, Wakita T
2. 発表標題 Comparative analysis of antiviral activity of sPLA2 against HBV and HCV
3. 学会等名 2018 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hotta H
2. 発表標題 Broad-spectrum antivirals that target viral envelope lipid bilayers
3. 学会等名 Bromo Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyayama Y, Chen M, Aoki-Utsubo C, Deng L, Shindo K, Noda T, Kohara M, Watashi K, Wakita T, Hijikata M, Hotta H
2. 発表標題 Effect of antiviral activity of sPLA2 against HBV and HCV
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Indrasetiawan P, Aoki-Utsubo C, Hanafi M, Hartati S, Kameoka M, Hotta H, Hayashi Y
2. 発表標題 A crude extract from <i>Cananga odorata</i> exhibits antiviral activity against hepatitis B virus
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鞆千恵, 亀岡正典, Abbs J, Hanafi M, 堀田博
2. 発表標題 アメントフラボンのB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス感染阻害活性について
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮下正弘, 三谷直也, 北中淳史, 焼尾真緒, 陳明, 西本幸子, 堀田博, 中川好秋, 宮川恒
2. 発表標題 ヤエヤマサソリ毒液に含まれる抗ウイルス活性成分の単離・同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増井涼, 杉本智潮, 清水康晴, 須藤慶一, 淵野裕之, 村瀬明香, 河上仁美, 川原信夫, 鞆千恵, 西本幸子, 堀田博
2. 発表標題 センソ及びゴオウの抗 Dengue ウイルス活性に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------