

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07574

研究課題名（和文）B型肝炎ウイルスの細胞内侵入メカニズムの解明と侵入阻害剤開発への応用

研究課題名（英文）Study on the molecular mechanism of HBV entry and screening of HBV entry inhibitors

研究代表者

田中 智久（Tanaka, Tomohisa）

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：30585310

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）の肝細胞へのエントリーに関する詳細な分子メカニズムはまだ十分に解明されたとはいえない。本課題では、HBVエントリー阻害剤の開発標的となりえる新たな宿主因子を同定するため、siRNAを用いたスクリーニングによりHBVエントリーに関与すると考えられる新たな宿主キナーゼを同定した。また、HBVエントリーにおける同因子の役割を明らかにするため、NTCPとの相互作用、および細胞内局在を解析した。また、本因子を標的とする阻害剤を同定し、そのHBVエントリー阻害作用を明らかにした。本研究成果は、HBVエントリーの分子メカニズムの解明と、新たな治療薬開発の基盤となると考えられる。

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）がどのような分子メカニズムで肝細胞にエントリーするかを詳細に解明することにより、HBV感染そのものをブロックできる新たな治療薬の開発が可能になると考えられる。HBVエントリーのメカニズムは解明されつつあるものの、まだ大部分が謎に包まれている。本研究では、HBVエントリーに関与する新たな宿主キナーゼ因子を同定し、同因子を介するHBVエントリーのメカニズムを解析するとともに、同因子を標的としたHBV治療薬の開発の可能性を検討した。

研究成果の概要（英文）：Molecular mechanisms involved in the entry step of hepatitis B virus (HBV) are not fully understood yet. In this study, we conducted siRNA screening experiment and identified a host kinase protein which supports the entry of HBV. To explore the role of the kinase in HBV entry, we analyzed the interaction between the host factor and NTCP (HBV receptor) and their intracellular localization. Furthermore, we found the compound that inhibits the kinase activity of the host factor also prevents HBV entry in dose-dependent manner. Collectively, our study contributed to the understanding of the HBV entry mechanism and the development of novel therapeutics for HBV infection.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HBV B型肝炎 抗ウイルス薬 エントリー

## 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎の原因ウイルスであるB型肝炎ウイルス(HBV)は多くの場合、一過性感染で自然治癒することが多いが、5歳以下の小児や免疫機能が正常でない人がHBVに感染した場合、持続感染に移行することがある。HBV持続感染患者は、日本だけでも100万人以上いると推定されている。HBV持続感染では、宿主肝細胞の核内において環状HBVゲノムDNA(cccDNA)が形成され、これが安定的に長期間維持される状態になる。核酸アナログ製剤といった現行のHBV治療薬ではcccDNAを排除することができないため、生涯にわたるような長期間の服薬が必要になり、薬剤耐性ウイルスの出現や、投薬休止後の肝炎の再燃などの問題が起こる。また、HBVゲノムDNAの一部または全長がまれに宿主ゲノム内に挿入されることが知られており、HBV治療薬休止によるHBVの再活性化や、肝細胞癌などの重篤な肝疾患の発症リスク上昇に関与することが報告されている。

本研究課題では、このようなHBV持続感染への移行を防ぐための有効手段として、HBV感染そのものを防げるHBVエントリー阻害剤に注目した。宿主肝細胞へのHBVのエントリーは、HBV感染増殖過程の最初のステップである。そのため、HBVエントリー阻害剤は、HBV暴露時の緊急投与による感染の防止や、HBV急性期における投薬により肝細胞間でのウイルス伝播を阻害し、持続感染への移行を阻止する効果が期待される。このような阻害剤の開発を目標とし、HBVエントリーの詳細な分子メカニズムを解明することが重要と考えられた。

HBVのエントリーのメカニズムとして、まず、機能的レセプターである胆汁酸トランスポーター(NTCP)が同定された。これによりNTCPを発現させたHepG2細胞(HepG2/NTCP)などの肝癌由来株化細胞によるHBV感染細胞モデルが確立された。また、NTCPと相互作用したHBV粒子を細胞内に取り込む過程において、上皮増殖因子受容体(EGFR)が媒介することが報告されている。しかしながら、これらのHBVエントリーに関与する宿主因子の同定により、HBVエントリーメカニズムの解析は大きく進展したものの、完全に解明されたとは言えないのが現状である。まず、EGFRやNTCPの発現がみられるHepG2/NTCP細胞では、同じくHBV感染を許容する初代培養肝細胞と比較し、HBVの感染効率が悪く、上清中への感染性粒子放出を介した細胞から細胞への2次感染もほとんど見られない。また、HBVレセプターのNTCPを発現させたトランスジェニックマウスにおいてもHBV感受性は獲得されないことが分かっている。これらのことから、HBVエントリーには同定されていない未知の宿主因子が関与していると考えられた。

以上の背景から、HBV感染そのものを防ぐエントリー阻害剤開発の必要性、およびHBVエントリーに関与する宿主因子の同定によるHBV感染培養モデル系の改良の必要性、があると考えられた。

## 2. 研究の目的

本課題では、上記の背景からHBVエントリーにおいて未知の宿主因子が関与していると仮説をたてた。この未知因子を同定することにより、まだ詳細が解明されていないHBVエントリーの分子メカニズムの解析を進展させることが考えられる。また、HBVエントリーを制御する宿主因子を標的としたエントリー阻害剤の開発が可能になると考えられる。そこで本課題では、具体的な研究目的として、以下の3点を設定した。

- (1) siRNAによるノックダウンによりHBVエントリーに関与する宿主因子を同定すること。
- (2) 同定した宿主因子のHBVエントリーにおける役割を分子生物学的に解析すること。
- (3) HBVエントリー阻害剤の開発につながるような新たな化合物を同定すること。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞、およびウイルス

本課題では、HBV感染を許容する細胞株として我々が樹立したNTCP発現HepG2細胞(HepG2/NTCP18-C)細胞を使用した。HBV複製モデルとして、HBV持続複製細胞HepG2.2.15細胞を使用した。また、NTCPと宿主因子の相互作用を解析するため、293T細胞、Huh7細胞を使用した。HBV感染を阻害すると考えられた化合物の効果を検証するため、ヒト肝細胞を持つキメラマウスより分離された初代培養肝細胞(PXB-cell)を使用した。感染性HBVは、HBV産生誘導細胞であるHepAD38細胞の派生株の培養上清より調整した。また、D型肝炎ウイルス(HDV)は、HDVゲノムRNA発現ベクターpSVLD3とHBVエンベロープベクターをHuh7細胞にトランスフェクションし、培養上清中に含まれる感染性粒子を使用した。

### (2) siRNAによる宿主因子のスクリーニング、およびHBV感染初期過程の解析

HBV感受性をもつHepG2/NTCP18-C細胞に種々の宿主因子を標的とするsiRNAをトランスフェ

クシオンし、一晚培養した。次に、細胞を 4% PEG8000 存在下で一晩 HBV とインキュベーションし、HBV を感染させた。翌日、培地を交換し、感染 3 日目に細胞を回収し、細胞内 HBV RNA を定量した。同定された宿主因子が HBV 感染の初期過程に關与するかを解析するため、同様に、HBV 複製細胞への siRNA のトランスフェクション、および、siRNA のトランスフェクションした細胞への HDV 感染を実施した。

### (3) 宿主因子と NTCP の相互作用の解析

本研究で同定した宿主因子と HBV レセプター NTCP との相互作用を解析するため、免疫沈降を実施した。両因子の発現ベクターを細胞にトランスフェクションした後、細胞溶解液をエピトープタグ抗体とインキュベーションし、ウェスタンブロットにより複合体の共沈を検出した。また、それぞれの相互作用部位を同定するため、様々な欠損変異体を作製し、同様に免疫沈降法による複合体形成の有無を解析した。宿主因子と NTCP の細胞内局在を調べるため、発現ベクターを導入した細胞株を PFA で固定し、エピトープタグ抗体により免疫染色を行った。

### (4) in vitro キナーゼアッセイ

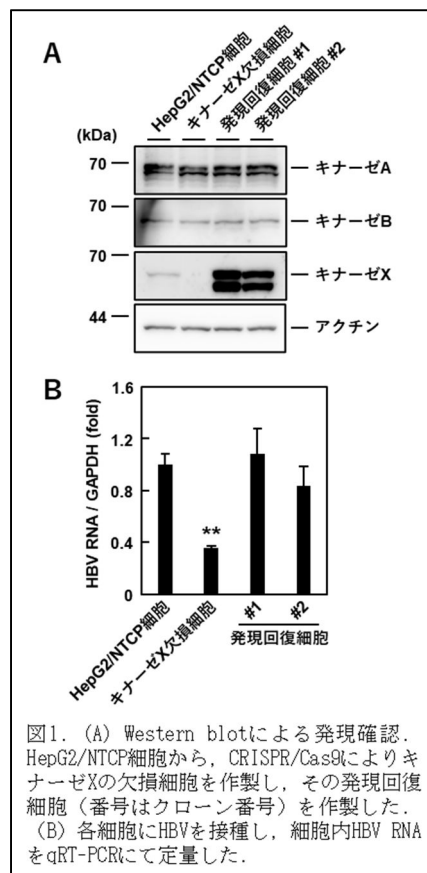
本キナーゼの組換え基質タンパク質を大腸菌を使って発現させ、his タグアフィニティ法により精製した。また、宿主キナーゼは発現ベクターを用いて 293T 細胞に過剰発現させ、エピトープタグ抗体を用いた免疫沈降により、細胞溶解液から目的の宿主キナーゼを精製した。これらの組換え基質タンパク質と目的の宿主キナーゼを反応液中でインキュベーションし、組換え基質タンパク質のリン酸化レベルをウェスタンブロットにより検出した。化合物のキナーゼ活性阻害効果を調べるため、反応液に種々の化合物を加え、リン酸化レベルの変化を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) HBV エントリーを制御する宿主キナーゼを同定した。

HBV エントリーを制御する宿主因子を探索するため、宿主キナーゼを標的とした siRNA を NTCP 発現 HepG2 細胞 (HepG2/NTCP) に導入した後、感染性 HBV を接種し、HBV 感染に対する感受性の変化を解析した。これにより同定した宿主キナーゼが HBV 感染を制御するか解析するため、CRISPR/Cas9 を用いて HepG2/NTCP 細胞から同宿主キナーゼのノックアウト (KO) 細胞を作製し、宿主キナーゼ発現ベクターを用いてその発現回復細胞を作製した (図 1A)。これらの HepG2/NTCP 由来の培養細胞に感染性 HBV を接種したところ、宿主キナーゼ KO 細胞における HBV 感染性の低下と、発現回復細胞における HBV 感染性低下の回復が見られた (図 1B)。同様に、宿主キナーゼ欠損細胞では、D 型肝炎の原因である HDV (HBV エンベロープを持つ RNA ウィルスで、HBV と同様のメカニズムにより細胞にエントリーする) の感受性の低下がみられた一方で、C 型肝炎の原因ウィルスである HCV の感受性は変わらなかった。このことから、同宿主キナーゼは HBV 感染を正に制御する因子であることが示唆された。

### (2) HBV レセプター NTCP と宿主キナーゼの相互作用を解明した。



上記宿主キナーゼがどのように HBV エントリーを制御しているかを調べるため、免疫沈降法、および免疫細胞染色により、宿主キナーゼと NTCP の相互作用を解析した。エピトープタグを融合した NTCP、および宿主キナーゼの発現ベクターを作製し、293T 細胞にトランスフェクションした。その細胞溶解液をエピトープタグ抗体を用いて免疫沈降し、得られた共沈物を Western blot により解析したところ、NTCP と宿主キナーゼは複合体を形成していた(図 2A)。また、免疫細胞染色により NTCP、および宿主キナーゼの細胞局在を調べたところ、両因子は細胞膜において共局在することが分かった(図 2B)。また、宿主キナーゼの欠損変異体を作製し、免疫沈降法により NTCP との相互作用に必要な領域を同定した。以上のことから、同宿主キナーゼと NTCP は細胞膜上で複合体を形成しており、NTCP を介した HBV 粒子の取り込みを促進することが示唆された。

(3) キナーゼ阻害剤、および新規化合物の探索により、HBV エントリーを阻害する化合物を同定した。

ひとたび持続感染に移行した HBV を完全に排除できる治療薬は開発されておらず、HBV 感染そのものを標的とした HBV エントリー阻害剤の開発は重要と考えられる。そこで本研究では、上記(1)(2)の結果をふまえ、HBV エントリーを阻害する宿主キナーゼの探索を行った。方法として、HepG2/NTCP 細胞を種々のキナーゼ阻害剤の存在下で培養した後、感染性 HBV を接種し、HBV 感染の感受性を比較した。次に、同実験により有意な結果を示した化合物が宿主キナーゼ活性を阻害するかどうかを検討した。同宿主キナーゼの組換え基質タンパク質を作製し、これを免疫沈降により培養細胞から収集した宿主キナーゼと反応させたところ、基質タンパク質のリン酸化が見られた。一方、HBV 感染実験で有意な結果を示した化合物を反応液に添加したところ、基質タンパク質のリン酸化が抑制された。このことから、本課題で同定したキナーゼ阻害剤は、同キナーゼの活性阻害を介して HBV エントリーを阻害すること、また、キナーゼの酵素活性が HBV エントリー過程に関与することが示唆された。治療薬シーズとしての同化合物のポテンシャルを評価するため、ヒト肝キメラマウスより分離培養された初代培養肝細胞(PXB 細胞)を使った HBV 感染実験を実施したところ、濃度依存的に HBV 感染を阻害することが分かった(図 3)。

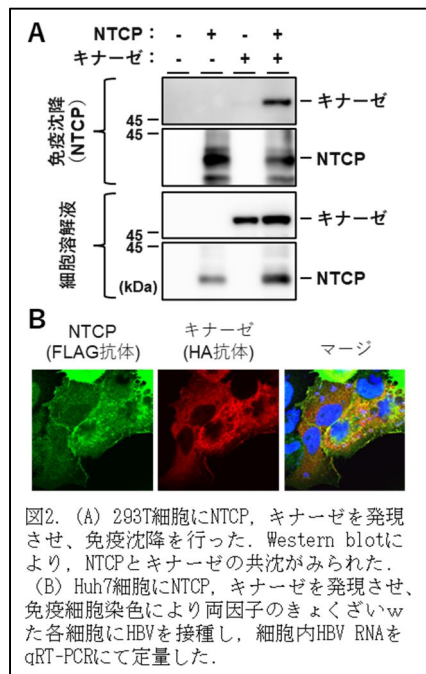


図2. (A) 293T細胞にNTCP、キナーゼを発現させ、免疫沈降を行った。Western blotにより、NTCPとキナーゼの共沈がみられた。(B) Huh7細胞にNTCP、キナーゼを発現させ、免疫細胞染色により両因子のきよくざい<sup>w</sup>た各細胞にHBVを接種し、細胞内HBV RNAをqRT-PCRにて定量した。

で本研究では、上記(1)(2)の結果

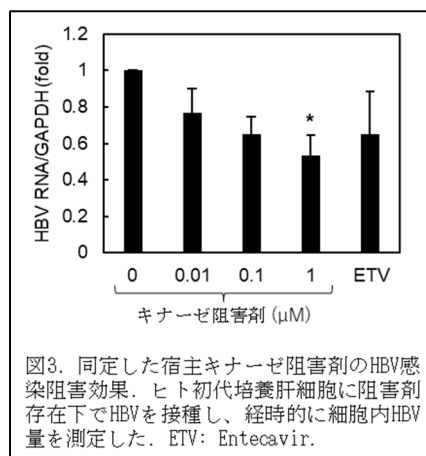


図3. 同定した宿主キナーゼ阻害剤のHBV感染阻害効果。ヒト初代培養肝細胞に阻害剤存在下でHBVを接種し、経時的に細胞内HBV量を測定した。ETV: Entecavir.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Tomohisa, Okuyama-Dobashi Kaori, Motohashi Ryoji, Yokoe Hiromasa, Takahashi Kazunori, Wiriyasermkul Pattama, Kasai Hirotake, Yamashita Atsuya, Maekawa Shinya, Enomoto Nobuyuki, Ryo Akihide, Nagamori Shushi, Tsubuki Masayoshi, Moriishi Kohji	4. 巻 194
2. 論文標題 Inhibitory effect of a novel thiazolidinedione derivative on hepatitis B virus entry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antiviral Research	6. 最初と最後の頁 105165 ~ 105165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2021.105165	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomohisa Tanaka, Kohji Moriishi
2. 発表標題 Involvement of a novel cyclin-dependent kinase in HBV infection
3. 学会等名 2019 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中智久、乙黒光姫、葛西宏威、山下篤哉、福原崇介、松浦善治、森石恆司
2. 発表標題 HBV感染に関与する cyclin-dependent kinaseの解析
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 乙黒光姫、田中智久、葛西宏威、山下篤哉、福原崇介、松浦善治、森石恆司
2. 発表標題 B型および C型肝炎ウイルス感染を許容する培養細胞の樹立
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 山下篤哉、田中智久、乙黒光姫、葛西宏威、森石恆司
2. 発表標題 HBV core promoter をターゲットとした新規抗HBV化合物4,4'-bis(cyclohexylmethyl)biphenyl-2,2',5,5'-tetraol
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

〔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
---------	---------