

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16672

研究課題名(和文) 宿主プロテインキナーゼによるB型肝炎ウイルス侵入制御機構の解明

研究課題名(英文) Machinery for hepatitis B virus entry regulated by host protein kinase

研究代表者

岩本 将士 (Masashi, Iwamoto)

九州大学・理学研究院・特別研究員

研究者番号：40825882

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)の感染分子機構の理解は十分ではない。本研究ではHBVが感染受容体であるNTCPと細胞表面で結合した後に、どのようにして細胞内へ侵入し感染するかを明らかにした。チロシンキナーゼ型受容体であるEGFRはNTCPと結合することでHBV内在化を媒介する。また細胞内侵入したHBVはEGFRのエンドサイトーシス経路および細胞内輸送機構を利用して感染を成立させることを明らかにした。これら知見はHBV感染分子機構を理解する上で非常に重要な知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題により、長年明らかでなかったHBVの細胞内侵入機構の一端を明らかにした。EGFRはHBV感染に必須な宿主因子であり、その感染制御機構を同定した。EGFRはこれまでに抗がん剤の標的として着目されてきたことにより、多くの阻害剤が報告されており、これらのうち少なくともゲフィチニブはEGFRの機能を阻害することでHBV感染を減少させることを細胞培養レベルで明らかにした。本研究で得た知見はHBV感染分子機構の理解を推し進めたのみならず、新しいHBV感染治療戦略を提案するもので、EGFRが新規HBV治療薬の標的となり得る可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)： Machinery for entry of hepatitis B virus (HBV) into the host cells have been largely unknown. Here, we reported epidermal growth factor receptor (EGFR) as essential host factor for HBV entry after attachment to sodium taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP), known as HBV host receptor, on the plasma membrane. EGFR triggered HBV internalization through binding to NTCP. Future studies revealed that role of EGFR on HBV entry was not only inducing viral internalization, but also regulating the trafficking of HBV to late endosome for functional infection. These results are useful for understanding the mechanism of HBV infection as well as establishment of novel anti-HBV agents.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HBV プロテインキナーゼ EGFR

## 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は肝臓特異的に発現する胆汁酸トランスポーター NTCP を受容体に利用することが最近報告され、申請者は NTCP をヒト肝細胞株に過剰発現することにより HBV 高感受性細胞株 HepG2-NTCP-C4 細胞を樹立した。しかしながら、NTCP 発現により HBV の細胞への吸着はほぼ 100%成立するにもかかわらず、そのうち感染する細胞の割合は約 30%であった。これら知見は NTCP 発現だけでは全ての細胞に HBV 感染感受性を付与することは出来ないことを示す。

## 2. 研究の目的

研究の目的は HBV 吸着より後の過程で働いている HBV 感染を規定する宿主因子を同定し、その制御分子機構を解明することである。また、明らかとなった HBV 感染制御因子を標的とした新規 HBV 阻害戦略の提案を試みる。

## 3. 研究の方法

(1). HBV 感染許容性を上昇させる生理活性物質の同定.

HBV 感染許容性細胞株 HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いた生理活性物質のスクリーニングにより、HBV 感染許容性を増強するリガンドとして上皮成長因子(EGF)を得た。EGF 及びその関連因子による HBV 感染過程への寄与を解析した。

(2). EGF 受容体の HBV 感染寄与の解析.

EGF 受容体 (EGFR)を siRNA を用いてノックダウンした細胞では HBV 感染が減少した。EGFR ノックダウン細胞では HBV 吸着に変化がない一方で、細胞内への HBV 内在化を減少していた。

(3).EGFR-NTCP 相互作用の解析.

細胞への EGF 刺激条件下での HBV エンベロープペプチド (preS1-probe), EGFR および NTCP の局在を観察した結果、これらは細胞内への内在化が促進されており、細胞内で共局在して観察された。また、免疫沈降法により EGFR と NTCP が結合することが明らかになった。

(4). HBV 感染における EGFR-NTCP 相互作用の意義の解析.

EGFR と NTCP の相互作用の意義を明らかにするために EGFR と結合しない NTCP 変異体を作成した。この NTCP 変異体発現細胞での HBV 内在化を観察した結果、野生型と比較して、HBV 内在化の誘導の割合が低下した。NTCP 変異体発現細胞は HBV 感染が大きく減少した。

(5). EGFR の HBV 内在化機序の解析.

EGFR による HBV 内在化分子機序を明らかにするために、EGFR 活性化に伴い誘導されるシグナル産生経路の阻害を処理した細胞での HBV 感染と、EGFR 細胞内侵入能を欠損させた変異体発現細胞での HBV 感染を評価した。シグナル産生阻害剤は HBV 感染に有意な変化を与えなかった一方で、EGFR 細胞内侵入能変異体では HBV 感染をほとんど補助できなかった。また、EGFR 細胞内侵入に関わる宿主因子を siRNA を用いてノックダウンした細胞では HBV 感染が低下した。

(6). HBV 細胞内輸送経路の解析.

細胞内へ侵入した HBV の局在変化を preS1-probe を用いて観察した結果、EGFR と共に時間依存的に初期エンドソームから後期エンドソーム、リソソームへと変化した。preS1-probe の局在変化が EGFR 依存的かを評価するために、EGFR が初期エンドソームに蓄積し、後期エンドソームへ輸送される変異体を作成した。この EGFR 変異体発現細胞では、EGFR-preS1-probe の後期エンドソームへの局在が減少し、HBV 感染効率も低下した。

## 4. 研究成果

本研究では、HBV 内在化に EGFR が必要であることを明らかにした。HBV は NTCP と結合し細胞表面へ吸着した後に、NTCP を介して EGFR 依存的に細胞内への内在化を果たしていた。EGFR が HBV 内在化を補助するためには NTCP との結合および自身のエンドサイトーシス活性が重要であった。さらに細胞内侵入後も EGFR は HBV 感染に関わって

おり、少なくとも後期エンドソームへの輸送に寄与し、これが HBV 感染成立に関わることを明らかにした。また EGFR 機能阻害剤が HBV 感染を減少させたことより、EGFR は新規 HBV 阻害剤の標的となると期待する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 M. Iwamoto, W. Saso, R. Sugiyama, K. Ishii, M. Ohki, S. Nagamori, R. Suzuki, H. Aizaki, A. Ryo, J-H Yun, S-Y Park, N. Ohtani, M. Muramatsu, S. Iwami, Y. Tanaka, C. Sureau, T. Wakita and K. Watashi	4. 巻 116
2. 論文標題 Epidermal growth factor receptor is a host entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 8487-8492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1811064116	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 Iwamoto M, Saso W, Nishioka K, Ohashi H, Sugiyama R, Ryo A, Ohki M, Yun JH, Park SY, Ohshima T, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Matano T, Iwami S, Sureau C, Wakita T, Watashi K	4. 巻 295
2. 論文標題 The machinery for endocytosis of epidermal growth factor receptor coordinates the transport of incoming hepatitis B virus to the endosomal network.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 800-807
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.AC119.010366	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 Yamada N, Murayama A, Shiina M, Aly HH, Iwamoto M, Tsukuda S, Watashi K, Tanaka T, Moriishi K, Nishitsuji H, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K, Muramatsu M, Murata K, Kato T	4. 巻 50
2. 論文標題 Anti-viral effects of interferon- 3 on hepatitis B virus infection in cell culture.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 283-291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13449	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 Kamata M, Takeuchi T, Hayashi E, Nishioka K, Oshima M, Iwamoto M, Nishiuchi K, Kamo S, Tomoshige S, Watashi K, Kamisuki S, Ohru H, Sugawara F, Kuramochi K	4. 巻 84
2. 論文標題 Synthesis of nucleotide analogues, EFdA, EdA and EdAP, and the effect of EdAP on hepatitis B virus replication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 217-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1673696	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 Masashi Iwamoto, Yukino Shibata, Junna Kawasaki, Shohei Kojima, Yung-Tsung Li, Shingo Iwami, Masamichi Muramatsu, Hui-Lin Wu, Kazuhiro Wada, Keizo Tomonaga, Koichi Watashi, Masayuki Horie	4. 巻 7
2. 論文標題 Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Evolution	6. 最初と最後の頁 veab003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ve/veab003.	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

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masashi Iwamoto, Wakana Saso, Mio Ohki, Ryosuke Suzuki, Hideki Aizaki, Akihide Ryo, Sam-Yong Park, Masamichi Muramatsu, Shingo Iwami, Yasuhito Tanaka, Camille Sureau, Takaji Wakita, Koichi Watashi
2. 発表標題 Epidermal growth factor receptor as a novel host entry cofactor that triggers hepatitis B virus internalization.
3. 学会等名 2019 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masashi Iwamoto	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Science Impact Ltd	5. 総ページ数 3
3. 書名 Elucidation of hepatitis B virus invasion control mechanism by host protein kinase	

〔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
---------	---------