

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：82610

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23855

研究課題名（和文）胆汁酸トランスポーターNTCP多量体化に着目したB型肝炎ウイルス内在化機構の解明

研究課題名（英文）Mechanistic analysis of hepatitis B virus internalization focusing on NTCP oligomerization

研究代表者

深野 颯人（Fukano, Kento）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・臨床研究センター・産学連携推進部 上級研究員

研究者番号：80848531

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：B型肝炎ウイルス（HBV）関連肝疾患の新たな予防・治療法を開発するためには、HBVの感染機構の解明が極めて重要である。これまでに申請者は、HBVの感染受容体である胆汁酸トランスポーターNTCPの多量体化がHBVの内在化に寄与することを見出した。本研究では、アラニンスキャニングによりNTCPの多量体化に重要なアミノ酸を同定した。またHBV内在化に必須とされる上皮成長因子受容体（EGFR）とNTCPの相互作用の下流でNTCP多量体が形成されることを明らかにした。以上のように本研究は、未だ明らかでないHBV侵入機構を理解する上で有用な知見を提供する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVの細胞内への内在化機構において、NTCPの多量体形成やEGFRとの相互作用が重要であるとこれまで明らかになっているが、その2つの機構の関連性は不明であった。本研究により、NTCP-EGFR相互作用の下流でNTCPの多量体化が起こると明らかになり、HBV感染機構の一端を解明したと同時に、NTCP多量体化およびHBV内在化の過程が新たな創薬標的となり得ることを示した。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of molecular mechanism for hepatitis B virus (HBV) infection is required for developing of new prevention and treatment against HBV-related liver diseases. Recently, we reported that oligomerization of bile acid transporter (NTCP), which is an HBV entry receptor, plays a critical role in the HBV internalization pathway. In this study, we identified an amino acid essential for NTCP oligomerization by alanine scanning mutagenesis. Additionally, we revealed that NTCP oligomerization is initiated downstream of the NTCP-EGFR interaction and then triggers HBV internalization. This study provides significant insight into the HBV entry mechanisms.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス 内在化 NTCP 多量体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は肝特異的に発現している胆汁酸トランスポーターNTCPに吸着した後、細胞内へ侵入・内在化することが知られている。しかしながら、そのHBV内在化過程の詳しいメカニズムについては、未だ全貌が明らかになっていない。申請者はこれまでにNTCPの多量体化がこのHBV内在化に寄与するという所見を見出した(Fukano K et al. *Front Microbiol.* 2019)が、NTCPの多量体化によってHBV内在化が誘導される分子機構など未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、未だ多くの謎を残すHBV侵入過程のメカニズムの解明に迫る。HBV細胞内侵入・内在化に重要であるNTCPの多量体化および上皮成長因子受容体(EGFR)との相互作用に着目し、HBV内在化の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1) NTCP多量体化に必要なアミノ酸の同定

本研究では当研究室で樹立されたHBV感染感受性細胞株HepG2-hNTCP-C4細胞およびNTCP発現プラスミドをトランスフェクションしたHepG2細胞を用いてHBV感染の評価を行った。HBV感染は、HepG2-hNTCP-C4細胞またはNTCP発現HepG2細胞にHBVを12,000 GEq/cellで4% PEG8000存在下16時間処理し、洗浄後12日目の培養上清中HBs抗原量をELISA法により定量して評価した。

HBVの宿主細胞への吸着侵入に関わるHBVエンベロープタンパク質のpreS1領域2-48アミノ酸からなるペプチドにTAMRA標識した蛍光ペプチド(preS1プローブ)を用い、HBVと細胞の吸着を評価した。

NTCP発現HepG2細胞にpreS1プローブを37°Cで8時間処理し、内在化したpreS1プローブの蛍光をコンフォーカル顕微鏡で観察することによりHBV内在化への影響を評価した。

2) NTCPの多量体化とEGFRとの相互作用の関連性の解析

NTCP発現HepG2細胞にpreS1プローブを4°Cで30分間処理し、細胞を固定した後、Duolink PLA(Sigma-Aldrich)をプロトコールに従って行い、得られた蛍光をコンフォーカル顕微鏡で観察しNTCPの多量体化を評価した。

HAタグ標識EGFRとMycタグ標識NTCPを発現させた293T細胞溶解液に抗HA抗体を加えて4°Cで4時間反応させ、Protein G Sepharoseで沈降し、EGFRに相互作用したNTCPをウェスタンブロット法により検出して評価した。

4. 研究成果

1) NTCP多量体化に必要なアミノ酸の同定

NTCP多量体化に関わる領域から成るペプチドを用いたアラニンスキニングにより、NTCPのタンパク質領域aa 274-276、aa 283-285、aa 289-290が多量体化に重要であることが示唆された。そこでこれらのアミノ酸をそれぞれアラニン置換した変異体を作製し、NTCP多量体形成に重要なアミノ酸残基の同定を行った。8つの変異体のうち、274番フェニルアラニンのアラニン置換NTCP(NTCP-F274A)を発現したHepG2細胞のみ、HBVの感染が抑制された。さらにNTCP-F274Aは、preS1プローブとの結合に影響しなかった一方で、preS1プローブの細胞内への内在化は明らかに低下した。また、NTCP-F274A発現HepG2細胞におけるNTCP多量体化をPLAにより評価したところ、その多量体化は抑制されたため、274番フェニルアラニンはNTCP多量体化およびHBV内在化に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。

2) NTCPの多量体化とEGFRとの相互作用の関連性の解析

HBV-NTCP複合体の細胞内侵入に重要とされるEGFRとNTCPの相互作用を化合物処理やNTCPへの変異導入により阻害すると、NTCP多量体化は阻害された。一方でNTCP多量体化阻害剤troglitazoneやNTCP-F274AはNTCP-EGFR相互作用に影響しなかった。以上より、HBV内在化機構においてNTCP多量体化はEGFR-NTCP相互作用の下流に位置することが明らかとなった。

本研究成果は、HBV 感染機構解明の一助になるとともに、NTCP 多量体化を標的とする HBV の細胞内侵入阻害が新たな創薬戦略となり得ることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Zheng Xin, Guo Rui, Liu Qingbo, Wakae Kouso, Watanabe Noriyuki, Fukano Kento, Que Lusheng, Li Yingfang, Aly Hussein H., Watashi Koichi, Suzuki Ryosuke, Murayama Asako, Kato Takanobu, Aizaki Hideki, Wakita Takaji, Huang Xiaoxiao, Yan Yi, Song Shao-Jiang, Muramatsu Masamichi	4. 巻 567
2. 論文標題 Identification of natural compounds extracted from crude drugs as novel inhibitors of hepatitis C virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.022	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 Fukano Kento, Oshima Mizuki, Tsukuda Senko, Aizaki Hideki, Ohki Mio, Park Sam-Yong, Wakita Takaji, Wakae Kouso, Watashi Koichi, Muramatsu Masamichi	4. 巻 95
2. 論文標題 NTCP Oligomerization Occurs Downstream of the NTCP-EGFR Interaction during Hepatitis B Virus Internalization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00938-21	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 Gad Sameh A., Sugiyama Masaya, Tsuge Masataka, Wakae Kouso, Fukano Kento, Oshima Mizuki, Sureau Camille, Watanabe Noriyuki, Kato Takanobu, Murayama Asako, Li Yingfang, Shoji Ikuo, Shimotohno Kunitada, Chayama Kazuaki, Muramatsu Masamichi, Wakita Takaji, Nozaki Tomoyoshi, Aly Hussein H.	4. 巻 18
2. 論文標題 The kinesin KIF4 mediates HBV/HDV entry through the regulation of surface NTCP localization and can be targeted by RXR agonists in vitro	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 1~26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1009983	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 Wakae Kouso, Kondo Satoru, Pham Hai Thanh, Wakisaka Naohiro, Que Lusheng, Li Yingfang, Zheng Xin, Fukano Kento, Kitamura Kouichi, Watashi Koichi, Aizaki Hideki, Ueno Takayoshi, Moriyama Kita Makiko, Ishikawa Kazuya, Nakanishi Yosuke, Endo Kazuhira, Muramatsu Masamichi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 9
2. 論文標題 EBV LMP1 induces APOBEC3s and mitochondrial DNA hypermutation in nasopharyngeal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 7663~7671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3357	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 Li Yingfang, Que Lusheng, Fukano Kento, Koura Miki, Kitamura Kouichi, Zheng Xin, Kato Takano, Aly Hussein Hassan, Watashi Koichi, Tsukuda Senko, Aizaki Hideki, Watanabe Noriyuki, Sato Yuko, Suzuki Tadaki, Suzuki Hiroshi I., Hosomichi Kazuyoshi, Kurachi Makoto, Wakae Kousho, Muramatsu Masamichi	4. 巻 10
2. 論文標題 MCPIP1 reduces HBV-RNA by targeting its epsilon structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77166-z	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 深野 顕人、渡士 幸一	4. 巻 56
2. 論文標題 B型肝炎ウイルスの感染機序と創薬	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 1079 ~ 1083
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.12_1079	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 Nakajima Shogo, Watashi Koichi, Fukano Kento, Tsukuda Senko, Wakae Kousho, Aizaki Hideki, Muramatsu Masamichi, Wakita Takaji, Toyoda Tetsuya	4. 巻 55
2. 論文標題 Non-nucleoside hepatitis B virus polymerase inhibitors identified by an in vitro polymerase elongation assay	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 441 ~ 452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01643-0	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 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Aoki-Utsubo C, Indrasetiawan P, Fukano K, Muramatsu M, Hotta H, Kameoka M
2. 発表標題 A biflavonoid amentoflavone inhibits hepatitis B virus infection
3. 学会等名 The 11th JSP・CSP・KSP Joint Symposium on Pharmacognosy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Li Y, Que L, Fukano K, Koura M, Kitamura K, Wakae K, Muramatsu M
2. 発表標題 MCP1P1 reduces HBV-RNA by targeting its epsilon structure
3. 学会等名 2021 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Gad SA, Sugiyama M, Tsuge M, Wakae K, Fukano K, Watanabe N, Kato T, Murayama A, Li Y, Shoji I, Shimotohno K, Chayama K, Muramatsu M, Wakita T, Nozaki T, Aly HH
2. 発表標題 Kinesin KIF4 is a key regulator for surface localization of NTCP, and HBV/HDV infection
3. 学会等名 2021 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深野顕人、大嶋美月、九十田千子、相崎英樹、大木規央、朴三用、脇田隆字、若江亨祥、渡土幸一、村松正道
2. 発表標題 SLC10A1/NTCP多量体形成が制御するB型肝炎ウイルス細胞内侵入機構の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 靱千恵、Puguh Indrasetiawan、深野顕人、村松正道、堀田博、亀岡正典
2. 発表標題 アメントフラボンのB型肝炎ウイルス感染阻害活性について
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢藤慶悟、深野顕人、松田麻未、田中智久、森石恆司、西辻裕紀、下遠野邦忠、田村浩二、加藤孝宣、村松正道、鈴木 亮介
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスpreS2領域に対する抗体はウイルス感染を抑制する
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fukano K, Oshima M, Tsukuda S, Aizaki H, Ohki M, Park SY, Wakita T, Wakae K, Watashi K, Muramatsu M
2. 発表標題 NTCP oligomerization is initiated downstream of the NTCP-EGFR interaction during HBV internalization
3. 学会等名 2021 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Oshima M, Fukano K, Iwamoto M, Stappenbeck F, Wang F, Zheng X, Yamasaki M, Wakae K, Aizaki H, Kuramochi K, Muramatsu M, Wakita T, Parhami F, Watashi K
2. 発表標題 Identification of an oxysterol derivative that inhibits HBV infection by interrupting NTCP oligomerization
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Gad SA, Wakae K, Fukano K, Kato T, Shoji I, Shimotohno K, Chayama K, Muramatsu M, Wakita T, Nozaki T, Aly HH
2. 発表標題 The kinesin KIF4 is essential to promote HBV/HDV entry through the regulation of surface localization of NTCP, and is a possible target for anti-HBV/HDV therapy
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fukano K, Oshima M, Tsukuda S, Aizaki H, Ohki M, Park SY, Wakita T, Wakae K, Watashi K, Muramatsu M
2. 発表標題 Functional relevance between NTCP oligomerization and EGFR during hepatitis B virus internalization
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大嶋美月、深野顕人、岩本将士、Frank Stappenbeck、Feng Wang、鄭シン、山崎雅子、若江亨祥、相崎英樹、倉持幸司、村松正道、脇田隆字、Farhad Parhami、渡士幸一
2. 発表標題 新規作用機序によりB型肝炎ウイルス感染を阻害する酸化ステロール合成誘導体の同定
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深野顕人、九十田千子、大嶋美月、大木規央、朴三用、若江亨祥、相崎英樹、脇田隆字、渡士幸一、村松正道
2. 発表標題 感染受容体NTCPの多量体化が導くB型肝炎ウイルス細胞内侵入機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fukano K, Tsukuda S, Oshima M, Ohki M, Park SY, Wakae K, Aizaki H, Wakita T, Watashi K, Muramatsu M
2. 発表標題 Identification of a novel inhibitor for hepatitis B virus internalization targeting viral receptor oligomerization
3. 学会等名 Virtual PSWC2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 李瑩芳、關路晟、深野顯人、小浦美樹、喜多村晃一、倉知慎、若江亨祥、村松正道
2. 発表標題 MCPIP1はエプシロン構造を介してB型肝炎ウイルスRNAを分解する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fukano K, Tsukuda S, Oshima M, Suzuki R, Aizaki H, Ohki M, Park SY, Muramatsu M, Wakita T, Sureau C, Ogasawara Y, Watashi K
2. 発表標題 Interference with NTCP oligomerization impairs the HBV internalization
3. 学会等名 7th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大嶋美月、深野顯人、岩本将士、若江亨祥、相崎英樹、村松正道、脇田隆字、渡土幸一
2. 発表標題 酸化コレステロールによるHBV内在化阻害とその機構の解析
3. 学会等名 第16回ウイルス学キャンプin湯河原
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukano K, Tsukuda S, Oshima M, Ohki M, Park SY, Wakae K, Aizaki H, Wakita T, Muramatsu M, Watashi K
2. 発表標題 NTCP oligomerization involved in hepatitis B virus internalization
3. 学会等名 2019 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深野顕人、九十田千子、大嶋美月、大木規央、朴三用、若江亨祥、相崎英樹、脇田隆字、村松正道、渡士幸一
2. 発表標題 NTCP多量体化によるB型肝炎ウイルス内在化制御機構
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 深野顕人、九十田千子、大嶋美月、大木規央、朴三用、若江亨祥、相崎英樹、脇田隆字、渡士幸一、村松正道
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス内在化機構における感染受容体多量体化の関与
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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
---------	---------