

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07906

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルス増殖抑制因子を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapies targeting host factors in Hepatitis B virus replication

研究代表者

田中 康雄 (Tanaka, Yasuo)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：40422290

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)：本研究では、B型肝炎ウイルス(HBV)のタンパクの一つHBxにより分解される宿主ウイルス増殖抑制因子、およびHBxの安定性を規定する宿主因子の同定を行った。前者の候補は約20種類同定され、その中にはHBVの増殖に関与していると既に報告のある分子が含まれていた。後者ではHBxの安定性を負に制御するユビキチンリガーゼを同定し、HBVの複製に関与している可能性を示した。今後これらの分子を標的にした抗HBV療法の開発を進めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルスは現在使用可能な核酸アナログ製剤によりウイルスの増殖を抑えることは可能だが、薬剤耐性株の出現や薬剤中止による肝炎再燃が大きな問題となっており、新規抗ウイルス薬の開発は喫緊の課題である。本研究ではB型肝炎ウイルスの産生するタンパクの一つであるHBxに着目し、ウイルスの増殖を抑制する宿主タンパクを同定し得た。本研究の結果が新規治療法の開発へ寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for the host restriction factors in HBV replication. We identified twenty molecules as candidates for host restriction factors degraded by HBx. We also identified ubiquitin-ligase CHIP as a molecule that degrades HBx and inhibits HBV replication. Our results suggest that these molecules could be an attractive therapeutic target for inhibiting HBV replication.

研究分野：肝臓病学

キーワード：HBV HBx ユビキチン・プロテアソーム系 CUL4-DDB1 CHIP IGFBP1

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は、急性肝炎、慢性肝炎や肝細胞癌など様々な肝疾患の主要原因の一つである。全世界で推定約 2 億 6 千万人の感染者の中で年間約 60 万人が HBV 関連疾患で死亡していると考えられており、いまだ重大な健康上の問題となっている。HBV の増殖そのものは複製に必須の逆転写酵素を標的とした薬剤 (核酸アナログ製剤) により抑制することが可能だが、HBV の複製の鋳型である covalently closed circular DNA (cccDNA) を肝細胞から完全に排除することはいまだ不可能であり、新規分子を標的とした抗ウイルス療法の開発は喫緊の課題である。HBV の唯一の非構造タンパクである X タンパク (HBx) はトランスジェニック・マウスの解析からウイルス由来の癌遺伝子で肝発癌へ寄与することが明らかとなっている。同時に HBx を発現できない HBV は肝細胞内で複製しないことから自身の複製に必須であることも以前から指摘されていた。近年その機序として HBx がユビキチン転移酵素 (リガーゼ) である CUL4-DDB1 と複合体を形成し、宿主のウイルス増殖抑制因子をユビキチン化・分解していることが明らかになった。ユビキチンは種を超えて高度に保存されている 76 個のアミノ酸からなるタンパク質で、生命現象において非常に重要な役割を担っている。ユビキチンは 3 種の酵素であるユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン転移酵素 (E3) により鎖状につながりその標的タンパクに結合することで、プロテアソーム依存性のタンパク質の分解に関与している。ユビキチンリガーゼの CUL4-DDB1 複合体はアダプタータンパクである DDB1 and CUL4-associated factor (DCAF) により基質の特異性を決定され、基質のユビキチン化と分解を導く。近年のプロテオミクス解析から HBx も DCAF として作用し、宿主の増殖抑制因子を分解し自身の複製に有利な環境を作り出していることがわかった。その基質の一つとして染色体の高次構造と機能の制御に関わる ATPase ファミリー Smc5/6 が報告された (Nature. 2016;31:386-9., Cell Rep. 2016;16:2846-2854.)。Smc5/6 は HBV の複製の鋳型である cccDNA からの転写を抑制しており、HBx はその抑制を Smc5/6 のタンパク分解により解除することで HBV 複製に寄与していると考えられているが、その詳細な機序は明らかではなく、他にも標的となる分子が存在する可能性がある。

一方で HBx 自身も半減期が約 30 分と不安定なタンパクであり、宿主タンパクによるユビキチン化を受け分解される。HBx の分解を促進する因子 (ID1 (inhibitor of DNA binding 1, HLH protein), MDM2 proto-oncogene, TRIM (Tripartite Motif Containing) 5、TRIM31 など) また抑制する因子 (regulator of chromatin subfamily c member 1, ubiquitin-specific peptidase 15 など) が複数知られているが、いまだ HBx 自身をユビキチン化する E3 リガーゼは明らかでない。Siah E3 ubiquitin-protein ligase 1 が HBx の E3 リガーゼと報告されているが、ユビキチン化は試験管内では再現されておらず、実際の E3 かどうかは不明であり、HBx 分解の調節機構はいまだ明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、(1)HBx により分解される宿主ウイルス増殖抑制因子の網羅的同定、また(2)HBx の安定性を規定する宿主因子の同定を通じて、これらを標的とした新規抗ウイルス療法の開発をめざす。

3. 研究の方法

(1) HBx により分解されるウイルス増殖抑制因子の網羅的同定

HBx により分解の標的となりうるユビキチン化タンパクの網羅的同定を試みる。ユビキチンはカルボキシル末端 (RGG) を介して基質のリジン側鎖の e-アミノ基にイソペプチド結合する。ユビキチン化修飾を受けた基質をトリプシンで消化すると塩基性アミノ酸のカルボキシル基側のペプチド結合が切断されるため、ユビキチン化の部位にジグリシンレムナント (ユビキチンレムナント (K-e-GG)) が残る。このモチーフを認識する抗体 (抗 diGly 抗体) でペプチドを免疫沈降し濃縮・精製することにより、ユビキチン化されるタンパクを同定する。本法と質量分析を組み合わせることにより標的となるユビキチン化タンパクの網羅的同定を行う。さらにユビキチン化タンパクの情報に、タンパク質相対定量解析によるタンパク発現量のデータを組み合わせることにより、ユビキチン化されかつ分解されるタンパクを絞り込む。

(2) HBx の安定性を規定する宿主因子の同定

HBx に特異的に結合し、HBx の安定性を規定する可能性のある宿主因子の同定を免疫沈降法と質量分析を用いて試みる。2 種類のアフィニティータグ (myc と flag) と TEV プロテアーゼによる切断部位を直列につないだ複合体型タグを組み込んだ HBx の発現プラスミドを肝細胞株に導入し、プロテアソーム阻害剤にて刺激してタンパク分解を抑制する。そしてタグに対する抗体を

用いて HBx 複合体を 2 段階精製し、HBx 結合蛋白をゲルから切り出し質量分析計にてタンパクを同定する。

4 . 研究成果

(1)HBx を安定的に発現する HepG2 細胞を用いて、ユビキチン化修飾を受けた基質をトリプシンで消化した際にユビキチン化の部位に残るジグリシンレムナントを認識する抗体(抗 diGly 抗体)でペプチドを免疫沈降・濃縮・精製し、質量分析計にて解析を行った。その結果、HBx でユビキチン化が有意の上昇したタンパクが約 160 種類、HBx でユビキチン化が有意に低下したタンパクが約 270 種類認められ、HBx により細胞内のユビキチン化がダイナミックに変動することが分かった。また、機能別では HBx によりアポトーシス関連分子のユビキチン化が増加、また転写関連分子のユビキチン化が減少し、細胞死や転写活性化への関与が示唆された。

次にノンラベル法によるタンパク質相対定量解析(グローバルプロテインプロファイリング)を組み合わせ、HBx によりユビキチン化を受け、タンパク量が減少する、すなわち分解の標的となりうるユビキチン化タンパクの網羅的同定を試みた。その結果、HBx でユビキチン化が有意の上昇し、かつ発現量が有意に低下したタンパクが約 20 個認められた。これらの分子のうち、insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1)は HBV 増殖に寄与しているとの報告があり、本法の有用性が示された。

(2) 2 種類のアフィニティータグと TEV プロテアーゼによる切断部位を直列につないだ複合体型タグを組み込んだ HBx の発現プラスミドを肝細胞株 HepG2 に導入し、タグに対する抗体を用いて HBx 複合体を 2 段階精製し、HBx 結合蛋白をゲルから切り出し質量分析計にてタンパクを同定した。

その中の一つにユビキチンリガーゼ CHIP (Carboxyl-terminus of Hsc70 interacting protein)を認めた。CHIP と HBx は細胞内で結合し、CHIP を強制発現することにより HBx の発現量は減少した。一方で CHIP の K30A [Heat shock protein 70 (Hsp70)と結合しない変異体]及び H260Q (ユビキチンリガーゼの機能を喪失した変異体)では減少が認められなかった。CHIP をノックアウトした細胞では HBx の安定性が増し、CHIP の強制発現により HBx はユビキチン化を受けた。機能的には、HepG2-NTCP 細胞で CHIP をノックアウトすると HBV 感染時に HBV-RNA や HBV タンパクの産生が増加した。以上より CHIP は Hsp70 を介して HBx と結合し、HBx をユビキチン化している可能性が考えられた。CHIP は HBV の複製に関与している可能性が示唆され、本分子を標的にした抗 HBV 療法の可能性が示唆された。

以上、本研究では B 型肝炎ウイルスの産生するタンパクの一つである HBx に着目し、ウイルスの増殖を抑制する宿主タンパクを同定し得た。本研究の結果が HBV の新規治療法の開発へ寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tanaka Yasuo	4. 巻 16
2. 論文標題 Metabolomics in liver diseases: A novel alternative for liver biopsy?	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 World Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 12~16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4254/wjh.v16.i1.12	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 Minami T, Sato M, Toyoda H, Yasuda S, Yamada T, Nakatsuka T, Enooku K, Nakagawa H, Fujinaga H, Izumiya M, Tanaka Y et al.	4. 巻 79
2. 論文標題 Machine learning for individualized prediction of hepatocellular carcinoma development after the eradication of hepatitis C virus with antivirals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 1006~1014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jhep.2023.05.042	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 Kato H, Tateishi K, Fujiwara H, Nakatsuka T, Yamamoto K, Kudo Y, Hayakawa Y, Nakagawa H, Tanaka Y et al.	4. 巻 162
2. 論文標題 MNX1-HNF1B Axis Is Indispensable for Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm Lineages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1272-1287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1053/j.gastro.2021.12.254.	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 Minami Tatsuya, Tateishi Ryosuke, Fujiwara Naoto, Nakagomi Ryo, Nakatsuka Takuma, Sato Masaya, Uchino Koji, Enooku Kenichiro, Nakagawa Hayato, Fujinaga Hidetaka, Izumiya Masashi, Hanajiri Kazuyuki, Asaoka Yoshinari, Kondo Yuji, Tanaka Yasuo, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Impact of Obesity and Heavy Alcohol Consumption on Hepatocellular Carcinoma Development after HCV Eradication with Antivirals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Liver Cancer	6. 最初と最後の頁 309~319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000513705	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 Kurosaki Shigeyuki, Nakagawa Hayato, Hayata Yuki, Kawamura Satoshi, Matsushita Yuki, Yamada Tomoharu, Uchino Koji, Hayakawa Yoku, Suzuki Nobumi, Hata Masahiro, Tsuboi Mayo, Kinoshita Hiroto, Tanaka Yasuo, Nakatsuka Takuma, Hirata Yoshihiro, Tateishi Keisuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 3
2. 論文標題 Cell fate analysis of zone 3 hepatocytes in liver injury and tumorigenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JHEP Reports	6. 最初と最後の頁 100315 ~ 100315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhepr.2021.100315	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 Nakatsuka Takuma, Nakagawa Hayato, Hayata Yuki, Wake Taijiro, Yamada Tomoharu, Nishibatake Kinoshita Mizuki, Nakagomi Ryo, Sato Masaya, Minami Tatsuya, Uchino Koji, Enooku Kenichiro, Kudo Yotaro, Tanaka Yasuo, Kishikawa Takahiro, Otsuka Motoyuki, Tateishi Ryosuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 56
2. 論文標題 Post-treatment cell-free DNA as a predictive biomarker in molecular-targeted therapy of hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 456 ~ 469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01773-4	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 蒲生彩香, 斎藤明子, 田中康雄, 柳瀬幹雄, 稲垣冬樹, 三原史規, 竹村信行, 國土典宏, 中野雅行.
2. 発表標題 異なる病態を示した再胆管細胞癌の2切除例.
3. 学会等名 第45回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大島開, 斎藤明子, 美野正彰, 赤澤直樹, 田中康雄, 柳瀬幹雄.
2. 発表標題 メトトレキサート関連リンパ増殖性疾患として多発肝腫瘍を認めた1例.
3. 学会等名 第45回日本肝臓学会西部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Oshima K, Saito A, Mino M, Akazawa N, Tanaka Y, Yanase M.
2. 発表標題 A rare case of methotrexate-associated lymphoproliferative disorders (large B-cell lymphoma) appeared as multiple hepatic tumors.
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Annual Meeting 2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Saito A, Gamo A, Tanaka Y, Kojima Y, Yanase M, Inagaki F, Kokudo N, Miyazaki H, Nakano M.
2. 発表標題 Reconsidering Cholangiolocellular Carcinoma from 2 cases presenting with different characteristics.
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Annual Meeting 2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Tanaka Y, Saito A, Yanase M.
2. 発表標題 Long-term efficacy of rifaximin treatment in Japanese patients with hepatic encephalopathy.
3. 学会等名 The Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Annual Meeting 2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 田中康雄、小池和彦
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼCHIPのHBxの安定性に与える影響の検討
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
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
研究 分担者	建石 良介 (Tateishi Ryosuke) (50444089)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	
研究 分担者	工藤 洋太郎 (Kudo Yotaro) (90608358)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	

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
---------	---------