

令和元年6月14日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19145

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスの感染許容能に関わる宿主因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of host factors that regulate host susceptibility to hepatitis B virus infection and analysis of mechanisms.

研究代表者

九十田 千子 (Tsukuda, Senko)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：20710263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、B型肝炎ウイルス(HBV)の感染受容体としてNTCPが同定されたが、そのほかのHBV感染許容能を規定する宿主因子に関して未だ十分な理解がされていない。本研究では、当研究室で樹立されたHBV感染許容性/非許容性細胞細胞を用いたトランスクリプトーム解析を用いてHBV吸着/侵入/核移行を制御する宿主因子を同定し、その感染制御メカニズムを解析した。同定した宿主因子の一つは、NTCPの細胞内発現量には影響せず、NTCPの細胞内局在制御を介してHBV侵入過程を制御する宿主因子であることが示唆された。本件を通じてHBVの細胞侵入の分子メカニズムを理解する上で重要な情報を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルス研究では、汎用的かつ高効率にHBV感染を許容する感染培養細胞系の改善、およびマウスモデルなどのin vivo評価系の樹立が求められている。近年HBV感染受容体としてNTCPが同定され解析が進んだが、HBV侵入過程の詳細な制御機構に関しては未だほとんど不明である。今後さらに詳細な解析が必要であるが、本研究で同定したHBVの細胞内への侵入過程を制御する宿主因子は、HBV感染の動物モデルのあるいは新たな抗HBV薬の標的となり得るため、新たな薬剤開発に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent identification of NTCP as a receptor for hepatitis B virus (HBV) has facilitated the analysis of molecular mechanism of the HBV entry, however, the mechanism has not been fully understood. In this study, we aimed to identify host factors that regulate host susceptibility to HBV infection and analyze mechanisms. We identified host factors that affected on the HBV entry process through a transcriptome analysis of both HBV susceptible and non-susceptible cells. Further analysis revealed that one of the identified factors was involved in the HBV internalization into the cells through the regulation of NTCP localization in the cytosol without affecting NTCP expression. These findings will promote understanding of the mechanism of the HBV entry process after the viral attachment of its receptor.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎 B型肝炎ウイルス 受容体 NTCP 宿主因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルスやインフルエンザウイルスなど、ほとんどのウイルスは感染させるウイルス量に比例して感染細胞数は増加する。しかし、B型肝炎ウイルス (HBV) では、HBV 感染受容体である NTCP を発現させた細胞株では感染細胞の割合は 20%程度に留まり、この細胞株内に感染許容能を規定する宿主因子が存在すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、独自に樹立した HBV 感染/非感染許容性細胞のトランスクリプトーム解析及びウイルス学的解析から、感染許容能を規定する宿主因子を同定し、その制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。これにより高効率な感染培養細胞系の樹立、及び *in vivo* 評価系の樹立に有益な情報獲得を目指した。

3. 研究の方法

- (1) HBV 感染初期過程を制御する宿主因子のスクリーニング
当研究室で NTCP 過剰発現細胞株を単離する過程で NTCP 発現量が同等にも関わらず HBV 感染を許容する He-G2-hNTCP-C4 (C4) 細胞株、及びほとんど感染を許容しない HepG2-hNTCP-C8 (C8) 細胞株を得た。これらの細胞を用いてトランスクリプトームを行い、HBV 感染許容性で発現が高い 23 遺伝子を得た。続いて、これら 23 因子に対する siRNA を用いた HBV 感染実験により HBV 感染感受性に関与する 4 因子を同定した。これらの因子に関してさらに下記の方法を用いて制御機構の解析を行った。
- (2) HBV 吸着への影響解析
同定した宿主因子が HBV 吸着の制御に関与するかどうかを評価するため、siRNA を 72 時間導入した C4 細胞に HBV エンベロープ preS1 領域を蛍光標識したプローブ (preS1-probe) を処理し、蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いて細胞表面への吸着を評価した。
- (3) HBV 侵入への影響解析
HBV 侵入に対する影響を解析するため、siRNA 導入した C4 細胞に HBV あるいは preS1-probe を処理し、細胞内の HBV あるいは preS1-probe の局在を経時的に検出した。また、HBV 侵入以降から核移行への影響は D 型肝炎ウイルス (HDV) を利用して評価した。
- (4) HBV 受容体 NTCP への影響解析
HBV 感染受容体である sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) の胆汁酸トランスポーター活性に対する影響は [³H] タウロコール酸の取り込みを測定し評価した。また、NTCP の発現に対する影響は NTCP のタンパク質レベル、mRNA レベルへの影響はそれぞれウェスタンブロット法、リアルタイム PCR を用いて評価した。また、NTCP の局在は免疫蛍光法で観察した。
- (5) NTCP との相互作用解析
NTCP と同定した因子の細胞内相互作用は Proximity ligation assay により評価した。

4. 研究成果

B型肝炎ウイルス (HBV) 感染許容性/非許容性細胞細胞を用いたトランスクリプトーム解析の結果、HBV 感染許容性細胞で発現の高い因子を選抜した。siRNA を用いてこれの因子の中からさらに HBV 吸着/侵入/核移行を制御する宿主因子のスクリーニングし、再現よく HBV 感染を阻害した因子 1 つに着目した。この因子の HBV 吸着過程への影響を preS1-probe を用いて評価した標的因子をノックダウンした細胞で HBV 吸着過程および NTCP トランスポーター活性が促進されること示唆された。またこの因子をノックダウンした細胞では HDV の感染も低下することが示された。続いて NTCP 発現量への影響を解析した結果、この因子をノックダウンした細胞では細胞内の NTCP タンパク質量および mRNA 量に変化がないが、細胞膜常に局在する NTCP レベルが増加することが共焦点顕微鏡を用いた観察、ウェスタンブロット法により示された。標的因子をノックダウンした細胞では、細胞表面の NTCP に吸着した preS1-probe および NTCP の細胞内へ取り込みが阻害されていたことから、この因子は NTCP の細胞内局在制御を介して HBV 侵入以降の過程を制御する宿主因子であることが示唆された。

NTCP は HBV と結合し HBV を細胞内へと取り込むため HBV の吸着/侵入/核移行過程の制御メカニズムを理解する上で重要な因子であるが、NTCP による HBV 侵入を制御するメカニズムはほとんど明らかとなっていない。今後さらなる解析が必要ではあるが、本研究で得られた因子が NTCP を制御するメカニズムを解析することで、その一端を明らかにできると期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) [Tsukuda S, Fukano K, Watashi K, Wakita T. Concept of Viral Inhibitors via NTCP. 査](#)

- 読有. *Semin Liver Dis.* 39:78-95 (2019)
DOI: 10.1055/s-0038-1676804
- 2) Takeuchi JS, Fukano K, Iwamoto M, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Sureau C, Watashi K. A Single Adaptive Mutation in Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Induced by Hepadnaviruses Determines Virus Species Specificity. 査読有. *J Virol.* 93: e04132-18 (2018)
DOI: 10.1128/JVI.01432-18
 - 3) Fukano K, Tsukuda S, Oshima M, Suzuki R, Aizaki H, Ohki M, Park SY, Muramatsu M, Wakita T, Sureau C, Ogasawara Y, Watashi K. Troglitazone impedes the oligomerization of sodium taurocholate cotransporting polypeptide and entry of hepatitis B virus into hepatocytes. *Frontiers in Microbiology.* 査読有. *Front Microbiol.* 8:3257 (2018)
DOI: 10.3389/fmicb.2018.03257
 - 4) Saso W, Tsukuda S, Ohashi H, Fukano K, Morishita R, Matsunaga S, Ohki M, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Sureau C, Wakita T, Matano T, Watashi K. A new strategy to identify hepatitis B virus entry inhibitors by AlphaScreen technology targeting the envelope-receptor interaction. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 査読有. *Biochem Biophys Res Commun.* 501: 374-379 (2018)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.187
 - 5) Kaneko M, Futamura Y, Tsukuda S, Kondoh Y, Sekine T, Hirano H, Fukano K, Ohashi H, Saso W, Morishita R, Matsunaga S, Kawai F, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Ohtani N, Sureau C, Wakita T, Osada H, Watashi K. Chemical array system, a platform to identify novel hepatitis B virus entry inhibitors targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. 査読有. *Scientific Reports. Sci Rep.* 8: 2769 (2018)
DOI: 10.1038/s41598-018-20987-w
 - 6) Shimura S, Watashi K, Fukano K, Peel M, Sluder A, Kawai F, Iwamoto M, Tsukuda S, Takeuchi JS, Miyake T, Sugiyama M, Ogasawara Y, Park SY, Tanaka Y, Kusuhashi H, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. Cyclosporin derivatives inhibit hepatitis B virus entry without interfering with NTCP transporter activity. 査読有. *J Hepatol.* 66:685-92 (2017)
DOI: 10.1016/j.jhep.2016.11.009
 - 7) Tsukuda S, Watashi K, Hojima T, Isogawa M, Iwamoto M, Omagari K, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. A new class of hepatitis B and D virus entry inhibitors, proanthocyanidin and its analogs, that directly act on the viral large surface proteins. 査読有. *Hepatology.* 65: 1104-16 (2017)
DOI: 10.1002/hep.28952.
 - 8) Nakajima S, Watashi K, Ohashi H, Kamisuki S, Izaguirre-Carbonell J, Tae-Jun Kwon A, Suzuki H, Kataoka M, Tsukuda S, Okada M, Moi ML, Takeuchi T, Arita M, Suzuki R, Aizaki H, Kato T, Suzuki T, Hasegawa H, Takasaki T, Sugawara F, Wakita T.: Fungal-derived neoechinulin B as a novel antagonist of liver X receptor, identified by chemical genetics using hepatitis C virus cell culture system. 査読有. *J. Virol.* 90: 9058-74 (2016)
DOI: 10.1128/JVI.00856-16

〔学会発表〕(計 21件)

- 1) Fukano F, Tsukuda S, Ohki M, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Ogasawara Y, atashi W. Oligomerization of NTCP is required for hepatitis B virus internalization. The 66th Annual meeting of the Japanese Society for Virology. Kyoto (Japan). 2018
- 2) Saso W, Tsukuda S, Ohashi H, Fukano K, Morishita R, Matsunaga S, Ohki M, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Matano T, Watashi K. AlphaScreen technology targeting the envelope-receptor interaction identified a novel HBV entry inhibitor, rapamycin. The 66th Annual meeting of the Japanese Society for Virology. Kyoto (Japan). 2018
- 3) 九十田千子, 渡士幸一, 小嶋聡一, 脇田隆字. 重合フラボノイドによるB型肝炎感染阻害メカニズムの解析. 統合医療機能性食品国際学会. 札幌. 2018
- 4) Fukano K, Tsukuda S, Ohki M, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Oligomerization of NTCP induces hepatitis B virus internalization. International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Taormina (Italy). 2018
- 5) Saso W, Tsukuda S, Ohashi H, Fukano K, Morishita R, Matsunaga S, Ohki M, Ryo A, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Sureau C, Wakita T, Matano T, Watashi K. AlphaScreen assay targeting the NTCP-large surface antigen interaction identified

- rapamycin and its derivatives as novel hepatitis B virus entry inhibitors. International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Taormina (Italy). 2018
- 6) 渡士幸一, 九十田千子, 脇田隆字. 培養細胞系を利用した HBV cccDNA ダイナミクスの定量的検討. 日本肝臓学会総会. 大阪. 2018
 - 7) 深野顕人, 九十田千子, 鈴木亮介, 相崎英樹, 村松正道, 脇田隆字, 小笠原裕樹, 渡士幸一. SLC10A1/NTCP のトラッキング制御を標的とした新規 B 型肝炎ウイルス感染阻害戦略. 日本薬学会第 138 年会. 金沢. 2018
 - 8) 九十田千子, 渡士幸一, 小嶋聡一, 脇田隆字. NTCP を利用した HBV 創薬研究および NTCP を介した HBV 侵入機構の解析. 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017). 神戸. 2017
 - 9) Tsukuda S, Watashi K, Kojima Soichi, Wakita T. Identification of a new class of HBV and HDV entry inhibitor, proanthocyanidin. AASLD The Liver Meeting. Washington D.C. (USA). 2017
 - 10) Fukano K, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Identification of hepatitis B virus internalization inhibitor with a novel mode of action. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 大阪. 2017
 - 11) Tsukuda S, Watashi K, Kojima S, Wakita T. Identification of a new class of HBV and HDV entry inhibitor, proanthocyanidin. International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Washington D.C.(USA). 2017
 - 12) 九十田千子, 小嶋聡一, 脇田隆字. B 型肝炎ウイルスを標的とする proanthocyanidin の同定と作用機序の解析. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島. 2017
 - 13) 渡士幸一, 九十田千子, 脇田隆字. B 型肝炎ウイルス培養系を用いた創薬研究. 第 53 回日本肝臓学会総会. 広島. 2017
 - 14) 九十田千子. 感染培養系を用いた HBV 創薬と侵入機構の解析. 第 13 回肝免疫・ウイルス・フロンティア(Liver2017). 大阪. 2017
 - 15) Fukano K, Shimura S, Peel M, Sluder A, Kawai F, Tsukuda S, Suzuki R, Aizaki H, Park SY, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Identification of HBV entry inhibitors without interfering with the NTCP transporter activity. 5th JAPAN-TAOWAN-KOREA HBV HBV Research Symposium 2017. Tokyo (Japan). 2017
 - 16) Tsukuda S, Watashi K, Hojima T, Isogawa M, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Characterization of oligomeric flavonoids as a novel class of anti-HBV entry inhibitors that directly target viral envelope protein. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 札幌. 2016
 - 17) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Retinoid inhibitors abolish the host permissiveness to hepatitis B virus infection by modulating the expression of NTCP. 23rd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Kyoto (Japan). 2016
 - 18) Tsukuda S, Watashi K, Hojima T, Isogawa M, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Proanthocyanidin and its analogs are new class of HBV and HDV entry inhibitors that target the viral preS1 region. International HBV Meeting The Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Seoul (Korea). 2016
 - 19) 九十田千子, 小嶋聡一, 脇田隆字. B 型肝炎ウイルスを標的とした新規侵入阻害剤の同定と作用機序の解析. 第 52 回日本肝臓学会総会. 千葉. 2016
 - 20) 九十田千子, 渡士幸一, 濱田義知, 齊藤安貴子, 五十川正記, 田中義正, 鈴木亮介, 相崎英樹, 小嶋聡一, 杉山真也, 田中靖人, 溝上雅史, 脇田隆字. B 型肝炎ウイルス粒子を直接標的とする侵入阻害剤 proanthocyanidin. 第 26 回抗ウイルス療法学会総会. 名古屋. 2016
 - 21) Tsukuda S, Watashi K, Hamada Y, Isogawa M, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Inhibition of HBV entry process through targeting host and viral molecules. 4th JAPAN-TAOWAN-KOREA HBV HBV Research Symposium 2016. Taipei (Taiwan). 2016

〔図書〕(計 1 件)

Tsukuda S, Iwamoto M, Watashi K. NTCP (Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide). Encyclopedia of Signaling Molecules 2nd edition. 3591-3599 (2018)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。