

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08346

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスの感染受容体の解析

研究課題名(英文) Research for analysis of receptor gene used by hepatitis B virus

研究代表者

杉山 真也 (Sugiyama, Masaya)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・テニユアトラック部長

研究者番号：20612427

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型肝炎ウイルスが肝細胞へ侵入する際の受容体としてNTCPが同定されたが、必要な受容体が他にもあると考えられている。我々は、シングルセルRNA-seqを用いて、感染感受性を持つ肝細胞に特徴的な遺伝子を網羅的に探索しRECK遺伝子に発見した。本研究では、RECKが感染に関連する分子であるかを明らかにするために、HBVとRECKの結合、RECKとNTCPの局在関係、細胞内への取り込み過程の詳細について解析を行った。RECK遺伝子がHBV感染の初期過程に果たす役割としては、HBVとの結合、NTCP遺伝子との結合の有無を確認した。HBV感染によって、RECK量の変化が生じることを認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVに対する治療薬の開発はされてきたが、核酸アナログ製剤に留まっている。それ以外の薬剤では十分な効果が期待できない。新規創薬起点を同定するためには、HBVの感染過程を詳細に理解する必要がある。今回の解析を通して、HBV感染に必要な分子を明らかと出来れば、その過程を阻害する薬剤を開発することにつながる。また、既報の分子も含めて、マウス肝細胞やマウス個体で発現させることで、マウスでの安価なHBV感染モデルの確立へつながり、HBVの創薬研究を発展させることができる。

研究成果の概要(英文)： NTCP has been identified as a receptor for hepatitis B virus entry into hepatocytes. However, NTCP is not the only receptor that regulates the entry process, and it is thought that there are other receptors required for infection. We used single-cell RNA-seq to conduct a comprehensive search for genes characteristic of infection-susceptible hepatocytes, leading to the discovery of the RECK gene. In this study, we analysed the binding between HBV and RECK, the localisation relationship between RECK and NTCP, and the details of the cellular uptake process along the HBV entry process in order to clarify whether RECK is a relevant molecule for infection. The role of the RECK gene in the initial process of HBV infection was confirmed in terms of its binding to HBV and its binding to the NTCP gene. It was observed that HBV infection causes changes in RECK levels.

研究分野：感染症学

キーワード：B型肝炎ウイルス 感染 侵入 受容体

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) の研究領域では、HBV ゲノムを細胞内へ導入することで HBV 複製を観察できる実験系はあったが、HBV の侵入過程を観察できる細胞株は存在しなかった。その中で、HBV の感染受容体として、NTCP 遺伝子が同定された (Yan et al. eLife 2012) が、我々が HBV 感染させた初代培養肝細胞でシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) 解析したところ、各肝細胞の遺伝子発現プロファイルは様々であり、多様な肝細胞の集合体であった。加えて、NTCP 遺伝子を発現した肝細胞に限ってみても、HBV 感染は NTCP 発現した肝細胞の全てには生じていないことを確認した。このことから、scRNA-seq データを使い、NTCP 発現肝細胞を HBV 配列の有無で 2 群化して比較したところ、細胞表面の発現する遺伝子として 4 遺伝子を得た。それらのノックアウト (KO) 細胞を作出して HBV 感染を評価した結果、RECK を同定するに至った。申請者は、NTCP と RECK をそれぞれ KO、ノックイン (KI) した肝細胞株 (HuH7、HepG2) を作成した。

2. 研究の目的

上記のように、HBV の感染に必要な受容体として、NTCP 遺伝子が同定された。しかしながら、HBV の侵入が観察されるのは、NTCP を発現する肝細胞の中でもその一部であった。一方で、NTCP を細胞内へ引き込む分子として、EGFR が同定された (Iwamoto et al. PNAS 2019) 但し HBV と EGFR の結合はなく、NTCP の細胞内移行を説明するものであった。このように、NTCP の発見はあったものの、未だに HBV の侵入過程には不明な点が多く、HBV 感染に必要とされる未同定の分子の存在が示唆されている。

我々は、初代培養肝細胞へ HBV 感染をさせて、1 ウェル中の細胞集団で scRNA-seq 解析を行い、RECK 遺伝子を感染受容体の有力候補として同定した。本研究では、RECK 遺伝子が HBV 感染に関わる分子であることを確認した。また、そのステップに関わる機能解析を詳細に行うことを目的とした。

3. 研究の方法

「RECK と HBV の結合の評価」

RECK が感染に関わるか評価するために、RECK を KO した NTCP 発現 HuH7 細胞を作出した。RECK と HBV の直接的な結合の有無を評価するために、NTCP と RECK をともに KO した HuH7 細胞と HepG2 細胞を作出した。一方、NTCP を KO し、RECK を発現させた細胞を用意した。それらに対して、PreS-TAMRA ペプチド (PreS は HBV の外殻の一部で受容体と結合するとされる。その PreS に蛍光分子の TAMRA を結合した) もしくは HBV 粒子 (細胞株もしくは患者血液由来) を培地中に添加した。それらの細胞を 4 度で培養して細胞内取り込みを抑制し、細胞表面に吸着した TAMRA の蛍光強度、または HBVDNA の定量、HBs 抗原、HBc 抗原の免疫染色を行った。続いて 4 度から 37 度へ温度を移行させ、細胞内への取り込みが行われるかを上記同様に蛍光観察と定量 PCR 等で確認した。

「RECK と NTCP の結合と局在関係の評価」

RECK と NTCP の相互作用と結合状態を評価する。HBV と NTCP が結合すると NTCP の分子形態が変化するという知見があるため、HBV の有無も条件に加えた。細胞固定後に、RECK と NTCP のそれぞれに対して、免疫沈降とイムノプロットを行い、直接的な結合を確認した。NTCP の抗体は、結合能が不安定なものが多いため、FLAG タグを付加した発現系を利用した。また、RECK と NTCP の位置関係を可視化するために、RECK と NTCP をそれぞれ蛍光化し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

加えて、既報の EGFR と RECK の結合の有無も評価した。EGFR は EGF 存在下で形態が変化することが、HBV 感染に重要であると報告されているため、EGF 濃度を段階的に変化させた状態で、かつ HBV の有無もパラメーターとして考慮して、EGFR と RECK の結合と位置関係を免疫沈降法と蛍光染色で確認した。

「ヒト由来 RECK と NTCP のマウス細胞での強制発現とその HBV 感染性の評価」

これまでの知見では、ヒト NTCP を強制発現させたマウス細胞では、HBV の感染が成立しなかった。一方、HBV ゲノムを強制導入したマウス個体やマウス肝細胞は、HBV が複製することから、HBV 侵入に関わるステップ (受容体結合、細胞内取り込み、核内移行等) のいずれかで必要な機能が障害を受けていると考えられた。

ヒト由来の NTCP と RECK をマウス細胞株 (AML12、FL83B) で強制発現させ (マウス肝細胞のヒト化) HBV 感染が成立するか評価した。ヒト EGFR の発現もここに加えた。安定発現させるために、各遺伝子はレンチウイルスベクターで行い、薬剤耐性遺伝子を利用して、安定発現株をクローン化した。

得られた安定発現細胞株に、PreS-TAMRA もしくは HBV 粒子を投与して、細胞への吸着、細胞内への取り込み、細胞核内移行、ウイルス複製の有無を評価する。細胞吸着は、細胞を 4 度で培養し、細胞表面の蛍光もしくは定量 PCR による HBVDNA の検出を行った。細胞内への取

り込みの評価は、4 度から 37 度へ細胞を移行させることで細胞内に存在する PreS-TAMRA 蛍光観察、もしくは免疫染色による細胞内の HBs 抗原の観察、HBVDNA の定量を行った。ウイルス複製は、感染後約 5 日間培養を行い、培養上清中の HBs 抗原量の経時的な変化を ELISA で確認した。また、HBVDNA を定量 PCR とサザンブロットで評価した。

4. 研究成果

「RECK と HBV の結合の評価」

これまでの予備実験では、RECK をノックアウト (KO) した NTCP 発現 HuH7 細胞では、HBV 感染が成立せず、そこにノックイン (KI) すると HBV の感染が生じた (図 1)。このことから、HBV 感染の初期過程に RECK が関連していると考えられたが、その機序は不明であった。そこで、RECK と HBV の直接的な結合の有無を評価するために、NTCP と RECK を共に KO した HuH7 細胞や HepG2 細胞を用意した。そこに RECK を発現させた細胞を用意した。PreS-TAMRA ペプチド (PreS は HBV の外殻の一部で受容体と結合するとされる。その PreS に蛍光分子の TAMRA を結合した) もしくは HBV 粒子 (細胞株もしくは患者血液由来) を培地中に添加した。それらの細胞を 4 度で培養して細胞内取り込みを抑制し、細胞表面に吸着した TAMRA の蛍光強度、または HBVDNA の定量、HBs 抗原、HBc 抗原の免疫染色を行った。その結果、RECK 単独での発現では、PreS-TAMRA ペプチドと HBV 粒子の吸着は認められなかった。一方、NTCP を復帰発現させた場合では、既報の通り PreS-TAMRA ペプチドと HBV 粒子の結合が認められた。これらのことから、HBV の結合は NTCP で起こっており、RECK では無いことが確認された。

「RECK と NTCP の結合と局在関係の評価」

RECK と NTCP の相互作用と結合状態の評価をした。HBV と NTCP が結合すると NTCP の分子形態が変化するという知見があるため、HBV の有無でも検討した。細胞固定後に、RECK と NTCP のそれぞれに対して、免疫沈降とイムノブロットを行い、直接的な結合を確認した。NTCP の抗体は、結合能が不安定なものが多いため、FLAG タグを付加した発現系を利用した。その結果、NTCP と RECK は相互作用を示し、共沈していることを確認した。HBV の存在下ではその結合する量が増加している傾向を認めた。

また、RECK と NTCP の位置関係を可視化するために、RECK と NTCP をそれぞれ蛍光化し、共焦点レーザー顕微鏡で観察する。本実験においても、HBV 感染の有無も条件に加えて、RECK と NTCP の位置関係を確認した。加えて、既報の EGFR と RECK の結合の有無も評価した。その結果、細胞膜状では、NTCP と RECK は共同在していることを確認した。HBV 感染によって細胞表面上の RECK 量が低下する傾向を示した。EGFR は HBV 感染した場合には増加する様子を観察した。

EGFR は EGF 存在下で形態が変化することが、HBV 感染に重要であると報告されているため、EGF 濃度を段階的に変化させた状態で、かつ HBV の有無もパラメーターとして考慮して、

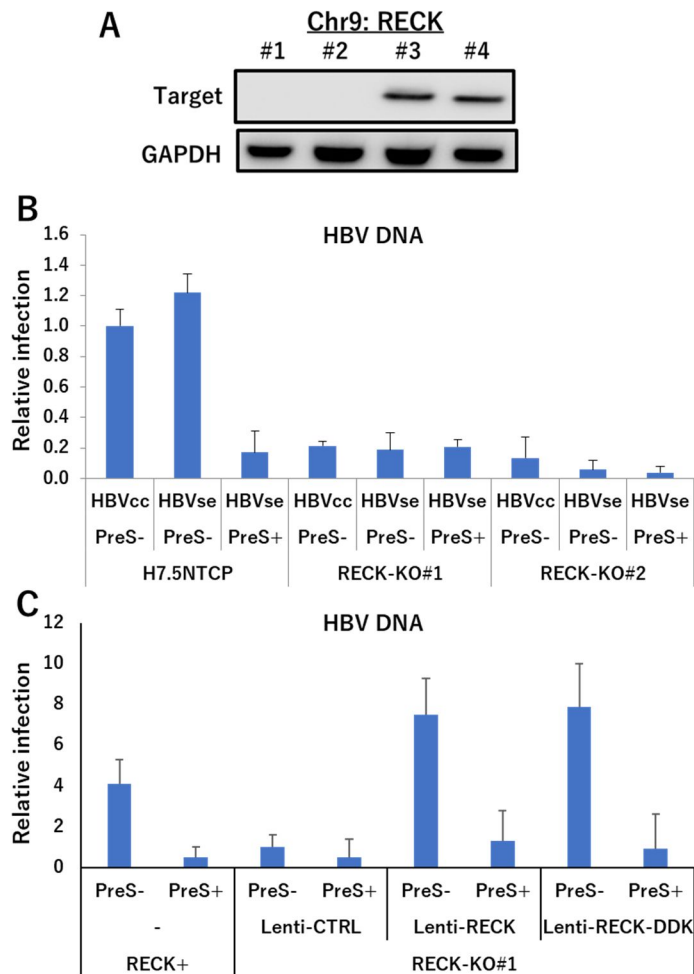


図 1. RECK 遺伝子の有無による HBV 感染の評価

A) CRISPR 系を使い RECK をノックアウト (KO) した NTCP 発現 HuH7.5 細胞を作出した。B) その KO 細胞へ HBV 感染させたところ感染効率が低下した。C) KO 細胞へ Lentivirus vector で RECK 遺伝子を戻したところ HBV 感染感受性が回復した。HBVcc: 細胞株で作成した HBV 粒子、HBVse: 患者血清から得た HBV 粒子、PreS: HBV 感染を阻害するペプチド、+: 添加あり、-: 添加なし

EGFR と RECK の結合と位置関係を免疫沈降法と蛍光染色で確認した。その結果、適切な EGF 量において、HBV 感染が増加することを確認した。一方、過剰量の EGF では HBV 感染効率が低下することを確認した。EGF の適正な量によって調整されと考えられた。

「ヒト由来 RECK と NTCP のマウス細胞での強制発現とその HBV 感染性の評価」

これまでの知見では、ヒト NTCP を強制発現させたマウス細胞では、HBV の感染が成立しない。一方で、HBV ゲノムを強制導入したマウス個体やマウス肝細胞は、HBV が複製することから、HBV 侵入に関わるステップ（受容体結合、細胞内取り込み、核内移行等）のいずれかで必要な機能が障害を受けていると考えられた。現在、ヒト肝臓を免疫不全マウスへ移植する手法で *in vivo* の感染実験を行っているが、将来的には正常な免疫機能を有するマウスでの感染実験が理想であるため、まずはマウス肝細胞株での感染モデルの樹立を目指した。

ヒト由来の NTCP と RECK をマウス細胞株（AML12、FL83B）で強制発現させ（マウス肝細胞のヒト化）、HBV 感染が成立するか評価した。加えて、ヒト EGFR の発現もここに加えた。安定発現させるために、各遺伝子はレンチウイルスベクターで行い、薬剤耐性遺伝子を利用して、安定発現株をクローン化した。得られた安定発現細胞株に、PreS-TAMRA もしくは HBV 粒子を投与して、細胞への吸着、細胞内への取り込み、細胞核内移行、ウイルス複製の有無を評価した。細胞吸着は、細胞を 4 度で培養し、細胞表面の蛍光もしくは定量 PCR による HBVDNA の検出を行った。その結果、PreS-TAMRA ペプチドもしくは HBV 粒子による吸着は認められたため、引き続いて、細胞内への取り込みの評価を行った。4 度から 37 度へ細胞を移行させたところ、PreS-TAMRA 蛍光ペプチドもしくは HBV 粒子の細胞内への取り込みは観察できなかった。これらのことから、HBV 粒子の侵入過程において、マウス細胞では必要な因子が不足していると考えられた。

「マウス肝細胞での感染を成立させる因子の探索」

遺伝子導入したマウス肝細胞株での HBV 感染が確認できなかったため、今回の検討によって、受容体結合、細胞内取り込み、核内移行のどこで障害が生じていると考えられた。その不足を補うために、シングルセル RNA-seq 解析データから、HBV 感染した細胞としなかった細胞の間で比較解析を行い、HBV 感染に必要なヒト遺伝子を再度選んだ。個別での調査は、時間を要するため、ある程度の遺伝子をセットとしてまとめてマウス肝細胞へ導入することで感染性の変化を検討した。この結果は現在解析中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Chen Shin-Wei, Himeno Misao, Kouji Yuta, Sugiyama Masaya, Nishitsuji Hironori, Mizokami Masashi, Shimotohno Kunitada, Miyajima Atsushi, Kido Taketomo	4. 巻 10
2. 論文標題 Modulation of hepatitis B virus infection by epidermal growth factor secreted from liver sinusoidal endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 .
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-71453-5	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山真也、溝上雅史
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスの感染初期過程に関連するヒト遺伝子の探索とその機能解析
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
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
---------	---------