

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860306

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルス感染に対する宿主防御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular dissection of HBV evasion from host antiviral responses

研究代表者

宮川 敬 (MIYAKAWA, Kei)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：20580046

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)：B型肝炎ウイルス(HBV)に対するインターフェロン(IFN)療法の奏効率は低い。その要因の一つとしてHBVがIFN誘導性の宿主防御機構を回避する可能性が考えられる。本研究では、HBV外套蛋白質であるHBsがIFN誘導性の抗ウイルス因子の一つであるTetherinを拮抗する機能をもつことを明らかにした。HBsはTetherinと膜貫通領域で結合しその機能的二量体化を阻害した。HBs結合領域を欠損したTetherinはHBs抵抗性を示し、強い抗HBV活性を示した。HBs抵抗性Tetherinを発現させたiPS由来成熟肝細胞は顕著な抗HBV活性を示し、HBV由来の細胞傷害効果も顕著に抑制された。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence strongly suggests the ineffectiveness of interferon (IFN) therapy against chronic hepatitis B virus (HBV) infection. In this study, we demonstrate that HBV surface protein (HBs) plays a crucial role in counteracting the IFN-induced antiviral response mediated by an antiviral membrane protein tetherin. HBs can interact with tetherin via its transmembrane domain thereby inhibiting its dimerization and antiviral activity. The expression of a tetherin mutant devoid of the HBs-binding domain promoted a prominent restriction of HBV particle production, that eventually resulted in the alleviation of caspase-1-mediated cytotoxicity and interleukin-1 secretion in induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes. Our current study thus reveals a previously un-described molecular link between HBV and tetherin during the course of an IFN-induced antiviral response.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス-宿主相互作用 ピロトーシス

1. 研究開始当初の背景

Molecular dissection of HBV evasion from the innate immune response B 型肝炎ウイルス (HBV) は全世界で約 4 億人、日本でも約 100 人に 1 人の割合で持続感染者 (キャリア) がいると推測されている。本邦においては予防事業が奏功し、従来の主要な感染経路であった母子感染は激減したが、現在は性行為感染症として若者を中心に感染が拡大しており、公衆衛生上の大きな問題となっている。HBV は臨床的特徴の異なる 9 種類の genotype が存在し、とくに最近ではキャリア化しやすい欧米型 (genotype A) ウイルスが日本に流入し、現行ワクチンの有効性やキャリアの増加が懸念されている。感染しても多くの場合はウイルスが自然排除されるが、一部はキャリア化する。キャリア化したウイルスが活性化すると慢性肝炎、肝硬変を経て肝細胞癌へと進行する。病状の進行は肝細胞における HBV 量と相関があり、したがってウイルス量を低く維持することが重要である。治療には主に核酸アナログ製剤やインターフェロン (IFN) 製剤が使用されるが、前者は長期服用による薬剤耐性ウイルスの出現が、後者は低い奏功率と HBV 遺伝子型による治療効果の差が問題となっている。したがって、これらの問題を根本的に解決する薬剤標的の探索が望まれている。

2. 研究の目的

我々の細胞には、I 型 IFN で発現が誘導される、強い抗ウイルス活性をもつ内因性防御因子が存在する。そのうち、広範なウイルスに対して阻害活性を示すものが Tetherin と呼ばれる膜蛋白質である。Tetherin は感染細胞から新たに産生されたウイルスを細胞膜上に繫留することでウイルス産生を阻害する。Tetherin は HIV、HCV、HSV、エボラウイルスなど、エンベロップをもつウイルス全般に対して阻害活性を示すが、HBV に対する知見はない。いくつかのウイルスでは Tetherin に拮抗する蛋白質をコードしている。そこで本研究では、Tetherin の肝細胞での発現とその抗 HBV 活性、およびウイルスによる拮抗作用の有無について検討した。

3. 研究の方法

HepG2 細胞またはヒト成熟肝細胞に HBV 1.24 倍長クローンと共に Tetherin 発現ベクターまたは Tetherin 特異的 siRNA を導入し、I 型 IFN 存在下または非存在下でのウイルス複製効率を検討した。ウイルス複製効率は、細胞上清中および細胞内の HBs 抗原量と HBV DNA 量をそれぞれ ELISA 法とリアルタイム PCR 法を用いて定量した。また免疫沈降法や蛍光染色法を用いてウイルス蛋白質と Tetherin との相互作用や細胞内局在を調べた。Tetherin 中和試験は、HepG2 細胞に HIV-1 Gag-Pol 発現ベクターと Tetherin 発現ベクターおよび HBs 発現ベクターとをそれぞれ導

入し、48 時間後に上清と細胞を回収し、ELISA 法とウエスタンブロット法を用いて HIV-1 ウイルス様粒子 (VLP) 量を測定し定量化した。

4. 研究成果

(1) I 型 IFN の有する抗 HBV 活性の検討

HepG2 細胞とプライマリーヒト成熟肝細胞に I 型 IFN を処理したところ、濃度依存的な Tetherin の発現誘導が見られた (図 1)。HepG2 細胞に HBV 発現ベクターを遺伝子導入後、IFN 刺激を行うと、僅かだが有意に上清 HBs 抗原量および上清 HBV DNA 量が低下した。この効果は Tetherin をノックダウンした場合に消失したことから (図 2)、Tetherin は I 型 IFN の有する抗 HBV 活性の一部を担う可能性が示唆された。

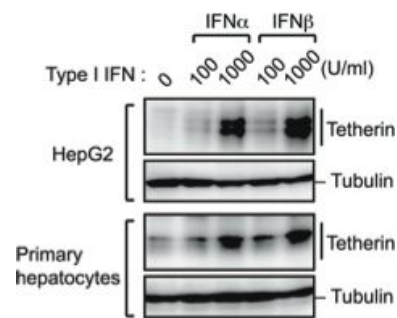


図 1 I 型 IFN による Tetherin の発現誘導

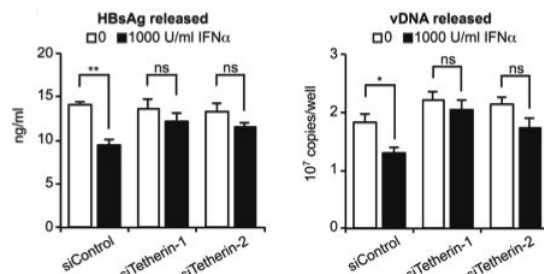


図 2 Tetherin ノックダウン細胞における I 型 IFN の抗 HBV 活性

(2) HBV 抗原による Tetherin 拮抗機能の検討

HBV に Tetherin 拮抗能があるかを調べるため、まず HBV 全蛋白質と Tetherin の細胞内相互作用の有無について調べたところ、HBs 蛋白質のみが Tetherin 結合活性を示し、細胞内で共局在した (図 3)。またこの相互作用は、HBs の C 末端側の膜貫通ドメイン (TM4) と、Tetherin の膜貫通領域どうしに依るものであった。HIV-1 VLP を用いた Tetherin 中和試験の結果、HBs は Tetherin の抗ウイルス活性を用量依存的に中和したが、TM4 欠損型 HBs は中和活性が見られなかった (図 4)。Native PAGE 法による解析の結果、HBs 発現細胞では Tetherin の二量体化が抑制されたのに対し、コントロール細胞や TM4 欠損型 HBs 発現細胞では Tetherin が二量体形成していた (図 5)。そこで二量体形成できない Tetherin 変異体

を作製したところ、この変異体は抗 HBV 活性を完全に失った。これらの結果から、HBs は Tetherin と膜貫通領域で結合し Tetherin の機能的二量体化を阻害することで本因子の抗ウイルス活性を中和していると考えられた (図 5)。

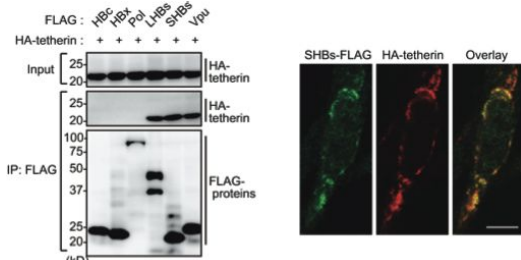


図 3 Tetherin と HBs の細胞内相互作用

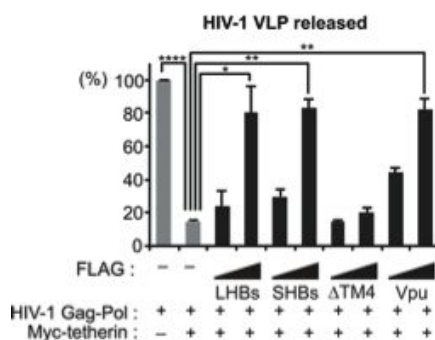


図 4 HBs による Tetherin 拮抗作用

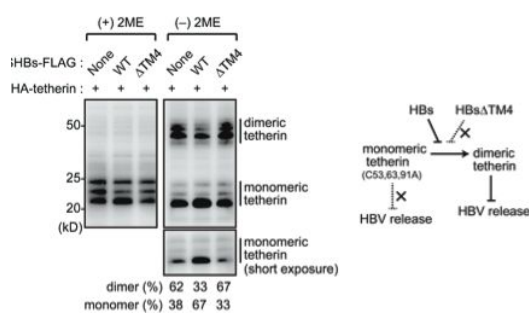


図 5 HBs による Tetherin 二量体化の阻害とその拮抗機構

(3) HBs 抵抗性 Tetherin の抗 HBV 活性の検討

Tetherin の膜貫通領域が HBV HBs 蛋白質によって標的化されることで不活化に至ることから、この標的化領域を他の膜蛋白質の膜貫通領域とアミノ酸置換し、且つ Tetherin の抗 HBV 活性が維持できれば、野生型 Tetherin よりも強い抗ウイルス活性をもつ「HBs 抵抗性 Tetherin」が作製できると考えた。そこで当該領域をマウス Tetherin やヒトトランスフェリン受容体のものと置換したキメラ Tetherin を複数作製した。予想通り、これらのキメラ Tetherin は HBs との相互作用を示さなかった (図 6)。キメラ Tetherin は HBs による二量体化阻害も受けず、また HBs による拮

抗作用も受けなかった。この HBs 抵抗性 Tetherin を肝細胞に発現させたところ、野生型 tetherin よりも HBV 産生が有意に抑制された (図 7)。次に、テトラサイクリン依存的に NTCP を発現する細胞 (HepG2-Tet-NTCP 細胞) に野生型もしくは HBs 抵抗性 Tetherin を恒常的に発現する細胞株を作製し、これらの細胞株における HBV 複製効率を調べた。コントロール細胞や野生型 Tetherin を発現させた細胞では、ほとんど HBV 複製が阻害されなかった。これは恒常発現する Tetherin 量が少ないために、HBs によって拮抗された結果だと考えられた。一方、HBs 抵抗性 Tetherin を発現させた細胞では、コントロールに比べ HBV 複製を有意に阻害した。また、野生型、HBs 抵抗性 Tetherin とともにその発現は NTCP の発現量には影響しなかった。

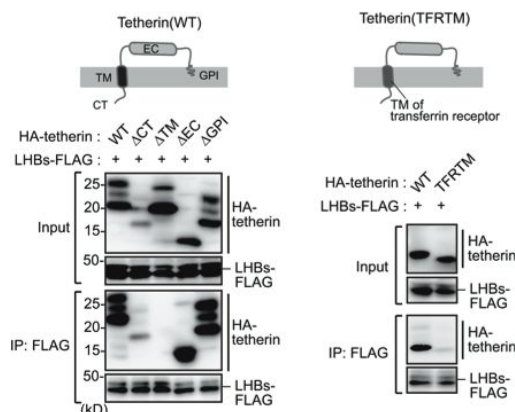


図 6 キメラ Tetherin と HBs の相互作用

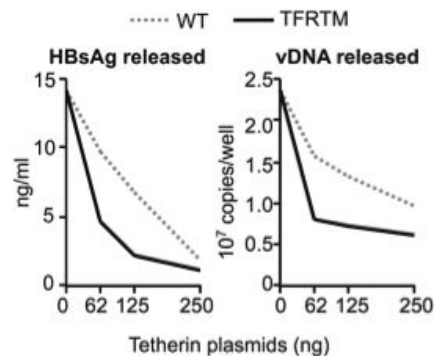


図 7 HBs 抵抗性 Tetherin の抗 HBV 活性

(4) HBs 抵抗性 Tetherin を用いた細胞療法へ向けた基礎検討

近年、iPS 細胞を用いた成熟肝細胞への分化技術が確立しつつある。そこで野生型もしくは HBs 抵抗性 Tetherin と HBV 1.24 倍長クローンを iPS 由来成熟肝細胞へ導入しこの細胞における HBV 産生効率や細胞傷害性への影響について検討した。細胞株での結果と同様、コントロール細胞や野生型 Tetherin を発現させた iPS 由来成熟肝細胞では、ほとんど HBV 産生が阻害されなかった。しかし HBs 抵抗性 Tetherin を発現させた細胞では、コントロールに比べ HBV 産生を有意に阻害した

(図8) また興味深いことに、コントロール細胞や野生型 Tetherin 発現細胞では、HBV 産生の増加に伴って生存細胞数の減少が観察された(図8)。これらの群では細胞外への IL-1 β および LDH (乳酸脱水素酵素) の放出が増加しており、また細胞内で活性化型カスペーゼ1が検出されたことから、炎症誘導性プログラム細胞死の一種であるピロトーシスが生じたと考えられた。一方、HBs 抵抗性 Tetherin を発現させた細胞群ではピロトーシスマーカーが顕著に低く、生存細胞数の減少もほとんど見られなかった(図9)。以上の知見から、HBs 抵抗性 Tetherin は HBV 産生を顕著に抑制でき、且つ成熟肝細胞に発現させることにより、ウイルスによる細胞傷害効果の抑制可能であることが示唆された。

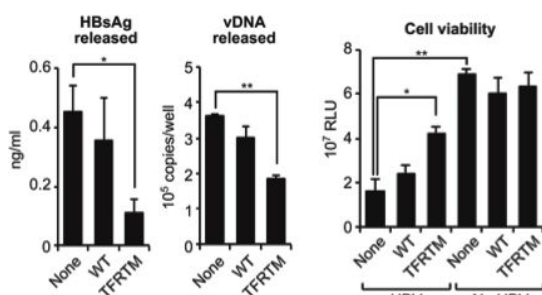


図8 iPS 由来成熟肝細胞における野生型および HBs 抵抗性 Tetherin の抗 HBV 活性

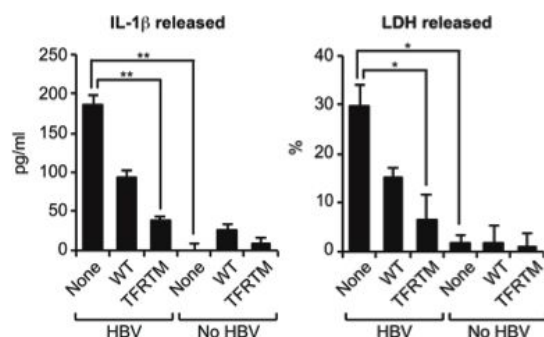


図9 野生型および HBs 抵抗性 Tetherin によるピロトーシスマーカーの変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Miyakawa K, Matsunaga S, Watashi K, Sugiyama M, Kimura H, Yamamoto N, Mizokami M, Wakita T, Ryo A: Molecular dissection of HBV evasion from restriction factor tetherin: A new perspective for antiviral cell therapy. **Oncotarget** 6(26), 21840-21852, 2015. 査読有

Miyakawa K, Matsunaga S, Kanou K, Matsuzawa A, Morishita R, Kudoh A, Shindo K,

Yokoyama M, Sato H, Kimura H, Tamura T, Yamamoto N, Ichijo H, Takaori-Kondo A, Ryo A: ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction. **Nature Communications** 6:6945, 2015. 査読有

[学会発表](計 4 件)

Miyakawa K, Matsunaga S, Watashi K, Sugiyama M, Mizokami M, Wakita T, Ryo A: Molecular dissection of HBV evasion from restriction factor tetherin, International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Bad Nauheim (Germany), Oct 7, 2015.

Matsunaga S, Miyakawa K, Watashi K, Sugiyama M, Mizokami M, Wakita T, Ryo A: Development of anti-HBs monoclonal antibody targeting HBs-NTCP interaction, International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Bad Nauheim (Germany), Oct 7, 2015.

宮川 敬, 松永智子, 渡士幸一, 杉山真也, 溝上雅史, 脇田隆字, 梁 明秀: 宿主防御因子 Tetherin/BST2 による B 型肝炎ウイルス感染抑制とその回避機構の解明, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2014 年 11 月 12 日

山岡 悠太郎, 宮川 敬, 松永 智子, 宮本摩由, 黒山浩之, 千室智之, 梁 明秀: B 型肝炎ウイルスのコアタンパク質(HBc)に対するマウスモノクローナル抗体の作製と解析, 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2014 年 11 月 10 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮川 敬 (MIYAKAWA, Kei)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号: 20580046

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし