

令和4年10月31日

各報道機関文教担当記者 殿

B型肝炎ウイルスが細胞核に侵入する 新しい感染経路を発見！

金沢大学医薬保健研究域保健学系の本多政夫教授，医薬保健研究域医学系の李影奕博士研究員，山下太郎教授，金子周一特任教授らの研究グループは，**B型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus : HBV^{*1}）がゴルジ逆行性輸送経路^{*2}を介して核内に侵入する新しい感染経路を発見しました。**

HBVは肝臓に持続感染し，慢性肝炎や肝細胞がんの誘因となっています。現行の抗ウイルス剤ではHBVを肝細胞から完全に排除することはできず，肝細胞がんの発生を完全に防ぐことはできません。HBVはそのレセプターであるNa(+)/Taurocholate Transport Protein (NTCP)を介して細胞内に侵入しますが，細胞内に侵入したのち，初期エンドソーム（Early endosomes : EEs^{*3}）から後期エンドソーム（Late endosomes : LEs^{*4}）に到達し，核内に侵入すると考えられていました（図1）。

今回，本研究グループは細胞内に侵入したHBVが従来の経路に加えて，EEsからトランスゴルジネットワーク（Trans-Golgi network : TGN^{*5}），次いで小胞体（Endoplasmic reticulum : ER^{*6}）を経て，核内に侵入するゴルジ逆行性輸送経路を利用していることを発見しました（図1）。この経路は，リソソームからの分解を回避しながら効率よく核内に侵入できるため，HBVの持続感染機構の一つであると考えられます。さらに，本研究グループはHBVのゴルジ逆行性輸送経路がグアニンヌクレオチド交換因子（Guanine nucleotide exchange factor : GEF^{*7}）活性を有するDOCKファミリー分子^{*8}の一つである，DOCK11（Dedicator of Cytokinesis 11）によって制御されていることを突き止めました。DOCKファミリー分子は近年，がん，免疫疾患に加え，COVID19を含む感染症の治療標的として注目されており，**本研究グループの発見は，DOCK11を標的とした新たな抗HBV薬の開発に繋がることを期待されます。**

本研究成果は，2022年10月18日「Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology」のオンライン版に掲載されました。

【研究の背景】

HBVは、全世界で約3億5,000万人が感染していると言われ、そのうち日本では、約130~150万人（およそ100人に1人）が感染していると推定されています。HBVの持続感染により慢性肝炎から肝硬変、さらには肝細胞がんへと進展する可能性があります。現行の核酸アナログではウイルスの複製を抑制することはできますが、HBV感染を肝臓から完全に無くしてしまうことはできません。HBV感染完治に向けた治療薬の開発が望まれています。

HBVは肝細胞に感染し、核内で安定なcccDNA (covalently closed circular DNA^{※9}) を形成しながら、持続感染を行います。しかし、HBVがどのように核内に侵入するかについては明らかではありませんでした。

【研究成果の概要】

これまでに本研究グループは、HBVが持続感染するB型肝炎由来の培養細胞株を樹立し、DOCK11がHBVの持続感染に重要な働きをしていることを発見しました。DOCK11はゴルジに多く局在することから、HBV感染との関連を調べるために、研究グループはHBVのヌクレオキャプシド (HBcAg)やエンベロープ (HBsAg) にテトラシステイン・タグを挿入し、蛍光ラベルしたHBV感染粒子を作成しました。超解像度顕微鏡を用いて経時的に蛍光ラベルしたHBV感染粒子を観察すると、細胞内に侵入したHBVは、EEsからLEsに移行して核に侵入する従来の経路に加えて、EEsからTGN、そしてERに移行して核に侵入するゴルジ逆行性輸送経路を利用していることが分かりました(図2)。興味深いことに、HBVのヌクレオキャプシドはEEsからTGNへ移行する際にHBV粒子から遊離し、ヌクレオキャプシドのみがTGNに移行していました。このように、HBVはゴルジ逆行性輸送経路を介して核内に侵入する新たな感染経路を利用していることが明らかとなりました。また、LEsの働きに重要な低分子量G蛋白質Rab7を欠損させた細胞を樹立し、HBVを感染させると、HBVのゴルジ逆行性輸送感染経路が増強し、細胞全体のHBV感染が増強することが分かりました。このことから、HBVのゴルジ逆行性輸送感染はLEsにおけるリソソームによるHBVの分解からの回避に役立っていると考えられます。さらに、DOCK11の過剰発現や発現抑制はHBVのゴルジ逆行性輸送感染の増強や抑制と関連していること、DOCK11はゴルジ逆行性輸送に重要な働きをしている分子(AGAP2やARF1(図1))やHBVヌクレオキャプシドと複合体を形成していることが分かりました。したがって、DOCK11はHBVのゴルジ逆行性輸送感染に極めて重要な働きをしている分子であることが明らかとなりました。

さらに治療的な観点から、DOCK11の長期間にわたる発現抑制を行うことで核内のcccDNAが顕著に抑制されることが分かりました。また、核酸アナログ製剤との併用増強効果も確認できました。

【今後の展開】

本研究では、HBVがゴルジ逆行性輸送経路を介して核内に侵入する新しい感染経路を発見しました。この感染経路は、リソソームでのHBVの分解を回避しながら核内に侵入できる利点と、HBVが細胞質に出ることがなく膜の中を移動して核内に到達するため内因性のインターフェロンの攻撃を回避できる利点があり、HBVの細胞内持続感染機構

として重要な働きをしていると考えられます。DOCK11 はゴルジ逆行性輸送を制御することから、DOCK11 を標的とした治療法が HBV の持続感染の阻止に有効である事が示唆されました。今後、DOCK11 を標的としたペプチド、低分子化合物、核酸製剤の有効性が期待されます。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 B 型肝炎創薬実用化等研究事業 (B 型肝炎ウイルス排除に向けた新規治療法の最適化と学術基盤の確立) の支援を受けて実施されました。

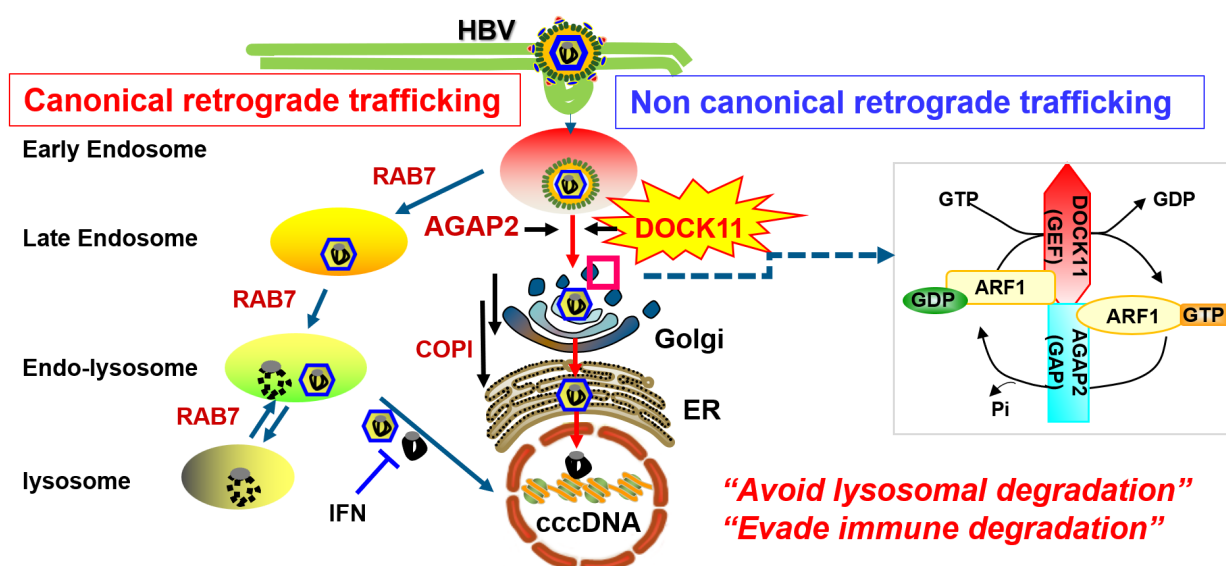


図 1

従来の報告では、HBV は細胞膜上のレセプターNTCP を介して細胞内に侵入したのち、初期エンドソーム (EEs) から後期エンドソーム (LEs) に移行し、LEs はリソソームと癒合し、HBV はリソソームによる分解を受けながら、ヌcleoキャプシドが核に移行する経路が提唱されていた。本研究では、それとは別に、HBV が EEs からゴルジ (TGN) そして小胞体 (ER) に移行し、核内に侵入するゴルジ逆行性輸送経路を利用していることを明らかにした。この経路はリソソームからの分解を回避できる利点と内因性インターフェロンによる攻撃を回避できる利点がある。さらに、DOCK11 はゴルジ逆行性輸送経路に重要な働きをする分子群 (AGAP2 と ARF1) と結合し、GEF 及び GAP 活性サイクルを活性化しながら HBV の輸送を活性化していると考えられる。

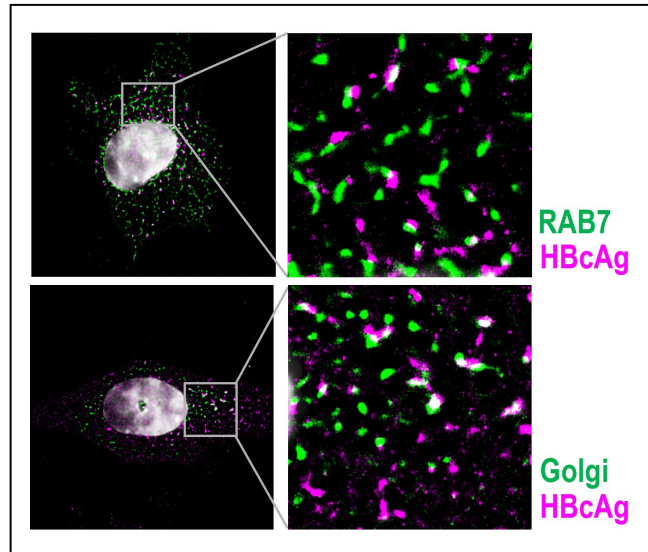


図 2

超解像度顕微鏡による後期エンドソーム (LEs) (上) およびゴルジ (下) 内の HBV ヌクレオキャプシド。HBV ヌクレオキャプシドを蛍光ラベルした HBV 感染粒子を作成し、肝細胞に感染させた。HBV ヌクレオキャプシドは LEs (RAB7 陽性) に存在する (上) と共にゴルジ内にも認められた (下)。緑は RAB7 あるいはゴルジ, 赤はヌクレオキャプシド (HBcAg)。白は共局在を示す。

【掲載論文】

雑誌名: Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology

論文名: Hepatitis B virus utilizes a retrograde trafficking route via the trans-Golgi network to avoid lysosomal degradation

(B 型肝炎ウイルスはゴルジ逆行性輸送経路を利用しリソソームからの分解を回避する)

著者名: Ying-Yi Li, Kazuyuki Kuroki, Tetsuro Shimakami, Kazuhisa Murai,

Kazunori Kawaguchi, Takayoshi Shirasaki, Kouki Nio, Saiho Sugimoto, Tomoki Nishikawa,

Hikari Okada, Noriaki Orita, Hideo Takayama, Ying Wang, Phuong Doan Thi Bich,

Atsuya Ishida, Sadahiro Iwabuchi, Shinichi Hashimoto, Takeshi Shimaoka, Noriko Tabata,

Miho Watanabe-Takahashi, Kiyotaka Nishikawa, Hiroshi Yanagawa, Motoharu Seiki,

Kouji Matsushima, Taro Yamashita, Shuichi Kaneko, Masao Honda

(李影奕, 黒木和之, 島上哲朗, 村居和寿, 川口和紀, 白崎尚芳, 丹尾幸樹, 杉本宰甫, 西川智貴, 岡田光, 織田典明, 高山秀雄, 王穎, Phuong Doan Thi Bich, 石田敦也, 岩淵禎弘, 橋本真一, 島岡猛士, 田島典子, 高橋美帆, 西川喜代孝, 柳川弘志, 清木元治, 松島剛治, 山下太郎, 金子周一, 本多政夫)

掲載日時: 2022 年 10 月 18 日にオンライン版に掲載

[https://www.cmghjournal.org/article/S2352-345X\(22\)00219-3/pdf](https://www.cmghjournal.org/article/S2352-345X(22)00219-3/pdf)

【用語解説】

※1 B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus : HBV)

不完全二本鎖 DNA よりなる肝炎ウイルスで、ヘパドナウイルス科に分類される。直径約 42nm の球状ウイルスで、エンベロープとヌクレオキャプシドの二重構造を有している。ヌクレオキャプシド内では HBV ゲノムや DNA ポリメラーゼが存在している。

※2 ゴルジ逆行性輸送経路

細胞内の蛋白は順行性に小胞体からゴルジに輸送され、エンドソームから細胞外に分泌される。しかし、欠陥のある蛋白などはゴルジから小胞体に戻され修復が行われる。ゴルジ逆行性輸送は蛋白の監視機構として働いている。一方、パピローマウイルスはゴルジ逆行性輸送経路を介して核内に侵入することが知られている。

※3 EEs (Early endosomes)

初期エンドソームは、エンドサイトーシスされた物質を選別する場として機能するオルガネラ。

※4 LEs (Late endosomes)

後期エンドソームは、リソソームと融合することで内容物を分解へと導くオルガネラである。初期エンドソームにおいて分解経路へと選別された物質は、後期エンドソームを介して最終的にリソソームで分解される。

※5 TGN (Trans-Golgi network)

ゴルジ体はタンパク質を糖鎖などで修飾し、それぞれを働くべき場所へ輸送する中心的な役割を担う。ゴルジ体を形成する層状構造のうち、細胞膜側のトランス面が形成する網目状の構造部分。

※6 ER (Endoplasmic reticulum)

小胞体。リボゾームが付着し蛋白の合成が行われるオルガネラ。

※7 GEF (Guanine nucleotide exchange factor)

GTP を付加する事により GTP 結合タンパク質を活性化させる働きを有する。

GTP 結合タンパク質は GTP を結合しているとき活性化状態、GDP を結合しているとき不活性化状態であり、GEF は不活性化状態の GTP 結合タンパク質から GDP の放出を促進して GTP を結合させることによって活性化を行う。

※8 DOCK ファミリー分子

GEF 活性を有し、細胞形態や運動の制御にかかわる分子ファミリーとして知られている。その機能やシグナル伝達機構は国際的にも大きな関心を集めている。DOCK1 はがんとの関連、DOCK8 とアレルギーの関連が報告されている。最近、DOCK2 の遺伝子多型と COVID-19 の重症化との関連が報告された。

※9 cccDNA (covalently closed circular DNA)

HBV ゲノムは不完全二本鎖の DNA であり、核内で完全二本鎖 DNA に修復される。核内ではスーパーコイル型 DNA (cccDNA) を呈し、安定性を維持している。

【本件に関するお問い合わせ先】

■ 研究内容に関すること

金沢大学医薬保健研究域保健学系 教授

本多 政夫 (ほんだ まさお)

TEL : 076-265-2601

E-mail : mhonda@m-kanazawa.jp

■ 広報担当

金沢大学医薬保健系事務部保健学支援課企画総務係

幸松 侑子 (こうまつ あつこ)

TEL : 076-265-2506

E-mail : t-hsomu@adm.kanazawa-u.ac.jp