

女性研究者支援 研究助成 2017 – 感染症領域 –
研究成果報告書（公表用） <概要>

所 属	国立研究開発法人 理化学研究所
氏 名	九十田 千子
研究テーマ	B 型肝炎ウイルス(HBV)侵入の新規制御因子・メカニズム解析およびそれを標的とする HBV 感染阻害剤開発

- ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- ・ 概要の構成は自由とするが、研究目的、手法、成果など、一般の方にもわかりやすくすること。
- ・ 枚数は 1 ページにまとめること。（図表、写真などの添付を含む）

研究の目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) は宿主細胞に侵入後、核内に移行し covalently closed circular DNA (cccDNA) を形成する。cccDNA は長期間に渡って核内に安定的に存在し続け、一旦 cccDNA が形成されると、現行の抗 HBV 薬であるインターフェロン類や核酸アナログでこれを効率よく排除することは困難である。そのため、HBV の吸着/侵入/核移行を含む cccDNA 形成過程までを同定とする抗 HBV 薬の同定は新規治療および感染予防に重要である。

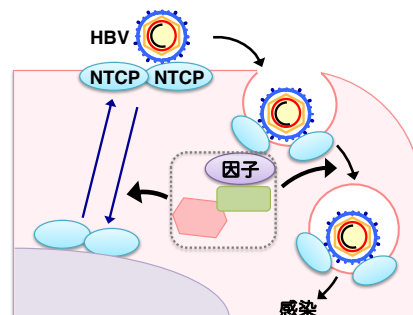
2012 年、胆汁酸トランスポーター NTCP が HBV 感染受容体として同定され、HBV 感染初期の HBV と受容体の結合、細胞内への侵入過程には NTCP が必須の役割を果たすことが明らかになった。NTCP は HBV と結合し HBV を細胞内へと取り込むため HBV の吸着/侵入/核移行過程の制御メカニズムを理解する上で重要な因子であるが、NTCP による HBV 侵入を制御する宿主因子やメカニズムはほとんど明らかとなっていない。本研究では、NTCP を介した HBV 侵入を制御する宿主因子の道程およびこの作用メカニズムの解析を目的とした。

研究手法

共同研究者である国立感染症研究所 渡士幸一先生の研究室で B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染許容性細胞株と非許容性細胞株間で発現プロファイルを解析し、HBV 感染許容性細胞で発現の高い宿主因子を選抜した。これらの因子の発現を抑制した細胞に HBV を感染させ HBV 吸着および侵入への影響を解析した。また、蛍光標識 HBV エンベロープペプチドを用いた HBV および NTCP の細胞内動態解析、免疫沈降方法および Proximity Ligation Assay 法を用いた相互作用解析、ビオチン化試薬を用いた細胞膜上のタンパク質局在解析を行った。また、D 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスおよび水疱口内炎ウイルスのシェードウイルスを用いて他のウイルスに対する影響を解析した。

研究成果

同定した因子の一つの発現を低下させた細胞では HBV の吸着および NTCP による胆汁酸の肝細胞の取込み活性の低下は観察されなかった。さらに解析を進めた結果、この因子の発現を低下させた細胞では NTCP の総タンパク質発現に変化はないが、細胞膜上の NTCP タンパク質局在量が増加していた。またこの因子の発現を低下させた細胞では HBV の細胞内への侵入過程が阻害され、HBV と共に観察される NTCP の細胞内への内在化も阻害されることが示された。同様の現象はエンドソームと細胞膜間のタンパク質輸送を制御する因子の発現を低下させた場合にも観察された。同定因子は HBV と同様に NTCP を介して感染する D 型肝炎ウイルスの感染も阻害したが、C 型肝炎および水疱口内炎ウイルスの感染には影響を与えなかった。これらの結果から、同定した因子は NTCP に直接結合し、NTCP の細胞膜と細胞質間の輸送を制御することが示唆された。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 薬の同定となり得るため、新たな薬剤開発に寄与できると考えられる。



女性研究者支援 研究助成 2017 – 感染症領域 –
研究成果報告書（最終） <発表実績/予定一覧>

所	属	国立研究開発法人 理化学研究所
氏	名	九十田 千子

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> ・ 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 ・ 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 ・ 国内外雑誌を問わない。 ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
1	Nakajima S, Watashi K, Fukano K, <u>Tsukuda S</u> , Wakae K, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Toyoda T. Non-nucleoside hepatitis B virus polymerase inhibitors identified by an in vitro polymerase elongation assay. J Gastroenterol. 2019 Nov 25. doi: 10.1007/s00535-019-01643-0. in press, 査読有
2	Yamada N, Murayama A, Shiina M, Aly HH, Iwamoto M, <u>Tsukuda S</u> , Watashi K, Tanaka T, Moriishi K, Nishitsuji H, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotono K, Muramatsu M, Murata K, Kato T. Anti-viral effects of interferon-λ3 on hepatitis B virus infection in cell culture. Hepatol Res. (2019) in press, 査読有
3	Myobatake Y, Kamisuki S, <u>Tsukuda S</u> , Tsukuda S, Higashi T, Chinen T, Takemoto K, Hachisuka M, Suzuki Y, Takei M, Tsurukawa Y, Maekawa H, Takeuchi T, Matsunaga TM, Sahara H, Usui T, Matsunaga S, Sugawara F. Bioorg. Med. Chem. 27:115149 (2019), 査読有
4	Murata K, <u>Tsukuda S</u> , Suizu F, Kimura A, Sugiyama M, Watashi K, Noguchi M, Mizokami M. Immunomodulatory mechanism of acyclic nucleoside phosphates in treatment of hepatitis B virus infection. Hepatology. (2019) doi: 10.1002/hep.30956. in press, 査読有
5	Takeuchi JS, Fukano K, Iwamoto M, <u>Tsukuda S</u> , 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. J Virol. 19: e01432-18 (2019), 査読有
6	Fukan K, <u>Tsukuda S</u> , 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. Front. Microbiol. 9: 3257 (2019), 査読有
7	Fukano K*, <u>Tsukuda S*</u> , Watashi K, Wakita T. Concept of Viral Inhibitors via NTCP. Semin Liver Dis. 39:78-95 (2019), 査読有 * contributed equally
8	Saso W, <u>Tsukuda S</u> , 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. Biochem Biophys Res Commun. 501:374-379 (2018), 査読有
9	Kaneko M, Futamura Y, <u>Tsukuda S</u> , 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. Sci Rep. 8: 2769 (2018), 査読有
10	<u>Tsukuda S</u> , Iwamoto M, Watashi K. NTCP (Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide). Encyclopedia of Signaling Molecules 2nd edition. 3591-3599 (2018) 査読有

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 国内外を問わない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2019年10月	The 67th Annual meeting of the Japanese Society for Virology. <u>Tsukuda S</u> , Kurusu T, Kojima S, Muramatsu M, Iwami S, Watashi K. Analysis of intracellular hepatitis B virus dynamics based on a cell culture infection data and a mathematical model.
2	2019年10月	International HBV Meeting -The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses- <u>Tsukuda S</u> , Kurusu T, Kojima S, Muramatsu M, Iwami S, Watashi K. Analysis of HBV dynamics during entry process and cccDNA formation based on virological experiments combined with mathematical models
3	2019年4月	7th Japan-Taiwan-Korea HBV symposium. <u>Tsukuda S</u> , Kurusu T, Kojima S, Muramatsu M, Iwami S, Watashi K. Analysis of HBV dynamics during cell entry and cccDNA formation based on infection experiments combined with mathematical models.
4	2018年10月	The 66th Annual meeting of the Japanese Society for Virology. Fukano F, <u>Tsukuda S</u> , Ohki M, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Oligomerization of NTCP is required for hepatitis B virus internalization.
5	2018年10月	International HBV Meeting-The Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Fukano K, <u>Tsukuda S</u> , Ohki M, Park SY, Suzuki R, Aizaki H, Muramatsu M, Wakita T, Ogasawara Y, Watashi K. Oligomerization of NTCP induces hepatitis B virus internalization.
6	2018年10月	The 66th Annual meeting of the Japanese Society for Virology. Saso W, <u>Tsukuda S</u> , 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.
7	2018年10月	International HBV Meeting-The Molecular Biology of Hepatitis B Virus. Saso W, <u>Tsukuda S</u> , 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
8	2018年7月	統合医療機能性食品国際学会. 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.
9	2018年6月	日本肝臓学会総会. 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
10	2018年3月	日本薬学会第138年会. 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同定とした新規B型肝炎ウイルス感染阻害戦略.
11	2017年2月	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).
3. 投稿、発表予定		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2020年2月	Viruses 2020 - Novel Concepts in Virology