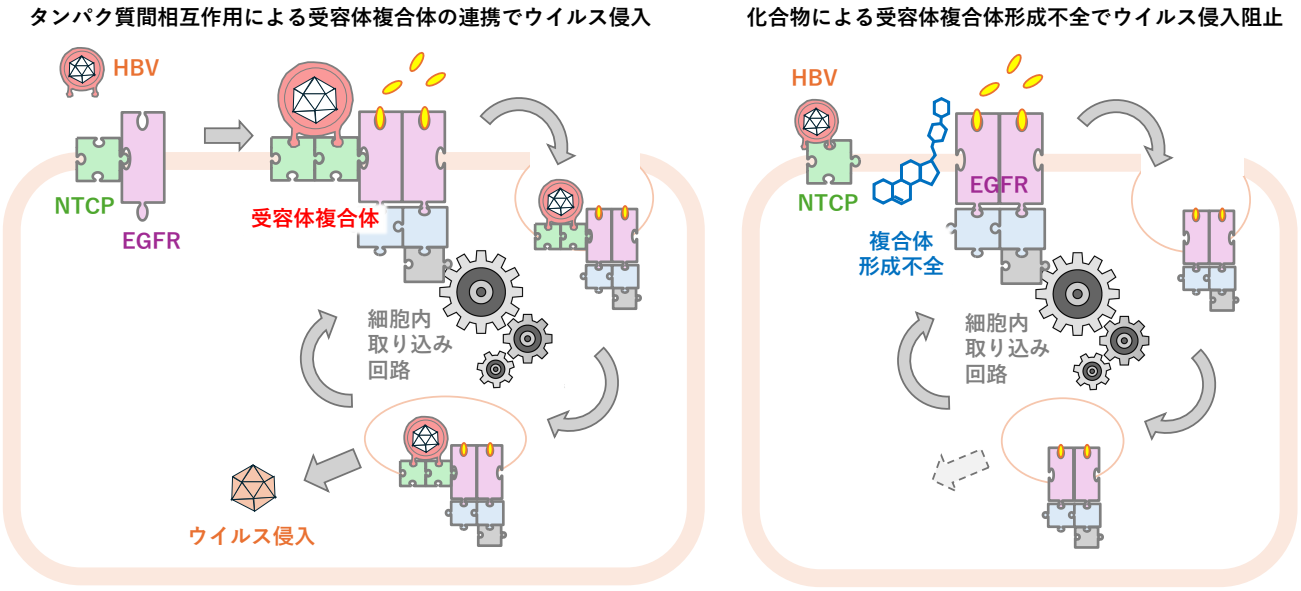
B 型、D 型肝炎ウイルス感染に対する新たな感染阻害戦略

-受容体複合体内の連携破綻によりウイルス侵入をブロック-

【発表（または研究成果）のポイント】

- ●B 型および D 型肝炎ウイルスが宿主細胞への吸着に利用する受容体 NTCP と、侵入機動因子 EGFR の相互作用を解除する化合物を見出しました。
- ●この阻害剤は、ウイルスの細胞表面から内部への移入を止めることで感染を阻止しました。
- ●この化合物は標的タンパク質本来の機能には障らず、ウイルス感染に必要なタンパク質間の連携を遮断するため、細胞の代謝機能自体には影響せずにウイルス感染を抑えることができます。
- ●これは、B 型および D 型肝炎ウイルス治療薬開発の新たなアプローチとなります。



【概要】

国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 治療薬開発研究部の楠 温登 研究生 （北里大学大学院感染制御科学府 博士後期課程在学)、渡士 幸一 部長らは、Max BioPharma 社の Farhad Parhami 博士、産業技術総合研究所 モレキュラーバイオシステム研究部門の新家 一男 キャリアリサーチャー、京都大学大学院生命科学研究科の野村 紀通 准教授、北里大学大村智記念研究所 特任教授（研究当時：北里大学大学院感染制御科学府ウイルス学 教授）の片山 和彦 教授らの研究グループと共同で、B 型および D 型肝炎ウイルス感染に必須な受容体複合体内の連携を破綻させる化合物を作出し、これらウイルスのユニークな細胞侵入機構に干渉する新たな感染阻害戦略を見出しました。

B 型および D 型肝炎ウイルスは肝臓に特異的に感染し、肝硬変や肝細胞がんなどの重篤な肝疾患を引き起こすため、その感染制御は重要な課題です。今回の研究は、細胞本来の代謝機能を邪魔することなくウイルス感染のみを選択的に抑える新たな手法を見出したものであり、今後の治療薬デザイン・開発につながると期待されます。研究成果は米国科学アカデミー紀要に掲載されました。

【発表内容（または研究の背景）】

B 型肝炎ウイルス(HBV)は全世界で約 2 億 5000 万人が感染しており、その持続的感染は肝硬変や肝細胞がんなどの重篤な慢性疾患を発症させます。また、世界の HBV 感染者の約 5%には D 型肝炎ウイルス（HDV）が共感染していて、これによって肝疾患発症リスク上昇と病態進展の増悪が報告されています。そのため HBV、HDV の制御は公衆衛生上、重要な課題です。HBV に対しては核酸アナログ、インターフェロン、最近ではベピロビルセンという治療薬が承認され、HDV に対しては欧米ではブレビルチドが開発されましたが、いまだウイルスを完全に除去することは困難であり、新たな治療薬開発が求められています。

一般にウイルスは、私たちの細胞表面に存在する分子、「受容体」を足場に利用し、細胞に感染します。HBV と HDV は、肝細胞に発現し、もともと血中から肝細胞内への胆汁酸の取り込みを担うナトリウムタウロコール酸共輸送体（NTCP)を受容体として利用します。しかしながらこれらウイルスの感染様式の特徴として、NTCP のみでは細胞表面に張り付かせることはできても、細胞内に引き摺り込む力はありません。我々はこれまで、NTCP は上皮成長因子受容体（EGFR)やその動きを担うアダプタータンパク質など多くの分子と会合し、それらが役割分担することで細胞内への陥没を誘発し、HBV、HDV を細胞内部へ引き込むことを明らかにしてきました。この NTCP を中心とした役者集団を「受容体複合体」と名付け、特にウイルスの張り付きに必須な NTCP と、細胞内への取り込みを起動する EGFR の間の連携関係が HBV、HDV 侵入の制御中心になることを示してきました。そこで本研究では、NTCP と EGFR の相互作用に焦点を当て、これを阻害する化合物の探索を行い、得られた化合物が HBV/HDV 感染を抑えること、その作用機序、またこれまでの治療薬候補と比較した時の優位点を明らかにしました。

まず、試験管内で NTCP と EGFR の相互作用を発光によって評価できる実験系を構築し、これを用いた化合物スクリーニングで、この両者の結合による発光を低下させる酸化ステロール誘導体 Oxy229 を見出しました（図 1)。この化合物は、実際に肝細胞への HBV および HDV 感染を抑制することが示されました（図 2)。一方で NTCP、EGFR を介さない水疱性口内炎ウイルスの細胞への侵入には影響を与えなかったことから、認められた感染阻害効果は、NTCP-EGFR 相互作用を利用するウイルスに限定されたものであることがわかりました。また、Oxy229 が HBV の感染サイクルのどこを阻害するかを確認したところ、HBV の細胞への吸着には影響を与えず、その後の細胞内への取り込みを低下させ、また取り込まれた後のウイルス複製には影響しないことが判明しました。前述のように HBV および HDV は、受容体である NTCP に結合したのち、EGFR を含む複合体に乗って細胞内へと侵入していきます。これらのウイルス粒子表面に存在するエンベロープタンパク質の一部である preS1 領域の蛍光標識体をウイルスのマーカーとして利

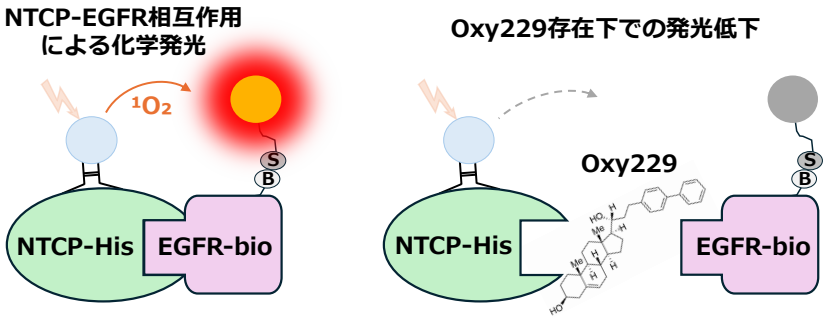


図１　NTCP-EGFR相互作用阻害のスクリーニング

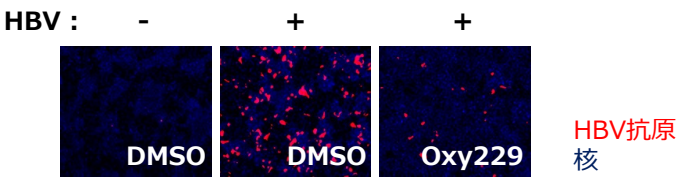


図２　Oxy229によるHBV感染の抑制

用すると、これは時間とともに細胞表面から細胞内へと NTCP、EGFR 共に移動していくことが確認されました(図 3)。しかし Oxy229 が存在すると、EGFR は細胞内に移動していくものの、蛍光標識 preS1 は NTCP と共に細胞表面にとどまり続け、細胞の中にはほとんど入らないことがわかりました(図 3)。これは、Oxy229 が NTCP と EGFR の相互作用を切り離すことにより、EGFR のみが細胞内に入り、ウイルスと NTCP は細胞表面から動くことができない状態であると考えられます。

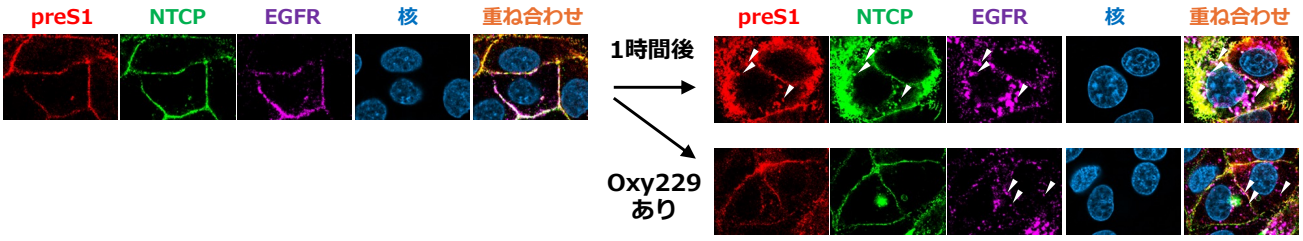


図３　Oxy229によるHBV preS1/NTCP複合体の細胞内移入の抑制

また Oxy229 の NTCP、EGFR 本来の機能への影響を調べました。NTCP はナトリウム存在下で胆汁酸を細胞内へ取り込みます。NTCP 発現細胞への胆汁酸の取り込みを評価したところ、抗 HDV 薬であるブレビルチドは取り込みを極めて強く阻害したのに対し、Oxy229 は有意な影響を与えませんでした。一方、EGFR は活性化によって下流シグナル伝達を活性化させます。このような下流シグナル伝達活性化は、すでに知られた EGFR 阻害剤ゲフィチニブによってほぼ完全に阻害されたのに対し、Oxy229 ではほとんど変化がありませんでした。このように Oxy229 は NTCP、EGFR 本来の機能を阻害しないと考えられました。

さらに我々はこれまでに構築した酸化ステロール合成技術を活かし、Oxy229 の誘導体として Oxy283 を作出しました。これは、Oxy229 より 4-6 倍高い抗ウイルス活性を有していましたが、興味深いことに、この化合物は NTCP-EGFR 相互作用を阻害するだけでなく、ウイルス取り込みを促進させる NTCP 多量体化も阻害することがわかりました。このように、受容体複合体内の連携を二重に阻害する活性を獲得することで、HBV/HDV 感染を強く阻害できると考えられました。

以上のように本研究では、HBV/HDV が受容体 NTCP、侵入起動因子 EGFR 間の巧妙な連携関係を利用して侵入する特徴をつき、その相互作用を破綻させることで感染を抑える化合物を見出しました。治療薬開発では、ウイルス感染を阻止するために細胞の生命維持システムそのものを邪魔するわけにはいきません。今回発見した化合物を用いることにより、タンパク質の酵素機能自体を阻害せずに、その間の連携を断つことで、本来の細胞代謝に影響せずにウイルス感染を選択的に阻止することが可能となります。このようなアプローチは今後の HBV、HDV に対する新たな治療薬の開発に有用と期待されます。

【発表者・研究者等情報】
国立健康危機管理研究機構
　国立感染症研究所　治療薬開発研究部　部長
　渡士　幸一

MAX BioPharma
　CEO
　Farhad Parhami

京都大学
　大学院生命科学研究科 膜タンパク質構造生物学　准教授
　野村　紀通

産業技術総合研究所
　生命工学領域　モレキュラーバイオシステム研究部門　キャリアリサーチャー
　新家　一男

北里大学
　大村智記念研究所 特任教授（研究当時：北里大学大学院感染制御科学府ウイルス学　教授）
　片山　和彦

【論文情報】
雑誌名：Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
題　名：Disruption of the NTCP-EGFR receptor complex as a strategy for selective inhibition of hepatitis B and D virus entry
著者名：Atsuto Kusunoki, Kaho Shionoya, Frank Stappenbeck, Takeshi Morita, Hirofumi Ohashi, Noritaka Kagaya, Makoto Nagano, Junki Mifune, Ryo Morishita, Feng Wang, Tetsuya Toyoda, Norimichi Nomura, Kazuo Shin-ya, Camille Sureau, Kazuhiko Katayama, Farhad Parhami*, Koichi Watashi*
DOI：10.1073/pnas.2603986123
URL：www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2603986123

【研究助成】
本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED) B型肝炎創薬実用化等研究事業「B型肝炎ウイルス侵入制御の多階層解析と創薬基盤」をはじめ、同　地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS)「モンゴルに蔓延するD型肝炎ウイルス感染の制圧に向けた研究開発」、文部科学省・日本学術振興会　科学研究費補助金などの支援を受けて行われました。

【用語解説】
注１　B型肝炎ウイルス(HBV)：肝臓に感染し、急性あるいは慢性肝炎を引き起こすウイルス。持続感染によって肝硬変や肝がんといった重篤な肝疾患へと進展する可能性があります。

注２　D型肝炎ウイルス(HDV)：HBVと肝臓に共感染するウイルス。HBV単独感染に比較して、肝病態の増悪を引き起こします。そのウイルス粒子表面にはHBV粒子と同じエンベロープタンパク質が存在し、そのpreS1を利用してNTCPに結合します。

注３　受容体：ウイルスが宿主細胞に侵入する際に利用する細胞側タンパク質。もともとはそれぞれ全く別の生理機能を担っています。

注４　ナトリウムタウロコール酸共輸送体(NTCP):肝臓にのみ発現する９回膜貫通型胆汁酸輸送体。血中から肝細胞に胆汁酸を取り込みます。

注５　上皮成長因子受容体(EGFR):膜貫通型タンパク質の一つで、細胞の増殖や分化に関わります。

注６　受容体複合体：NTCP が EGFR やこれらの細胞内移動を担うタンパク質らと相互作用し形成するタンパク質群。HBV、 HDV の細胞内への侵入に重要な役割を果たします。

注７　化合物スクリーニング：多くの化合物の中から、特定の変化を引き起こす化合物を選び出すこと。

注８　酸化ステロール誘導体：コレステロール酸化物の構造をもつ類似化合物。

注９　preS1：HBV および HDV 粒子表面に存在するエンベロープタンパク質の領域の一つ。NTCP 結合に関わるため、実験ではウイルスの代わりによく用いられます。