



Title	NEDD4結合タンパク質1 (N4BP1) はHBV RNAを分解することでHBVゲノムの複製を抑制する
Author(s)	小林, 展大
Description	配架番号 : 2952
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16642号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16642
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98252
Type	doctoral thesis
File Information	KOBAYASHI_Nobuhiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 小林 展大

学 位 論 文 題 名

NEDD4 結合タンパク質 1 (N4BP1) は HBV RNA を分解することで HBV ゲノムの複製を抑制する
(NEDD4-binding protein 1 suppresses HBV replication by degrading HBV RNAs)

【背景と目的】

B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus : HBV) は世界で約 2.5 億人が慢性感染していると推定され、肝硬変や肝細胞癌の発症リスクを増大させる重大な疾患である。現在、HBV の治療には主に核酸アナログ製剤 (nucleos (t) ide analogs : NA) が使用されており、ウイルスの逆転写を抑制することで血中 HBV 量を効果的に低下させることができる。しかし、NA 製剤は肝細胞内に存在する完全二本鎖 DNA (covalently closed circular DNA : cccDNA) を直接排除することができないため、治療を中断するとウイルスの再活性化が生じ、B 型肝炎の再発リスクが残るという課題がある。そのため、NA 製剤は長期にわたる継続が必要とされ、患者に対する負担や管理上の課題が残されている。こうした背景から、新規 HBV 治療薬の開発に向けた宿主因子の同定が求められている。本研究では、HBV の増殖の抑制に関与する宿主因子を探索するため、RNA 結合タンパク質 (RNA-binding proteins : RBP) に着目し、それらの中から HBV ゲノムの複製を抑制する新たな宿主因子を同定することを目的とした。RBP 発現プラスミドライブラリーを用いたスクリーニングを実施し、HBV ゲノムの複製を抑制する因子の探索ならびにその機能解析を行った。

【対象と方法】

HBV の増殖の抑制に関与する RBP の同定を目的とし、132 種類の RBP 発現プラスミドライブラリーを用いたスクリーニングを実施した。肝細胞癌細胞株 (Huh7 細胞) および HBV 受容体を発現した肝癌細胞株 (HepG2-hNTCP C4 細胞) に対し、HBV とともに各 RBP を外因性に発現させ、HBV ゲノムの複製に及ぼす影響を評価した。HBV ゲノムの複製の指標として、コア内不完全二本鎖 DNA (relaxed circular DNA : rcDNA) を測定した。スクリーニングによりライブラリーの中から NEDD4-binding protein 1 (N4BP1) が最も HBV の増殖抑制効果を示したため、その発現が HBV ゲノムの複製に与える影響や作用機序を解析した。具体的には、RBP の過剰発現、RBP のノックダウンおよびノックアウトによる影響を評価するとともに、HBV プレゲノム RNA (pregenomic RNA : pgRNA) および cccDNA の産生量を測定した。また、N4BP1 のドメイン機能を解析するため、KH-like ドメインおよび RNase ドメインを欠損させた変異体を用いて HBV の増殖抑制効果を検討した。さらに、ノーザンブロッティングによる HBV RNA の発現解析や N4BP1 と pgRNA との結合解析、RNA シーケンシス解析により、N4BP1 の作用機構の解明を行った。

【結果】

132 種類の RBP のスクリーニングの結果、N4BP1 を含む 23 種類の RBP において rcDNA レベルが 50%以下に低下した。中でも N4BP1 は HBV ゲノムの複製に対する顕著な抑制効果を示し、その効果は遺伝子型 A、B、C のいずれにおいても再現された。HepG2-hNTCP C4 細胞および初代培養ヒト肝細胞を用いた感染実験においても、N4BP1 の過剰発現によりコア内 rcDNA および pgRNA 量が有意に減少した。一方、N4BP1 のノックダウンおよびノックアウトにより pgRNA および rcDNA 量の増加が観察され、N4BP1 が HBV ゲノムの複製を内因的に抑制していることが示唆された。さらに N4BP1 ノ

ックアウト細胞に再度 N4BP1 を導入することで rcDNA 量の低下が確認されたことから、N4BP1 の HBV に対する増殖抑制効果はその発現に依存することが裏付けられた。N4BP1 は KH-like ドメインおよび RNase ドメインが保存されているが、ドメイン欠損変異体を用いた解析からこれら二つのドメインは HBV の増殖抑制効果に必須であることが判明した。特に RNase ドメインの D623N 変異体は構造を保ちながら RNase 活性を欠損しており、この変異体では rcDNA の抑制効果は失われた。

次に、N4BP1 が HBV のどの複製過程に干渉して増殖抑制効果を示すのか解析した。N4BP1 を過剰発現した HepG2-hNTCP C4 細胞を用いた検討で、cccDNA の発現は変化せず、pgRNA および rcDNA レベルが減少したことから、cccDNA を形成後から pgRNA の産生過程に作用していることが予想された。cccDNA の転写活性化を評価するために、HBV プロモーター活性を N4BP1 を過剰発現した細胞で評価したところ、HBV プロモーター活性には影響を与えなかった。さらに RNA シークエンス解析により、N4BP1 の過剰発現により変動した遺伝子群の中には HBV ゲノムの複製に関与する転写因子や経路は含まれていなかったことから、転写活性には影響を与えないことが裏付けられた。ノーザンブロットリングおよび RNA 免疫沈降の結果では、N4BP1 は pgRNA に直接結合し、3.5 kb および 2.4/2.1 kb の HBV RNA を制御することが確認された。さらにテトラサイクリンにより HBV の産生が誘導可能な肝癌細胞株 (HepAD38.7 細胞) を用いて pgRNA の安定性を評価したところ、野生型 N4BP1 を過剰発現した細胞では pgRNA の著明な分解促進が認められたが、KH-like ドメインおよび RNase ドメイン欠損変異体では pgRNA の安定性が保たれたままであった。これらの結果は、N4BP1 が主に HBV RNA の分解を通じて HBV ゲノムの複製を抑制していることを示している。

【考察】

本研究により、N4BP1 が HBV ゲノムの複製、特に HBV RNA の制御において重要な役割を担う宿主因子であることが明らかとなった。N4BP1 による HBV の増殖抑制効果には RNA 結合能と RNase 活性が必須であり、これらの機能を欠損した変異体では HBV の抑制効果が消失することから、N4BP1 は pgRNA または HBV RNA を直接的に分解して HBV ゲノムの複製を阻害していると考えられる。既存の NA 製剤やインターフェロン製剤が cccDNA や pgRNA に対して限定的な効果しか持たない中で、N4BP1 のような HBV RNA 全体に影響を与える分子は、既存治療とは異なる新たな治療戦略につながる可能性がある。

【結論】

N4BP1 は、HBV RNA の分解を介して HBV ゲノムの複製を抑制する新規の宿主因子であることが明らかとなった。本研究は、HBV に対する治療戦略において、RNA 結合タンパク質を標的とした新たなアプローチの可能性を示唆するものであり、今後の治療法開発において N4BP1 の応用が期待される。