HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏 名　小林　展大

審査担当者
主査　教授　坂本 直哉
副査　教授　畠山 鎮次
副査　准教授　七戸 俊明

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）

申請者は、B 型肝炎ウイルス（HBV）の増殖を抑制する宿主因子の探索を目的として、RNA 結合タンパク質（RBP）に着目し、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。その結果、132 種類の RBP の中から、NEDD4 結合タンパク質 1（N4BP1）が HBV ゲノム複製を顕著に抑制することを見出した。N4BP1 の強制発現により HBV の不完全二本鎖 DNA（rcDNA）が有意に減少した。さらに、N4BP1 のノックダウンやノックアウト、ノックインにより、N4BP1 発現量と rcDNA 量が負の相関を示すことを示した。続いて N4BP1 の HBV 抑制機序を検討したところ、N4BP1 は完全二本鎖 DNA（cccDNA）の産生や転写活性には影響を与えず、プレゲノム RNA（pgRNA）に結合して分解を促進すること、N4BP1 が pgRNA 以外の HBV RNA や HBs 抗原・HBe 抗原の産生を抑制することを明らかにした。N4BP1 の HBV RNA 抑制効果には分子内の KH-like ドメイン、および RNase ドメインの両者が必要であった。臨床検体を用いた解析では、HBV DNA 陰性化例や臨床的治癒に至った症例において肝内 N4BP1 の発現が高レベルであり、生体内でも HBV の抑制に関与する可能性を報告した。

審査にあたり、まず副査の七戸准教授から、RBP の定義やウイルスとの関係についての質問があった。申請者は、RBP とは RNA 認識モチーフや KH ドメインなど RNA と相互作用するドメインを有するタンパク質の総称であり、必ずしもウイルス RNA に特異的に作用するわけではなく、また RNA 分解のみならず安定化に関与する因子もあると回答した。N4BP1 の種差に関する質問に対しては、マウスや魚類での発現や機能に関する報告はあるが、種ごとの特異性や機能の違いについては解明されていない旨を回答した。HBV の逆転写機構については説明が不十分であり、今後の課題として認識された。KH-like ドメインの機能に関する質問には、1 本鎖 RNA 等への結合が報告されており、RNA の翻訳調節や安定性制御に関与することが知られていると回答した。

次に副査の畠山教授から、スクリーニングで HBV を抑制した他の因子についても薬剤候補として検討すべきとの示唆があった。申請者は、本研究が内在性発現を有する宿主因子に焦点を当てており、意義の低い因子については解析を行っていないと説明した。免疫蛍光染色に関して、ノックダウンやノックアウトを用いたコントロールの必要性が指摘され、妥当な指摘と考えられた。また、本研究はリコンビナント N4BP1 の過剰発現を用いた細胞実験

により HBV 抑制を示したものであるため、精製した N4BP1 タンパク質と HBV RNA を直接反応させた *in vitro* 再構成実験により、両者の直接的な相互作用や RNA 分解活性を検証する必要があると指摘された。N4BP1 の発現制御機構に関しても、プロモーター配列やインターフェロン応答性エレメントを含めた詳細な解析の必要性が示唆された。これらの点について申請者は、現時点では十分な検討に至っておらず、今後の課題として認識していると回答した。加えて N4BP1 高発現例における予後や、他ウイルス感染における N4BP1 の予後への影響に関する質問もなされ、申請者は、HIV-1 に関する先行研究では臨床検体を用いた検証はされておらず、予後との関連は報告されていないと回答した。

主査の坂本から、N4BP1 の RNase 活性の特異性や結合部位について、HBV RNA 変異体を用いた検証の有無を質問した。申請者は、既報では HBV のステムループ構造を標的とする因子が多く、N4BP1 も同様の可能性があるが、本研究室には HBV RNA 配列の一部を短縮・変異させた合成 RNA を用い、結合部位や分解領域を詳細に解析する実験系が整備されておらず、検討には至っていないと回答した。また HBV 感染による IFN 誘導についての質問に対して、HBV は自然免疫応答を回避するウイルスであり IFN を誘導しにくいとする報告があると回答した。臨床検体・scRNA-seq のデータ解釈についての質問があり、*in vitro* では HBV 存在下で N4BP1 の発現は誘導されなかった一方、HBV DNA 陰性例や機能的治癒例では N4BP1 が高発現しており、N4BP1 発現の個体差が HBV 抑制に関与する可能性があると回答した。また RNA-seq 解析において N4BP1 の過剰発現により多くの遺伝子発現変動がみられたことから、他因子との協調的作用の可能性についても質問した。それに対し、今後の臨床応用に向けての質問に対して、臨床検体数のさらなる蓄積と *in vivo* での HBV 抑制効果および安全性評価を行った上で、N4BP1 の直接導入や N4BP1 の発現を誘導する低分子化合物の開発などの治療戦略を検討する必要があると回答があった。

本研究は、HBV に対する抑制機序を明らかにした点で高く評価され、今後の新規治療戦略の構築に向けた基盤的知見として期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。