

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08871

研究課題名(和文) 転写因子 E2F による B 型肝炎ウイルスのゲノム複製及び維持機構の解明

研究課題名(英文) Control of hepatitis B virus genomic replication and maintenance by E2F transcription factors

研究代表者

棟方 翼 (MUNAKATA, Tsubasa)

公益財団法人東京都医学総合研究所・疾患制御研究分野・主席研究員

研究者番号：50420237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円

研究成果の概要(和文)：詳細な遺伝子解析の結果、B型肝炎ウイルス(HBV)のゲノムDNA上に転写因子E2F1の結合部位候補が5か所、全ての遺伝子型間で保存されて存在することを発見した。また、E2F1をノックダウンした細胞では、HBVのX蛋白質(HBx)と表面蛋白質の発現が抑制されることを見出した。これらの知見は、E2Fファミリーの転写因子がHBVの複製・感染に関与する可能性を強く示唆した。E2F1結合部位候補の中でもウイルスゲノムのエンハンサーI領域に存在する配列は、E2F1が直接結合してHBxの転写を活性化した。HBxのmRNAはHBV感染細胞で最初に発現することから、HBVの生活環の重要な点が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVによる持続感染者は世界で2億人以上おり、HBVは世界的に重大な健康問題の原因の一つである。ワクチン、インターフェロン、核酸アナログ製剤の開発により、新規の感染者は減少しHBV由来の肝臓病の発症も抑制されてきた。しかし、現行のいずれの治療法も、HBVのゲノムを完全排除できない。このゲノムからHBV mRNAが転写されてウイルス遺伝子の発現が続く限り、HBV感染は持続してB型肝炎が再発する場合もある。E2F1がゲノム安定性に必要であることを考慮すると、HBVのゲノムDNAの肝細胞での維持にE2F1が関与することが考えられる。従って我々の発見はHBV感染の新たな治療法の開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Detailed genomic analysis identified 5 putative E2F1-binding sites in the HBV DNA. Interestingly, these sites were conserved among all the HBV genotypes. We also found that knockdown of E2F1 suppressed the expression of HBV X protein (HBx) and surface protein (HBs), strongly suggesting that E2F family transcription factors regulate HBV replication and infection. A E2F1-binding site located in the Enhancer I region of HBV genome was shown to interact with E2F1, which in turn activated the transcription of HBx mRNA. Since the first mRNA expressed upon HBV infection is that of HBx, our findings revealed the critical point in the HBV life cycle.

研究分野：ウイルス学

キーワード：肝炎 B型肝炎ウイルス E2F1 転写因子 エンハンサー

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) による持続感染者は全世界で2億人以上いる。慢性B型肝炎患者は肝硬変や肝癌を発症するため、HBVは世界的に重大な健康問題の原因の一つである。近年の日本ではこれまで80%以上を占めてきた遺伝子型CのHBV以外に、慢性化しやすい遺伝子型Aによる急性肝炎が増加している。HBVに対するワクチン、副作用が大きいインターフェロン (IFN)、ラミブジンやエンテカビル等の核酸アナログ製剤の開発により、新規の感染者数は減少しHBV由来の肝臓病の発症も抑制されてきた。しかし、現行のいずれの治療法も、閉環状二本鎖DNA (cccDNA) として感染肝細胞の核内に存在するHBVのゲノムを完全排除できない。このcccDNAからHBV mRNAが転写されてウイルス遺伝子の発現が続く限り、HBV感染は持続して長期の治療が必要であり、発症が抑制されていてもB型肝炎が再活性化される場合もある。

我々はHBV cccDNAの性質をより理解することがB型肝炎の治療に繋がると考え、HBV塩基配列を詳細に解析した結果、遺伝子型間で保存された転写因子E2Fの結合部位候補を複数見出した(図1)。HBVの遺伝子発現を制御する転写因子は、C/EBP、ERalpha、HLF、HNF1alpha、HNF3beta、HNF4alpha、HNF6、NF1、RXR、Sp1、Stat1、Stat2等が存在し、エピジェネティックな制御も存在する。しかし、いずれの知見もcccDNAの完全排除にほとんど結びついていない。HBxはcccDNAからの遺伝子発現に必須であり、mRNAはcccDNAから最初に転写される(1)。HBxの転写を制御するエンハンサーI (Enh I) にE2F結合部位候補があることはとても興味深い。我々は今までにC型肝炎ウイルス(HCV)の研究を介してE2Fとその抑制因子であるRbについて解析を行ってきた(2, 3, 4)。HCVではE2Fによる宿主因子の制御がウイルスに与える効果を検討してきたが、HBVではE2Fによるウイルス因子の制御が宿主に与える効果をまず検討することになる。E2F1は転写以外でゲノムの安定性に寄与するとの報告もあり(5)、HBVゲノムにも当て嵌まるならcccDNAの不安定化による排除の可能性も考えられる。

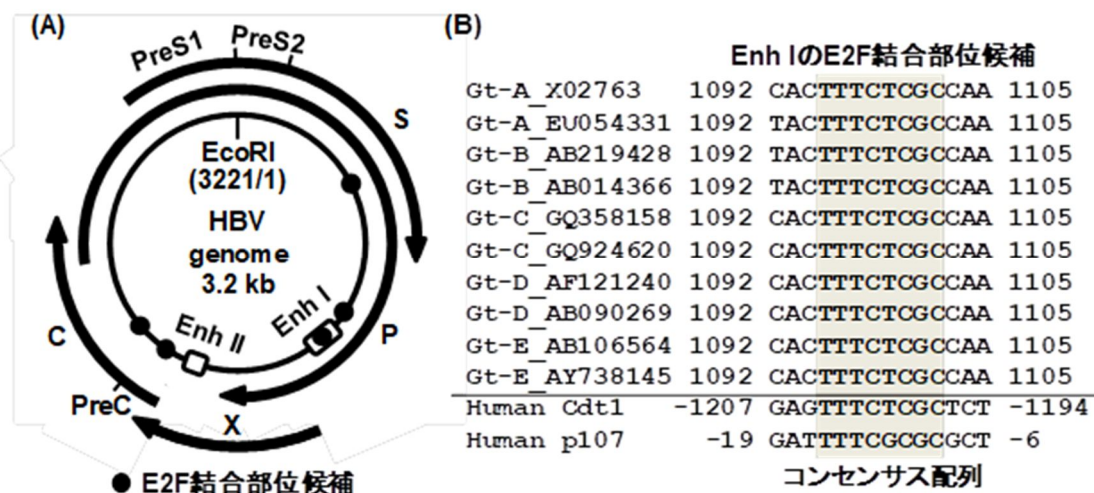


図1. HBVゲノム中に存在するE2F結合部位候補の同定

(A) HBV cccDNAのゲノム構造。遺伝子型A (Gt-A)のX02763株のEcoRI切断部位を+1として塩基番号を記す。重なってコードされる4種のウイルス遺伝子のORF (C:コア蛋白質 (HBc), S: 表面蛋白質 (HBs), P: ポリメラーゼ (Pol), X: X蛋白質 (HBx)) を矢印で示す。HBV遺伝子発現を制御するエンハンサーがEnh IとEnh IIである。今回発見した5個のE2F結合部位候補の位置を黒丸で記す。(B) X遺伝子プロモーターが直下に在るEnh Iに見出したE2F結合部位候補の遺伝子型間でのアラインメント。既知のE2F結合部位としてCdt1とp107の塩基配列を下段に示す。

2. 研究の目的

初めに我々が作製したE2F1又はRbのノックダウン (KD) 細胞を用いて、Rb/E2F経路の欠損がHBVに与える影響を解析する。E2F1 KD細胞ではHBxの発現が抑制されるという結果は既に得ている(図2)。初代肝細胞等の様々な培養細胞系・感染系で同様に他のHBV遺伝子の発現もmRNAと蛋白質レベルで解析すると共に、E2Fが感染性粒子の形成・放出に与える効果も検討する。E2FにはE2F1-E2F8(活性因子と抑制因子に分かれる)のファミリーがある為、

各因子の HBV に対する影響も解析する。E2F の過剰発現系や、CRISPER/Cas9 又は TALEN によるノックアウト (KO) 系も利用して E2F の必要性を検討する。次に、クロマチン免疫沈降法やレポーター・アッセイにより HBV ゲノム上に発見した E2F 結合部位候補に本当に E2F が結合するか、又 E2F が cccDNA からの転写を制御するか明らかにする。E2F が HBx と HBc の様に cccDNA のクロマチン構造構築に寄与するかも検討する。E2F が直接又は HBx 等を介して cccDNA の安定性に関与するかも解析する。E2F 結合部位変異型 HBV の作製も行い、その性質も解析する。HBV cccDNA の排除が困難な場合、E2F による cccDNA のサイレンシング制御で同等の効果が得られないか検討する。E2F が間接的に宿主因子を介して HBV の複製に寄与する可能性も考慮する。最終的に HBV 感染動物モデルで E2F と HBV の関係性を明らかにして、E2F の選択的な活性制御が HBV 感染やその病態を治療可能か明らかにする。

Rb/E2F 経路の異常がウイルスによる癌化に関わることは古典的に知られている。しかし、E2F がウイルス自体に直接果たす役割の解明やその感染治療への活用はほとんど成されていない。E2F を通してウイルス因子と宿主因子の感染への寄与を同時に解析することも今回の研究の新しさである。HBV のみならず、DNA をゲノムに持ち潜伏感染するヘルペスウイルス等にも新規 E2F 結合部位候補を我々は見出しており、今回の成果の応用が期待できる。

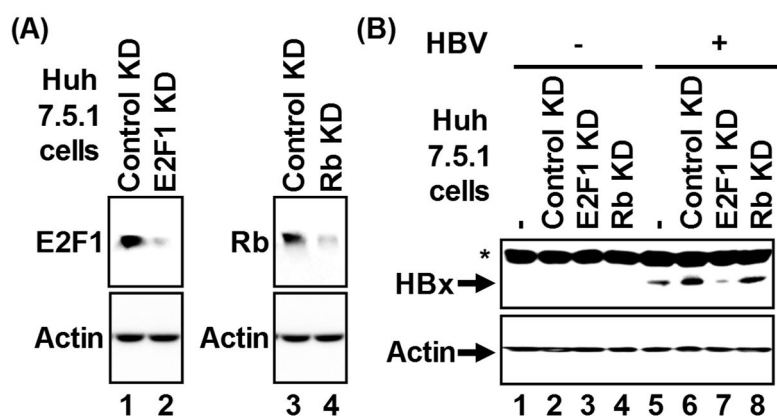


図2 . E2F1 による HBx の発現制御 (A) ヒト肝癌由来細胞 Huh7.5.1 に E2F1 又は Rb を KD する shRNA 発現ベクターを導入し、ピューロマイシンで選択培養を行った。ウエスタン・プロットで KD の程度を確認した。(B) E2F1 又は Rb の KD 細胞に 1.24 倍長の HBV (Gt-C_JPNAT) 発現プラスミドをトランスフェクションして、ウエスタン・プロットで HBx の発現を検討した。*、非特異的。

3 . 研究の方法

「転因子 E 2 F による B 型肝炎ウイルスのゲノム複製及び維持機構の解明」の研究を行う上で、以下の五点に着目して解析を進めていく。

- (1) HBV 複製への E2F の関与の解析
- (2) HBV ゲノムへの E2F の直接結合による制御の解析
- (3) HBV ゲノムへの E2F の間接的な効果の解析
- (4) E2F による HBV cccDNA の制御の解析
- (5) HBV 感染動物モデルでの E2F の効果の解析

最終的に、E2F を介した HBV 制御を利用した治療薬開発の基盤が出来ることを目指す。

・HBV 複製への E2F の関与の解析： 培養肝細胞への HBV 作製用プラスミド等のトランスフェクション実験

HuH-7 由来細胞 (Huh7.5.1 等) や HepG2 細胞に shRNA 発現ベクターを導入して、E2F の KD 細胞を作製する。その際、E2F のファミリー因子の各々を全て KD して図 2 と同様の実験を行い、HBV の total DNA (プラスミド DNA と区別する)、cccDNA、mRNA、蛋白質の発現を定量 PCR、定量 RT-PCR、ELISA、サザン・プロット、ノザン・プロット、ウエスタン・プロット、免疫蛍光染色で解析する。HBs の発現も E2F1 が制御することを我々は見出している (図 3)。細胞内だけでなく培養上清中のウイルス因子についても解析する。また、培養上清の HBV 粒子の感染性の有無、或いはその変化についても解析する。感染には HepG2-NTCP-C4 (国立感染症研の渡士幸一先生より分与) それと同等の当研究室で作製した HepG2 由来細胞、又はヒト肝臓キメラマウス由来初代肝細胞 (PXB 細胞、PhoenixBio 社より購入) を用いる。HBV 作製用プラスミドは Gt-C 以外に Gt-A 等の別の遺伝子型のものも使用する。E2F の抑制因子である Rb とそのファミリー (p107、p130) についても同様に HBV に対する効果を検討する。また、細胞のゲノムに HBV DNA が組み込まれ恒常的に HBV が産生される HepG2.2.15 細胞も利用する。KD だけでなく、E2F 又は Rb の過剰発現の影響も観察する。HBV への効果が見られた因子に関しては CRISPER/Cas9 又は TALEN によるゲノム編集技術を利用して KO 細胞を作製して、その効果を検証する。KO 細胞での解析では、KO した因子によるレスキュー実験も必ず行い、オフ・ターゲット効果でないことを確認する。トランスフェクション効率の差が結果に影響を与えないように、蛍光蛋白質やルシフェラーゼ発現ベクターを利用した補正も行う。

・HBV ゲノムへの E2F の直接結合による制御の解析： レポーター・アッセイによる HBV ゲノム DNA 上の E2F 結合部位候補の解析

HBV ゲノム中のプロモーター及びエンハンサー領域を全てホタル・ルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポーター・プラスミドを作製する。レニラ・ルシフェラーゼ発現プラスミドを併用したデュアル・ルシフェラーゼ・アッセイで、培養細胞で E2F ファミリー転写因子が HBV の転写を活性化或いは抑制化出来るか検討する。同様のアッセイは E2F の KD 細胞や KO 細胞も用いて行い、前述のようにレスキュー実験も行う。次に、E2F のコンセンサス配列に変異を入れることで、転写制御の E2F 結合依存性を検討する。E2F による制御にウイルス因子が必要な場合も考えて、HBV 感染細胞又は HepG2.2.15 細胞でも同様のアッセイを行う。図 1 には示していないが HBV の遺伝子型特異的に存在する E2F 結合部位候補もある為、その効果についても解析する。

・HBV ゲノムへの E2F の間接的な効果の解析： E2F 経路の下流にある宿主因子の HBV 複製への関与の解析

図 2、3 より E2F1 が HBV の遺伝子発現に必要でありウイルス複製に関与することは明らかだが、宿主遺伝子の制御を介して間接的に HBV に影響を与える可能性もある。例えば我々は HBV を制御する APOBEC3G のエンハンサーに新たな E2F 結合部位候補を発見した。HBV 感染動物モデルで感染前後に発現変動する遺伝子は既に網羅的に同定しており、その遺伝子解析により E2F 結合部位を探索する。HBV 感染時に E2F の活性と量に変動がないかも動物モデルと培養細胞で解析する。

・E2F による HBV cccDNA の制御の解析： 培養細胞系での cccDNA の半減期の解析

上記の解析で作製した E2F KD 細胞や KO 細胞を利用して、Hirt 法で抽出した HBV cccDNA の半減期をサザン・プロットで解析する。HBV DNA のパルス・ラベリングには RI 以外に BrdU 又はクリック・ケミストリーによる non-RI 標識も適用する。当研究所には P2 レベルの RI 実験を行う設備があり、HCV 解析で使用した経験もある。cccDNA の細胞当たりのコピー数の変動は定量 PCR で解析する。他の DNA との区別が必要な場合、cccDNA 以外の DNA は Plasmid safe DNase 処理で排除する。

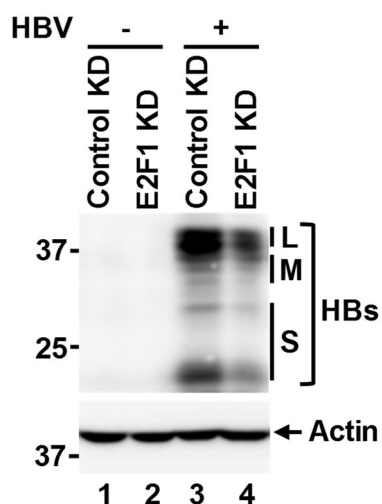


図 3 . E2F1 による HBs の発現制御

図 2 で用いた E2F1 KD 細胞と control KD 細胞に 1.24 倍長の HBV (Gt-C_JPNAT: 名古屋市大の田中靖人先生より分与) 発現プラスミドをトランスフェクションして、ウエスタン・プロットで HBs の発現を検討した。HBs は PreS1 まで含む LHBs、PreS2 まで含む MHBs、S のみの SHBs の三種類存在し、糖鎖付加の状態でも更に詳細に分類できる。Enh 1 は PreS1/PreS2/S 遺伝子の転写制御も行うことから、E2F1 KD により受容体と結合する HBs の発現が低下することは、転写因子 E2F1 の HBV 感染への必要性を明示すると同時に、HBV ゲノム上の E2F 結合配列候補の妥当性を示唆する。当然、Enh 1 以外の E2F 結合配列候補の関与も考えられる。今回の解析は細胞抽出液で行ったが、培養上清に産出されるウイルス粒子中の HBV DNA も E2F1 KD で低下することも観察している。

4 . 研究成果

HBV のゲノム DNA からの遺伝子発現は、感染細胞の核内で宿主の RNA polymerase II を用いて行われる。この時、HBV 遺伝子の転写は各遺伝子のプロモーターに加えてウイルスゲノム中のエンハンサー I (Enh I) とエンハンサー II (Enh II) 依存にコントロールされている (6)。今回我々は、HBV の遺伝子発現制御の新しい局面を明らかにした。まず、事前に行った遺伝子解析 (図 1) に基づいて、HBV の Enh 1 依存の転写活性化に E2F ファミリー転写因子の中で E2F1 が関与することを、ルシフェラーゼ・レポーター解析により明らかにした。E2F 結合部位に変異を導入すると、この活性化は観察されなくなった。E2F1 による転写活性化は、HBx により増強された。また、HBV 感染細胞を用いたクロマチン免疫沈降解析により、HBV ゲノム中の Enh 1 に E2F1 が直接結合することを発見した (図 4)。この実験には、HBV の受容体を恒常的に強制発現させたヒト肝がん由来細胞 HepG2 である、HepG2-hNTCP-C4 を使用した。HBx 自身も Enh 1 中の E2F 認識部位と相互作用して転写の活性化に寄与することも判明した。HBV Enh 1 からの転写が活性化していることは、RNA polymerase II に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降解析で確認した。E2F1 は E2F 結合部位のない HBV Enh II には当然ながら結合しなかった。しかし、Enh II の下流にある E2F 結合部位 (図 1) は認識して結合することが、別のクロマチン免疫沈降解析で明らかとなった。

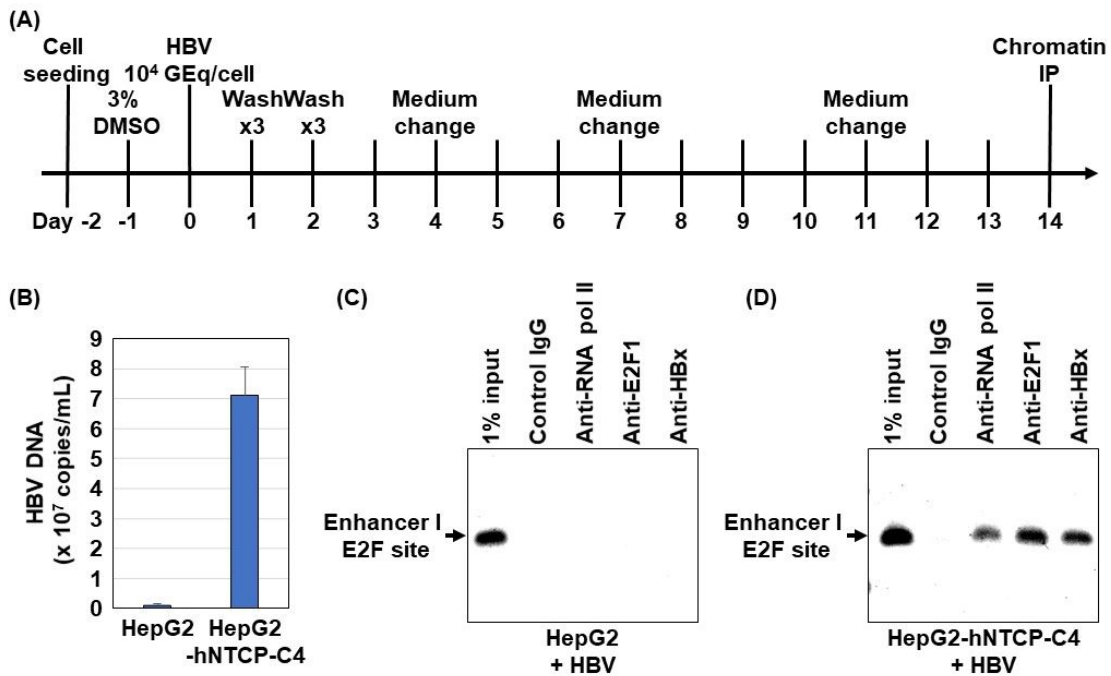


図4. E2F1 とHBV ゲノム中の Enh I の相互作用

(A) HBV 感染スケジュール。(B) HepG2-hNTCP-C4 細胞への HBV の感染。(C) HBV が感染しない HepG2 細胞では E2F1 は HBV Enh I に結合しない。(D) HBV が感染した HepG2-hNTCP-C4 細胞では E2F1 が HBV Enh I に結合する。各抗体によるクロマチン免疫沈降後に、Enh I の E2F 結合部位を PCR で増幅してアガロースゲル電気泳動を行い、DNA を SYBR Green で染色した。

E2F1 が HBV 複製・感染に必要な理由として、宿主因子の制御も考えられる。我々は、HBV 複製に必要な宿主因子の一つ、miR-4453 を発見している。このマイクロ RNA の遺伝子を解析したところ、プロモーター上に E2F 結合部位が存在することを見出した。即ち、E2F1 はウイルスゲノムからの遺伝子発現を直接活性化するだけでなく、宿主の pro-viral factor の遺伝子発現を活性化することで HBV の複製を促進することが示された。E2F1 は当初細胞周期の制御を行う転写因子として研究されてきたが、細胞周期以外にアポトーシスや anti-viral 反応にも関与することが明らかとなってきた。我々の発見により、E2F1 はウイルスゲノムからの転写も含めて、pro-viral にも働くことが証明された為、E2F1 の複雑な機能の使い分けがどのように行われているのか、今後調べていく必要がある。更に、cccDNA に対する E2F1 の効果については現在解析中であるが、直接・間接な効果を問わず、新たな発見が期待できる状況である。

参考文献

- (1) Doitsh G, Shaul Y. Mol Cell Biol. 2004; 24(4):1799-808.
- (2) Munakata T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(50):18159-64.
- (3) Munakata T, et al. PLoS Pathog. 2007; 3(9):1335-47.
- (4) Munakata T, et al. Antiviral Res. 2014; 108:79-87.
- (5) Coschi CH, et al. Cancer Discov. 2014; 4(7):84-53.
- (6) Moolia N, et al. J Viral Hepat. 2002; 9(5):323-31.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitab B, Satoh M, Ohmori Y, Munakata T, Sudoh M, Kohara M, Tsukiyama-Kohara K.	4. 巻 294(15)
2. 論文標題 Ribonucleotide reductase M2 promotes RNA replication of hepatitis C virus by protecting NS5B protein from hPLIC1-dependent proteasomal degradation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 5759-5773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.004397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Y, Matsui H, Yamamoto N, Sato R, Munakata T, Kohara M, Harashima H	4. 巻 266
2. 論文標題 Sato Y, Matsui H, Yamamoto N, Sato R, Munakata T, Kohara M, Harashima H. Highly specific delivery of siRNA to hepatocytes circumvents endothelial cell-mediated lipid nanoparticle-associated toxicity leading to the safe and efficacious decrease in the hepatitis B virus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Control Release	6. 最初と最後の頁 216-225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2017.09.044.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tsubasa Munakata, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Michinori Kohara
2. 発表標題 Enhancement of hepatitis B virus replication by a microRNA targeting pregenomic RNA
3. 学会等名 International HBV Meeting and Associated Meetings (Melbourne, Australia) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsubasa Munakata, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Michinori Kohara
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスの複製を促進するマイクロRNAはプレゲノムRNAを標的とする
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会（タワーホール船堀、東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsubasa Munakata(口頭発表), Michinori Kohara
2. 発表標題 Regulation of the transcription of hepatitis B virus by E2F1
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsubasa Munakata(ポスター発表), Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Michinori Kohara
2. 発表標題 Enhancement of hepatitis B virus replication by a microRNA targeting pregenomic RNA
3. 学会等名 2018 International HBV Meeting -The Molecular Biology of Hepatitis B Viruses- (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsubasa Munakata, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Michinori Kohara
2. 発表標題 Control of hepatitis B virus replication by microRNAs regulated by the in vivo infection
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tsubasa Munakata, Takahiro Sanada, Naoki Yamamoto, Michinori Kohara
2. 発表標題 Control of hepatitis B virus replication by microRNAs regulated by the in vivo infection
3. 学会等名 2017 International HBV Meeting “Molecular Biology of Hepatitis B Viruses” and Satellite Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 B型肝炎ウイルスの複製阻害組成物	発明者 棟方翼(40%)、真田 崇弘(20%)、小原道 法(40%)	権利者 公益財団法人東 京都医学総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/44748	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 B型肝炎ウイルスの複製阻害組成物	発明者 棟方翼(40%)、真田 崇弘(20%)、小原道 法(40%)	権利者 公益財団法人東 京都医学総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-215898	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

公益財団法人 東京都医学総合研究所 疾患制御研究分野 感染制御プロジェクト HP http://www.igakuken.or.jp/infectious/index.html#2

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------