

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09412

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスcccDNAを標的とする分子機構の解析

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms of Hepatitis B virus cccDNA Formation

研究代表者

喜多村 晃一 (Kitamura, Kouichi)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官

研究者番号：70378892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)持続感染ではcccDNAと呼ばれる環状ウイルスDNAが長期に維持されているが、現在のところcccDNAの形成や維持に関わる分子機構の知見は少ない。本研究では、HBV cccDNAの形成・維持に関わる新たな宿主因子の同定及び分子機構について解析を行い、FEN1というDNA修復因子がcccDNA形成に関わることを明らかにし、これを用いて新たなcccDNA実験系を開発した。この成果はさらなる分子機構解明と抗ウイルス薬の標的探索のためにも重要な知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎はワクチンの普及により新規感染者数が大幅に減少しているが、一旦感染が成立してしまうと既存の逆転写阻害による抗ウイルス薬は原理的にcccDNAを除去できないため、持続感染者の根治は依然として困難である。また、HBV持続感染患者を想定するような培養下での長期HBV感染細胞において、cccDNAの制御に影響する因子についてはほとんど知見がない。本研究によってcccDNA形成に関わるFEN1というタンパク質の存在が初めて明らかとなり、今後FEN1や関連する宿主因子の分子機構の解明や、これを標的とする抗ウイルス薬開発につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus (HBV) infection remains a worldwide health problem that affects more than 350 million people. HBV is one of the major etiological pathogens for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) is a key viral intermediate for persistent infection. However, the molecular mechanism of cccDNA formation has not been clarified. In this project, we found that the host factor flap-endonuclease 1 (FEN1) is pivotal in cccDNA formation. We developed a novel cccDNA formation assay using purified viral precursor DNA with recombinant FEN1, DNA polymerase, and DNA ligase. This study provides new insights into the molecular mechanisms of cccDNA formation and proposes FEN1 as a potential anti-HBV drug target.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染者は国内で 110~140 万人と推定されており、感染を放置すれば慢性肝炎、肝硬変、肝がんへと進行するおそれがある。HBV 持続感染では、cccDNA と呼ばれる環状ウイルス DNA が、宿主細胞の核内に維持される。cccDNA はウイルス複製の鋳型となり、ウイルスゲノムである pgRNA 及びウイルスタンパク質をコードする mRNA がそれぞれ転写される。現在 cccDNA を除去する有効な治療法は無く、B型肝炎の根治が難しい理由となっているが、これまで解析系が十分でなかったために、cccDNA を標的とする分子機構の知見が少ない。そこで本研究では、HBV cccDNA の形成・維持に関わる新たな宿主因子の同定及び分子機構について解析を行うことで B型肝炎克服への手がかりを得ることを目指した。

本研究の開始前に我々は、cccDNA 解析モデルである Duck HBV (DHBV) を用いて、DNA 編集酵素 APOBEC3G や AID が cccDNA に対して、高頻度の変異導入や DNA 断片化を引き起こしていること、その過程には宿主の塩基除去修復因子 UNG が関わることを明らかにしてきた。AID/APOBEC ファミリーは DNA/RNA 上の C を U へ変換する DNA 編集酵素群で、11 のメンバーから成る。このうちいくつかは cccDNA に変異を導入する一方で宿主 UNG は変異頻度を少なくする方向に働く。低頻度な変異はウイルスの多様性を広げてしまい薬剤耐性株等出現の原因にもなり得る。実際、病態に関わる既知の変異株には C-to-U 活性 (反対鎖の G-to-A 変異) で説明の付くものが複数ある。また、自前で 4 つの遺伝子しか持たない HBV は複製過程で UNG 以外にも複数の宿主 DNA 修復因子を利用しているであろうことが容易に想像できる。これらのことから、APOBECs 及び DNA 修復因子の活性は cccDNA の形成や維持に大きく関与し、ウイルス複製活性や病原性に影響すると考えられる。

2. 研究の目的

HBV cccDNA に作用する宿主因子として、AID/APOBEC タンパク質ファミリー及び関連の DNA 修復因子群を候補として解析を行い、因子の同定と分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) HBV 複製細胞を用いた候補因子 loss-of-function の解析

cccDNA に作用する宿主因子として DNA 修復因子 FEN1 を第一の候補とした。多くの研究者が使用している HBV 複製細胞として、Tet-CMV プロモーター下の HBV トランスジェーンよりウイルス複製が開始される Hep38.7-Tet 細胞を用いた。cccDNA 形成における FEN1 の効果を検討するために、FEN1 に対する shRNA、siRNA、CRISPR-Cas9 によるノックダウン、FEN1 特異的阻害剤 PTPD による機能阻害実験を行った。RT-qPCR 及びウェスタンブロット法により FEN1 発現の低下を確認するとともに、ウイルス粒子内の HBV DNA 及び核内の cccDNA 検出にはリアルタイム PCR 及びサザンブロット法を用いた。

(2) HBV 感染細胞を用いた候補因子阻害剤の効果検討

HBV 感染細胞として、ウイルス感染レセプターであるヒト NTCP を発現する hNTCP-HepG2-C4 及び、ヒト初代培養肝細胞と同等とされる PXB 細胞を用いた。Hep38.7-Tet 細胞の培養上清から回収・濃縮したウイルスを感染に用いた。

(3) 無細胞系 cccDNA 形成実験系の開発

HBV 複製細胞より細胞質ウイルス粒子内 DNA を回収し、これを基質として組換え FEN1、Bst DNA Polymerase 及び Taq DNA Ligase と反応させた。その産物を、閉環状 DNA 以外を分解する T5 exonuclease 処理と qPCR 及びサザンブロットにより解析した結果、基質である HBV rcDNA から閉環状 DNA が形成されていることが確認された。さらにこの閉環状 DNA を Rolling Circle Amplification (RCA) 法で増幅させ、制限酵素ユニークサイト切断後セルフライゲーションにより 1 コピーずつに再環状化させ肝細胞株 HepG2 にトランスフェクションしたところ、ウイルス複製が確認された。

(4) APOBEC3 タンパク質多型の抗 HBV 活性比較検討

多型がよく知られている APOBEC3C、APOBEC3G、APOBEC3H について検討した。HepG2 細胞に HBV レプリコンプラスミドとそれぞれの APOBEC3 ベクターを遺伝子導入した。APOBEC3 の発現量をウェスタンブロット法で確認するとともに、ウイルス粒子 HBV DNA のリアルタイム PCR による定量を行い、各 APOBEC3 の抗ウイルス活性を比較した。

(本実験に用いた APOBEC3 多型)

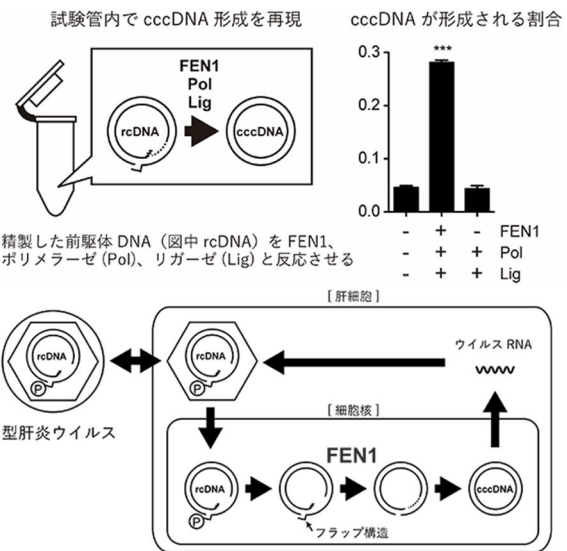
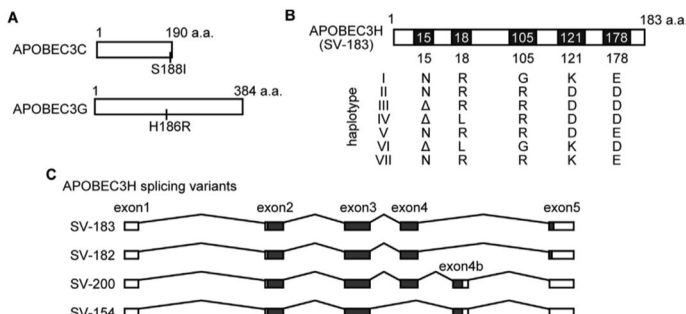
- ・APOBEC3C : S188、I188
- ・APOBEC3G : H186、R186
- ・APOBEC3H: ハプロタイプ I~VII とスプライシングバリエント SV-183、-182、-200、-154。

4. 研究成果

HBV を複製する培養肝細胞 Hep38.7-Tet 細胞を用いて、shRNA 及び siRNA によるノックダウン実験を行った。また、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集で FEN1 ノックアウトを試みたが、ゲノム編集の結果、FEN1 遺伝子の片方のみが欠失したヘテロ細胞が得られた。いずれの loss-of-function 実験においても FEN1 タンパク質量が減少していることを確認した。これらの実験では FEN1 タンパク質量の低下に応じて、HBV cccDNA 量が減少していた。一方でウイルス粒子内の HBV DNA (NC-DNA) の低下は見られず、cccDNA 量低下が特異的に起きていることが示唆された。また、FEN1 阻害剤 PTPD を用いた実験でも同様の結果が得られた。また、HBV 感染細胞でも阻害剤実験を行った。感染細胞では、FEN1 の阻害により cccDNA のみならず全ての HBV 中間体の量が減少した。前述の HBV 複製細胞ではウイルス複製はトランスジーンから起こるため cccDNA 減少が単独で生じるが、感染細胞では cccDNA が減少すればウイルス複製そのものが低下するので、両者の実験系の違いにより結果が異なるのはリーズナブルであると考えられる。これらの結果は細胞内の FEN1 タンパク質が cccDNA 形成に寄与していることを示している。また、shRNA により FEN1 量が低下した細胞に、野生型 FEN1 をトランスフェクションすると cccDNA 量が回復したのに対して、FEN1 の酵素活性を欠失させた変異型を導入すると cccDNA 量は回復しなかったことから、FEN1 の酵素活性が cccDNA 形成に関わることが示唆された。

次に、cccDNA の前駆体 DNA を細胞から抽出し、試験管内において FEN1 に加えて、DNA ポリメラーゼ、DNA リガーゼの3つの酵素と反応させたところ、cccDNA が形成され(右図上) この cccDNA を細胞内に再び導入すると B 型肝炎ウイルスが産生された。したがって、この反応により、試験管内でも実際の cccDNA と同等のものが作られたと考えられ、前駆体 DNA のフラップ構造を FEN1 が取り除いているという分子メカニズムが示唆された(右図下)。HBV は4つしか遺伝子を持たず、その複製には宿主細胞のタンパク質が利用されていることは以前から推定されていたが、本研究によって細胞の DNA 修復因子である FEN1 タンパク質がその一つであることが初めて明らかにされた。この成果により、FEN1 と前駆体 DNA に対する FEN1 の作用機序に注目することで cccDNA 形成を抑える新規の抗ウイルス薬開発につながることを期待できる。さらに本研究で開発した細胞外で cccDNA 形成を再現する実験方法は今後さらなる cccDNA 形成分子メカニズムの解明にも応用できると考える。

cccDNA への作用が推定されている抗ウイルス因子 APOBEC3 タンパク質ファミリーについて、その多型による抗 HBV 効果の違いを検討した。APOBEC3 ファミリーには APOBEC3C、APOBEC3G、APOBEC3H において多型がよく知られている(下図)。これらの抗 HBV 活性を調べるために培養細胞に HBV レプリコンプラスミドとそれぞれの APOBEC3 ベクターを遺伝子導入しウイルス産生量を調べた。その結果、APOBEC3C は I188 型(188 番目のアミノ酸がイソロイシン)が common type である S188 型(188 番目のアミノ酸がセリン)よりも高い抗 HBV 活性を持つことが明らかとなった。APOBEC3G では既知の多型 H186 と R186 の間に差は認められず、APOBEC3H では HIV-1 の研究で既報の通り hap II SV-183 という型が強い抗 HBV 活性を示した。APOBEC3H 多型の抗ウイルス活性の違いは、主にタンパク質量の差と相関があったが、APOBEC3C 多型ではそのタンパク質の差がみられなかった。APOBEC3 ファミリーはウイルスゲノムに高頻度突然変異を導入する活性があるので、APOBEC3C 多型でこれを比較したところ、I188 型に高い変異導入活性がみられたことから、これが抗 HBV 作用に寄与していることが示唆された。この成果は論文として報告した。



これが抗 HBV 作用に寄与していることが示唆された。この成果は論文として報告した。

以上のように、本研究計画により HBV cccDNA の形成に関わる DNA 修復因子の新規同定と、cccDNA に作用する抗ウイルス因子で HBV 複製に関わる APOBEC3 の多型による抗ウイルス効果の違いについて新たな知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Wakae Kouso, Nishiyama Tomoaki, Kondo Satoru, Izuka Takashi, Que Lusheng, Chen Cong, Kase Kina, Kitamura Kouichi, Mohiuddin Md, Wang Zhe, Ahasan Md Monjurul, Nakamura Mitsuhiko, Fujiwara Hiroshi, Yoshizaki Tomokazu, Hosomochi Kazuyoshi, Tajima Atsushi, Nakahara Tomomi, Kiyono Tohru, Muramatsu Masamichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Keratinocyte differentiation induces APOBEC3A, 3B, and mitochondrial DNA hypermutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27930-z	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 -
1. 著者名 Kitamura Kouichi, Que Lusheng, Shimadu Miyuki, Koura Miki, Ishihara Yuuki, Wakae Kouso, Nakamura Takashi, Watashi Koichi, Wakita Takaji, Muramatsu Masamichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.ppat.1007124	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 -
1. 著者名 Seishima Noriko, Kondo Satoru, Wakae Kouso, Wakisaka Naohiro, Kobayashi Eiji, Kano Makoto, Moriyama-Kita Makiko, Nakanishi Yosuke, Endo Kazuhira, Imoto Tomoko, Ishikawa Kazuya, Sugimoto Hisashi, Hatano Miyako, Ueno Takayoshi, Koura Miki, Kitamura Kouichi, Muramatsu Masamichi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression and subcellular localisation of AID and APOBEC3 in adenoid and palatine tonsils	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-18732-w	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 -
1. 著者名 Que Lusheng, Liu Guangyan, Kitamura Kouichi, Wakae Kouso, Li Yingfang, Nishitsuji Hironori, Ujino Saneyuki, Shimotohno Kunitada, Muramatsu Masamichi	4. 巻 510
2. 論文標題 Molecular characterization of AID-mediated reduction of hepatitis B virus transcripts	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 281 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2017.07.035	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 -

1. 著者名 Kanagaraj Arun, Sakamoto Naoya, Que Lusheng, Li Yingfang, Mohiuddin Md, Koura Miki, Wakae Kousho, Kurachi Makoto, Muramatsu Masamichi, Kitamura Kouichi	4. 巻 518
2. 論文標題 Different antiviral activities of natural APOBEC3C, APOBEC3G, and APOBEC3H variants against hepatitis B virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 26 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.003	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 -

1. 著者名 Kano Makoto, Kondo Satoru, Wakisaka Naohiro, Wakae Kosho, Aga Mituharu, Moriyama Kita Makiko, Ishikawa Kazuya, Ueno Takayoshi, Nakanishi Yosuke, Hatano Miyako, Endo Kazuhira, Sugimoto Hisashi, Kitamura Kouichi, Muramatsu Masamichi, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 145
2. 論文標題 Expression of estrogen receptor alpha is associated with pathogenesis and prognosis of human papillomavirus positive oropharyngeal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1547 ~ 1557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32500	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 村松正道, 喜多村晃一
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスcccDNA形成過程におけるFEN1の役割の検討
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 喜多村晃一, 小浦美樹, 村松正道
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスcccDNA形成に関するDNA修復因子の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 喜多村晃一
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスcccDNAの形成・維持に関わる宿主因子の解析
3. 学会等名 第14回ウイルス学キャンプin湯河原
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 喜多村晃一
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスcccDNAに作用する宿主因子
3. 学会等名 平成29年度 北陸腸内細菌研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 喜多村晃一、島津美幸、小浦美樹、村松正道
2. 発表標題 HBV cccDNA形成に作用する因子のin vitro解析
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 喜多村晃一、島津美幸、小浦美樹、村松正道
2. 発表標題 TGF- β -mediated suppression of HBV RNA through AID-dependent recruitment of an RNA exosome complex
3. 学会等名 国際サイトカイン・インターフェロン学会 ICIS2017 in Kanazawa (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 喜多村晃一、島津美幸、小浦美樹、村松正道
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスcccDNA形成過程に関するflapエンドヌクレアーゼFEN1の解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kouichi Kitamura, Arun Kanagaraj, Naoya Sakamoto, Lusheng Que, Mohiuddin Md, Miki Koura, Kousho Wakae, Masamichi Muramatsu
2. 発表標題 Difference of hepatitis B virus restriction activity between natural variants in APOBEC3C, 3G, and 3H
3. 学会等名 7th Japan-Taiwan-Korea HBV Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 喜多村晃一、Lusheng Que、島津美幸、小浦美樹、村松正道
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスcccDNAの形成に関するDNA修復因子FEN1
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第37回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 B型肝炎ウイルス(HBV)増殖阻害剤のスクリーニング方法	発明者 村松正道、喜多村晃一	権利者 国立大学法人金沢大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-152717	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

B型肝炎ウイルス複製の鋳型となるDNAの形成に関わる酵素を発見
<https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/57781>

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
研究協力者	小浦 美樹 (Koura Miki)	金沢大学・医学系・技術補佐員	
連携研究者	若江 亨祥 (Wakae Koucho) (70638303)	国立感染症研究所・ウイルス第二部・主任研究官 (82603)	