

令和 3 年 5 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07161

研究課題名（和文）HBV感染・複製に関与する長鎖非コードRNAの同定とその機能評価

研究課題名（英文）Identification of long non-coding RNAs that regulate HBV replication

研究代表者

西辻 裕紀（Nishitsuji, Hironori）

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：20573661

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、HBV感染・複製に関与するlncRNAを同定するため、HBV Xタンパク質と結合するlncRNAを探索を行った。HAタグとmycタグを融合したXタンパク質を細胞に発現させ、免疫沈降を行い、沈降物からRNAを回収した。回収したRNAを次世代シーケンシングによりXタンパク質と結合するlncRNAを同定した。その結果、HBV Xを負に制御するmiRNAを同定した。このmiRNAはXタンパク質の安定性に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、Xタンパク質と結合するmiRNAを同定した。この同定したmiRNAはHBV Xタンパク質と結合し、Xタンパク質の機能を阻害した。さらにこのmiRNAはHBV感染も阻害した。このmiRNAはXタンパク質と結合することにより、Xタンパク質を不安定化した。Xタンパク質は、HBVの転写を制御していることから、このmiRNAがHBVの潜伏化に関与している可能性が示唆される。また、このmiRNAを人工的に制御できれば、HBV阻害薬のターゲットとして期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I investigated the roles of long non-coding RNA in HBV replication. HepG2 cells were expressed with HA- and myc-tagged HBV X protein. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA and anti-myc antibodies. Immunocomplex were subjected to next generation sequencing to identify lncRNAs bound to HBV X protein. I found that miRNA acts as suppressor of HBV replication through degradation of HBV X protein.

研究分野：ウイルス

キーワード：HBV lncRNA

1. 研究開始当初の背景

HBV を標的とした抗ウイルス薬として、インターフェロンおよびウイルスポリメラーゼ活性を阻害する核酸アナログが知られているだけで、ウイルスを排除する抜本的な治療法はない。一方、C 型肝炎ウイルス(HCV)や HIV においては、異なるウイルス蛋白質の機能を直接抑制する複数種類の薬剤等が開発されており、顕著な治療成績を示している。HBV に対する薬剤開発が遅れている原因として、培養細胞を用いて、ウイルスの感染、複製を定量的に評価する系の開発が、HIV や HCV に比べて遅れている事、および感染、複製を迅速、かつ簡便に評価できる系が存在しなかったためである。

HBV は細胞嗜好性が高く、HepaRG などの一部のヒト肝臓由来培養細胞株を除くとヒト初代肝細胞に限られていた。そのために HBV 感染、複製に供する培養細胞が十分量得られない等の制限があった。しかし、近年 HBV の受容体 (NTCP) が同定され、NTCP を培養細胞株である HepG2 や Huh7 に発現させただけで、それらの細胞に効率よく HBV は感染、複製する事が明らかになった。

しかし、治療薬に繋がるような標的遺伝子や治療薬は未だに見つかっておらず、そのブレークスルーには、従来行われてきた方向性を抜本的に見直す必要があり、申請者は long non-coding RNA (lncRNA) に着目した。

ヒトやマウスの大規模なゲノム解析が進み、タンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) の存在が、明らかにされた。その結果、タンパク質をコードする遺伝子領域は、全染色体 DNA の 2% にしか過ぎないが、全染色体 DNA の約 80% が何らかの機能を有しており、その内、約 62% が non-coding RNA として転写されていることが明らかにされている。ncRNA の中でも、20 塩基程度のマイクロ RNA は、最も盛んに研究されており、発生、分化、代謝、ウイルス耐性、発がんなどのさまざまな機能が備わっていることが明らかにされ、最近では HCV 複製を制御する miR122 のような、宿主のマイクロ RNA を標的とした新規抗ウイルス剤候補が順次明らかにされている。

一方で、数百から数千塩基対に達する lncRNA については、多くの研究者が「ゲノムのがらくた」としてほとんど研究されてこなかったが、近年 lncRNA は細胞の維持、分化のみならず、種々のウイルス複製や様々な疾患にも重要な働きをしていることが、徐々に明らかにされ、治療の標的として注目を集めている。

現在、lncRNA という視点から HBV の感染、複製の研究はほとんど行われておらず、lncRNA が HBV 感染、複製にどのような影響を及ぼし、どのように病原性に関わっているか、ほとんど知られていない。これらを解明できれば、今後の HBV 治療への応用に期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、HBV 感染、複製に関与する lncRNA を同定し、その機能メカニズムを解明することを目的とする。

HBV は肝臓細胞のみ感染、複製が起こり、非肝臓細胞では、全く起こらない。このことから、本研究で同定した lncRNA は、HBV 感染、複製の関与だけでなく、肝臓細胞の分化、維持という観点から考えても、重要な研究結果になることが示唆される。

3. 研究の方法

HBV X タンパク質と結合する lncRNA を同定するため、HA タグおよび myc タグを融合した X を HepG2 細胞に発現させ、Anti-HA および Anti-myc 抗体で免疫沈降法を行った。沈降物から RNA を回収し、次世代シーケンズで X タンパク質と結合する lncRNA の同定を行った。

同定した lncRNA が実際に X タンパク質と結合するかどうか免疫沈降産物から回収した RNA を、RT-PCR で検出した。

同定した lncRNA の mimic および inhibitor を HepG2 細胞に導入し、X タンパク質の Core promoter 活性化能の検討を行った。

同定した lncRNA が HBV 複製に与える影響を検討した。

4. 研究成果

HBV X タンパク質と結合する lncRNA を同定するため、HA タグおよび myc タグを融合した X を HepG2 細胞に発現させ、Anti-HA および Anti-myc 抗体で免疫沈降法を行い、沈降物から RNA を回収し、次世代シーケンスで X タンパク質と結合する lncRNA の同定を行った。

その結果、一つの miRNA が HBV X タンパク質と強く結合することが示唆された。そこでこの

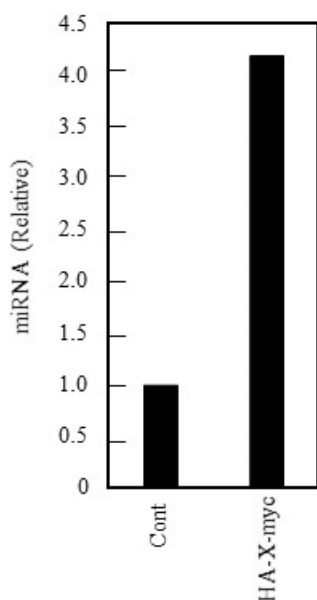


図1 HBV XはmiRNAと結合する

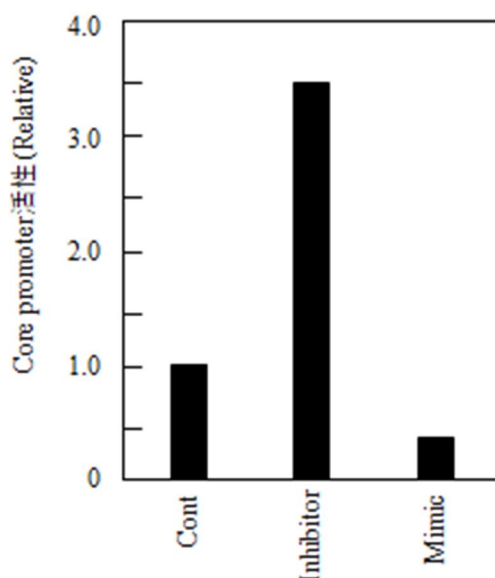


図2 miRNA-XはHBV Xタンパク質の機能を抑制する

miRNA が実際に HBV X タンパク質と結合するかどうか、免疫沈降物から回収された RNA を、同定された miRNA 特異的 Primer を用いて RT-PCR で検出した (図 1)。その結果、HBV X タンパク質と miRNA-X との結合が確認された。

次に miRNA-X の mimic、inhibitor を細胞に導入し、X タンパク質の Core promoter 活性化能の検討を行った。

その結果、inhibitor は HBV X タンパク質の活性を促進し、mimic は活性を抑制したことから、今回同定した HBV X タンパク質と結合する miRNA は HBV X タンパク質の機能を抑制することが示唆された (図 2)。

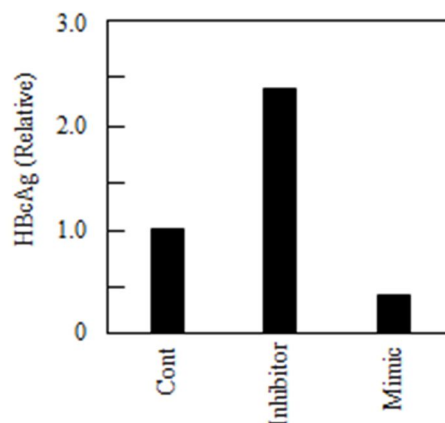


図3 miRNA-XはHBV感染を抑制する

最後に miRNA-X が HBV 感染にどのような影響を与えるか検討した。HepG2-NTCP 細胞に miRNA-X の mimic または inhibitor を導入し、HBV を感染させた。その結果、mimic 導入細胞では HBcAg の産生が減少し、inhibitor 導入細胞では HBcAg の産生が増加した。

以上の結果をまとめると、HBV X タンパク質と結合する miRNA-X は HBV X タンパク質の機能を抑えることによって、HBV 感染を抑制していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsunaga Satoko, Jeremiah Sundararaj S., Miyakawa Kei, Kurotaki Daisuke, Shizukuishi Sayaka, Watashi Koichi, Nishitsuji Hironori, Kimura Hirokazu, Tamura Tomohiko, Yamamoto Naoki, Shimotohno Kunitada, Wakita Takaji, Ryo Akihide	4. 巻 23
2. 論文標題 Engineering Cellular Biosensors with Customizable Antiviral Responses Targeting Hepatitis B Virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100867 ~ 100867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100867	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 Yamada Norie, Murayama Asako, Shiina Masaaki, Aly Hussein Hassan, Iwamoto Masashi, Tsukuda Senko, Watashi Koichi, Tanaka Tomohisa, Moriishi Kohji, Nishitsuji Hironori, Sugiyama Masaya, Mizokami Masashi, Shimotohno Kunitada, Muramatsu Masamichi, Murata Kazumoto, Kato Takanobu	4. 巻 50
2. 論文標題 Anti viral effects of interferon 3 on hepatitis B virus infection in cell culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 283 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13449	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 Ueda Youki, Gu Weilin, Dansako Hiromichi, Nishitsuji Hironori, Satoh Shinya, Shimotohno Kunitada, Kato Nobuyuki	4. 巻 515
2. 論文標題 A new hepatoma cell line exhibiting high susceptibility to hepatitis B virus infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 156 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.05.126	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 Fujita Koji, Mimura Shima, Iwama Hisakazu, Nakahara Mai, Oura Kyoko, Tadokoro Tomoko, Nomura Takako, Tani Joji, Yoneyama Hirohito, Morishita Asahiro, Oryu Makoto, Himoto Takashi, Nishitsuji Hironori, Shimotohno Kunitada, Omata Masao, Masaki Tsutomu	4. 巻 19
2. 論文標題 Serum miRNAs Predicting Sustained HBs Antigen Reduction 48 Weeks after Pegylated Interferon Therapy in HBe Antigen-Negative Patients	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1940 ~ 1940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19071940	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 Miyakawa Kei, Matsunaga Satoko, Yamaoka Yutaro, Dairaku Mina, Fukano Kento, Kimura Hirokazu, Chimuro Tomoyuki, Nishitsuji Hironori, Watashi Koichi, Shimotohno Kunitada, Wakita Takaji, Ryo Akihide	4. 巻 9
2. 論文標題 Development of a cell-based assay to identify hepatitis B virus entry inhibitors targeting the sodium taurocholate cotransporting polypeptide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 23681-23694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25348	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------