

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08380

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスcccDNAの制御を目的とした分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of Hepatitis B virus cccDNA hypermutation

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)の持続感染にはcccDNAと呼ばれるウイルスDNAが感染細胞核内に維持されることが必須である。本研究では、ウイルスゲノムに変異を導入するAPOBEC3ファミリーと、その変異を除去修復するUNGに着目した。サイトカイン刺激とER-OHTシステムにより培養細胞での変異導入活性と修復活性をコントロールし、それに応じてHBV cccDNAの変異頻度が増減すること、変異が蓄積されたcccDNAはウイルス複製能が抑制されていることを示した。慢性B型肝炎における遺伝子発現データでもAPOBEC3ファミリーの発現が上昇しており、実際の病態でも同様の分子機構が存在する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBVは肝臓の主要な発がんウイルスで、慢性感染により肝炎から肝硬変や肝がんへと進行する。cccDNAはウイルス複製の鋳型となる重要な中間体であるが、これ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。本研究の成果により宿主因子のバランスによるcccDNA改変作用が病原性に関わるという結果が得られれば、リスクマーカーとしての基礎医学的提案が可能となり、cccDNA制御を左右する分子機構が明らかになれば、それを標的とした創薬へと発展させることができる。

研究成果の概要(英文)：The covalently closed circular DNA (cccDNA) of hepatitis B virus (HBV) plays a key role in the persistence of viral infection. In this study, using cell-culture systems, we examined whether endogenous APOBEC3s and UNG affect HBV cccDNA mutation frequency. IFN γ stimulation induced a significant increase in endogenous APOBEC3G expression and cccDNA hypermutation. UNG inhibition enhanced the IFN γ -mediated hypermutation frequency. Transfection of reconstructed cccDNA revealed that this enhanced hypermutation caused a reduction in viral replication. These results suggest that the balance of endogenous APOBEC3s and UNG activities affects HBV cccDNA mutation and replication competency.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス ウイルス変異

1. 研究開始当初の背景

HBV の持続感染者は国内で 110~140 万人と推定され、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ウイルス複製の鋳型となる。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。近年、解析に十分な量の cccDNA を産生する HBV 安定発現培養細胞の樹立や、HBV 感染受容体の発見による感染実験が可能となり cccDNA 研究環境整備が進んできた。これにより、我々の見出した FEN1 を始め、様々な DNA 修復因子が cccDNA 形成関連因子として働くという報告がなされてきた。我々はこの知見を踏まえ、HBV 複製細胞から精製した cccDNA 前駆体を複数の組換えタンパク質カクテルで処理することにより cccDNA と同等の閉環状 DNA を作ることができる無細胞 cccDNA 実験系を確立した。一方、HBV 持続感染患者を想定するような、形成された後の cccDNA を制御する因子についてはほとんど知見がなかった。

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 のメンバーから成り、いくつかはその抗ウイルス活性がよく知られている。HBV に対する作用は、そのほとんど全てがウイルス粒子内の DNA を解析対象としており、その意義は不明確であった。その中で我々は初めて、APOBEC3G や AID の強力な作用が cccDNA にあることを示した。その後、別のグループから APOBEC3A、3B による cccDNA 分解を示唆する報告(Lucifora, Science 2014)があったが、こちらには反論(Chisari, Science 2014)や異なるメカニズムの提示が出ており AID/APOBEC による HBV cccDNA 分解機構は controversial であった。一方、過去の臨床検体での解析で、HBV DNA には AID/APOBEC に特徴的な変異パターンが見つかっており、メカニズムの詳細は不明ながら APOBEC による変異導入自体は起きていることが推測される。

2. 研究の目的

本研究で我々は、AID/APOBEC による HBV cccDNA への変異導入機構に着目した。AID/APOBEC ファミリー のいくつかのメンバーはサイトカイン刺激で発現上昇することが知られており、DNA 修復因子 UNG は細胞周期でその活性が調節されていると考えられている。すなわち生体では AID/APOBEC と UNG の活性が条件により変動すると推測される。本研究ではその状況を培養肝細胞で再現し、両者の活性を調節することで、HBV cccDNA の変異頻度に違いが生じるかを確かめた。また、それらの cccDNA を回収し細胞へ再導入することで、ウイルス複製能への影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) 公的データベースを用いた APOBEC 発現解析

Gene Expression Omnibus (GEO) より慢性 B 型肝炎患者肝臓のマイクロアレイデータを取得し、抗ウイルス活性が推測される APOBEC3 サブファミリーの発現プロファイルについて GEO2R を用いて解析した。

(2) HBV 産生培養細胞を用いた実験

cccDNA を産生する HBV 安定発現培養細胞 HepG2.2.15 および HBV を感染させた HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いた。これらの細胞にレンチウイルスベクターを用いて UGI-ER 遺伝子を導入した。UGI は UNG 活性を阻害するタンパク質で、融合させた ER タンパク質により、培養下にタモキシフェン (OHT) を添加することで UGI の活性を調節することができる。

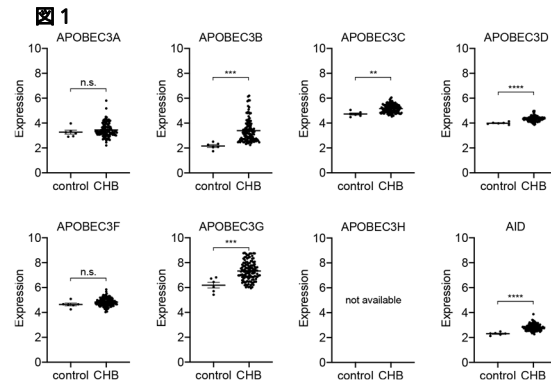
(3) cccDNA の変異解析と再導入

Hirt extraction で精製した cccDNA を、開環状 DNA や直鎖状 DNA など他の HBV DNA フォームと区別するために T5 エキソヌクレアーゼで処理した後、閉環状 DNA のみを増幅する rolling circle amplification (RCA) 法で増幅し、サンガー法により配列解析した。また、コンカタマーとして増幅した RCA 産物を HBV ゲノムのユニークサイトである EcoRI で切断しモノマーとした後、ライゲーションで再環状化させて、培養肝細胞 HepG2 へ遺伝子導入した。

4. 研究成果

(1) 公的データベースを用いた慢性 B 型肝炎患者肝臓の APOBEC 発現解析 (図 1)

慢性 B 型肝炎患者 (n=122) と対照群 (n=6) の肝臓の APOBEC3 の発現プロファイルを比較した。APOBEC3B、3C、3D、3G そして AID が慢性 B 型肝炎患者で統計的に有意な発現上昇を示した。特に APOBEC3G の転写レベルが高かった。



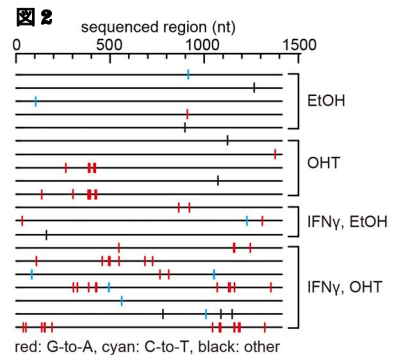
(2) HBV 産生細胞へのインターフェロン (IFN) 添加による HBV cccDNA 変異頻度の変化

HepG2.2.15 細胞および HBV を感染させた HepG2-hNTCP-C4 細胞において、IFN を添加すると、APOBEC3B、3C、3G が強く発現上昇した。IFN は HBV 感染病態にも関連することが知られており、患者データとの整合性がある。これらの細胞で、UGI-ER 系を用いて UNG 活性のオン・オフを調節し、APOBEC と UNG のバランスで HBV cccDNA 変異頻度が変化するかを調べた。

UGI-ER を発現する HepG2.2.15 細胞および HBV 感染 HepG2-hNTCP-C4 細胞へ IFN と OHT を添加し cccDNA を回収、RCA 法で閉環状 DNA を増幅してその変異頻度を 3D-PCR で解析した。3D-PCR は、PCR の変性温度を下げることで AT リッチな DNA を選択的に増幅し、C-to-U/G-to-A 変異が蓄積された DNA を検出できる手法である。結果は、IFN または OHT の添加により cccDNA 変異が引き起こされたことを示した。さらに IFN と OHT の両方の添加により、より高頻度の変異導入が引き起こされた。次に HepG2.2.15 細胞由来の cccDNA について標準的な PCR 増幅を用いて変異頻度を解析した (図 2)。3D-PCR の結果と同じく、IFN または OHT 添加により特に G-to-A 変異が増加し、両者の組み合わせで高い変異頻度が示された。同サンプルのカプシド DNA の配列解析では、同数の解析クローンでは変異が見られなかった。明らかなホットスポットはなかったが、いくつかの変異クラスターが観察され、これは APOBEC3G による連続的な変異導入の特性を示している。

(3) 再構築 cccDNA 導入実験

HepG2.2.15.7 細胞では、ほとんどのウイルス産物は宿主ゲノムに組み込まれた HBV transgene から産生されている。したがって、cccDNA 変異のウイルス複製への影響を分析することは困難である。NTCP-HepG2 感染系でもウイルス複製は細胞内でサイクルしているため、どの段階で複製が阻害されているかは区別が難しい。さらに IFN は多数の抗ウイルス因子の発現を誘導するため、cccDNA 変異だけの結果を分析することはまだ困難である。そこで本研究では cccDNA を一旦精製し、再構築したのちに培養細胞へ再導入した。これによりウイルス複製能への変異頻度の影響のみをみる事ができる。その結果、IFN 刺激と UNG 阻害で生じる HBV cccDNA 変異は、著しく HBV 複製能を減少させることが明らかになった。これらのデータは、内在性 APOBEC3s および UNG 活性のバランスが HBV cccDNA 変異頻度およびその複製能力に影響を与えることを示している。HBV 複製は G1 または G2 期で細胞周期停止と相関することが示唆されており、この時期は UNG 活性が低下する。したがって、低い UNG 活性を持つ感染肝細胞で CD8 陽性 T 細胞からの IFN 刺激により cccDNA 変異が蓄積する可能性がある。



HIV 研究分野では、宿主の抗ウイルス因子 APOBEC3G とウイルスの持つ VIF タンパク質との間の対立の結果、様々な変異をもつウイルス集団 quasi-species が生じると言われている。同様に、cccDNA 変異頻度における APOBEC3s および UNG の活性バランスは、quasi-species や薬剤耐性株の出現に影響を与える可能性がある。UNG 以降の塩基除去修復機構は、核内での HBV cccDNA 切断および切断された DNA 断片の宿主ゲノムへのインテグレーションの可能性もある。核内に存在する変異導入因子 APOBEC 活性と HBV DNA インテグレーションの両方が肝癌を引き起こす可能性があり、その長期的な影響を調査するためには、さらなる研究が必要である。

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 3件）

1. 著者名 Kitamura Kouichi, Fukano Kento, Que Lusheng, Li Yingfang, Wakae Kousho, Muramatsu Masamichi	4. 巻 103
2. 論文標題 Activities of endogenous APOBEC3s and uracil-DNA-glycosylase affect the hypermutation frequency of hepatitis B virus cccDNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001732	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 Kakizaki Masatoshi, Yamamoto Yuichiro, Otsuka Motoyuki, Kitamura Kouichi, Ito Masatoshi, Kawai Hideki, Derek, Muramatsu Masamichi, Kagawa Tatehiro, Kotani Ai	4. 巻 295
2. 論文標題 Extracellular vesicles secreted by HBV-infected cells modulate HBV persistence in hydrodynamic HBV transfection mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12449 ~ 12460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014317	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 Li Yingfang, Que Lusheng, Fukano Kento, Koura Miki, Kitamura Kouichi, Zheng Xin, Kato Takanobu, Aly Hussein Hassan, Watashi Koichi, Tsukuda Senko, Aizaki Hideki, Watanabe Noriyuki, Sato Yuko, Suzuki Tadaki, Suzuki Hiroshi I., Hosomichi Kazuyoshi, Kurachi Makoto, Wakae Kousho, Muramatsu Masamichi	4. 巻 10
2. 論文標題 MCP1P1 reduces HBV-RNA by targeting its epsilon structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77166-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 Yato Keigo, Onodera Taishi, Matsuda Mami, Moriyama Saya, Fujimoto Akira, Watashi Koichi, Aizaki Hideki, Tanaka Tomohisa, Moriishi Kohji, Nishitsuji Hironori, Shimotohno Kunitada, Tamura Koji, Takahashi Yoshimasa, Wakita Takaji, Muramatsu Masamichi, Kato Takanobu, Suzuki Ryosuke	4. 巻 95
2. 論文標題 Identification of Two Critical Neutralizing Epitopes in the Receptor Binding Domain of Hepatitis B Virus preS1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01680-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01680-20	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 Murayama A, Yamada N, Osaki Y, Shiina M, Aly H H, Iwamoto M, Tsukuda S, Watashi K, Matsuda M, Suzuki R, Tanaka T, Moriishi K, Suzuki T, Nishitsuji H, Sugiyama M, Mizokami M, Shimotohno K, Wakita T, Muramatsu M, Liang T J, Kato T	4. 巻 73
2. 論文標題 N Terminal PreS1 Sequence Regulates Efficient Infection of Cell Culture?Generated Hepatitis B Virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 520 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31308	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 喜多村 晃一、深野 顕人、Lusheng Que、Yingfang Li、若江 亨祥、村松 正道
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスcccDNAの変異頻度に関わるAPOBEC3ファミリーとUNGの解析
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 喜多村 晃一、深野 顕人、Lusheng Que、Yingfang Li、若江 亨祥、村松 正道
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスcccDNAの変異頻度に関わるAPOBECsとDNA修復因子UNGの解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

B型肝炎ウイルスの変異頻度に関わる宿主因子の解析
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/virology/11098-vir-2022-04.html>

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
研究分担者	村松 正道 (Muramatsu Masanichi) (20359813)	国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長 (82603)	

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