

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07051

研究課題名(和文) SETによるB型肝炎ウイルス再活性化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of HBV reactivation mediated by SET protein

研究代表者

伊藤 昌彦 (Ito, Masahiko)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：50385423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)のキャリアは国内に100万人以上と推定され、抗がん剤・免疫抑制剤の使用により再活性化が問題となっている。本研究では、cccDNA結合分子としてSETを新規に同定し、特定の薬剤によるSETの発現低下がcccDNAやpgRNAのレベルを亢進させることを示した。さらに、SETがヒストンH2AXと相互作用し、dsDNAからcccDNAの形成に参与していることを明らかにした。本研究の成果は、SETによるcccDNAの維持機構の解明に寄与するだけでなく、cccDNA形成の阻害や潜伏感染しているcccDNAの排除、再活性化抑制のための新薬開発の基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎ウイルスのキャリアは、本邦にはおよそ100～120万人(人口1%)、世界にはおよそ4億人いることが知られている。キャリアにおけるHBV活性化の抑制や無症候性キャリアからの感染拡大の防止は急務となっている。本研究により明らかになったSETによるHBV cccDNA形成・維持・再活性化機構に関する知見は、cccDNAの形成阻害、潜伏感染したcccDNAの排除、再活性化の抑制するための薬剤の開発に繋がり、多くの患者を救うための治療法に発展する。

研究成果の概要(英文)：Over one million individuals in Japan are estimated to be carriers of hepatitis B virus (HBV), and reactivation triggered by anticancer drugs and immunosuppressants poses a significant clinical issue. In this study, we identified SET as a novel cccDNA-binding protein and demonstrated that the downregulation of SET expression by specific drugs significantly enhances the levels of cccDNA and pgRNA. Additionally, we showed that SET interacts with histone H2AX, implicating its role in the formation of cccDNA from dsDNA. The results of this research not only contribute to understanding the mechanism by which SET regulates the maintenance of cccDNA but also lay the groundwork for the development of new therapeutic agents aimed at inhibiting cccDNA formation, eliminating latent cccDNA, and preventing HBV reactivation.

研究分野：ウイルス学

キーワード：HBV B型肝炎ウイルス 潜伏感染 HBV再活性化 cccDNA SET

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)の潜伏・持続感染者は国内に100万人以上と推定され、肝硬変・肝癌のみならず健常既感染における de novo 肝炎の原因となる。現在治療薬として核酸アナログが広く用いられているが、本薬剤はHBVの逆転写のみを阻害するため核内に潜伏する染色体外DNA(エピソーマルDNA)である covalently closed circular DNA(cccDNA)の排除はされない。cccDNAが核内に終生持続的に留まることがHBV感染の完全制圧を困難としており、HBV駆除を目指した新規抗ウイルス治療薬の開発は焦眉の急となっている。

単純ヘルペスウイルス(HSV)、パピロマウイルス(HPV)、エプスタイン・バール・ウイルス(EBV)などのDNAウイルスは、同様にエピソーマルDNAを核内で形成する。これらのDNAウイルスでは核内でエピソーマルDNAが複製し、潜伏持続感染状態において、一定のコピー数に維持されるメカニズム(維持複製)が存在している (Yates J.L ら, J Viol, 1991; Doobar J ら, Vaccine, 2012; Roizman B ら, Fields Virology, 2007)。

一方、HBVは核内でDNA複製は行わず、転写された鋳型RNA(pregenomic RNA)から逆転写されたDNAが核に再侵入(再利用および再感染)することによりcccDNAコピー数が維持されていると考えられている(図1)。しかしながら、転写活性が抑制されている潜伏感染状態において、HBV cccDNAをどのようにして長期間維持され、再活性化状態では何が変化するかは不明であり、ウイルス学やウイルス生活環の観点からも重要な問題である。

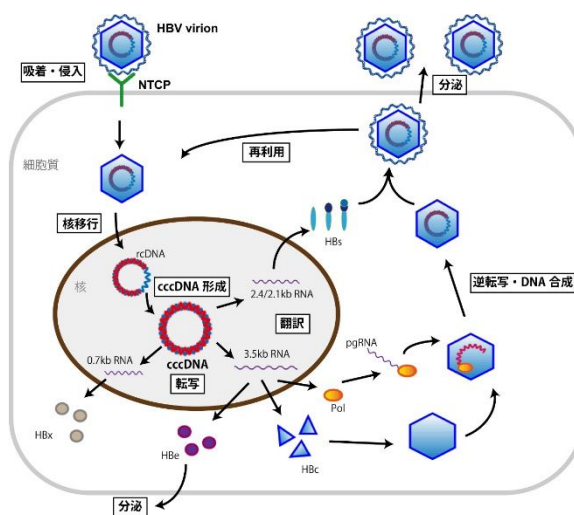


図1. HBVの生活環(肝炎研究会HPより改変)

## 2. 研究の目的

慢性B型肝炎感染において、HBVウイルスゲノムは安定的なエピソーマルDNA(cccDNA)として肝細胞の核内に潜伏している。この潜伏維持状態は終生つづき、免疫抑制剤・抗がん剤などをきっかけとして、オカルトHBV感染やde novo急性B型肝炎などの再活性を引き起こす。不顕性感染で自然に治癒している患者のHBV活性化による肝炎は、通常のB型肝炎と比較して劇症化率や死亡率が高く、近年大きな問題となっている。

cccDNAは、宿主のヒストンタンパクによりクロマチン様構造を呈した状態で核内に存在しており、cccDNAの鋳型となるpgRNAやウイルスタンパク質をコードするRNAを転写する。感染直後はcccDNAやpgRNAなどの発現レベルは高いが、時間経過に伴いその発現レベルは次第に低下し、潜伏感染状態へと移行する。このような潜伏感染状態の維持や再活性化に関するメカニズムについて、現在までまったく分かっていない。

申請者は、これまでの研究でcccDNAと宿主タンパク質をクロスリンクし、ショ糖密度勾配により分画することで、いくつかのcccDNA結合分子を同定した。このうちSETは、その遺伝子発現をノックダウンすることで、感染後に低下していくHBV cccDNAコピー数が高値で維持されていることを見出した(図2)。そこで本研究は、SET遺伝子によるcccDNAの維持制御機構を明らか

にすることで HBV cccDNA の核内潜伏メカニズムを解明する。本研究により cccDNA の形成維持制御機構を明らかにすることで、HBV 再活性化のメカニズムを解明できるだけでなく、HBV 感染細胞での cccDNA の形成阻害、潜伏状態にある cccDNA の排除が可能となり、慢性化の防止、再活性化を防ぐための治療に発展することが期待できる。

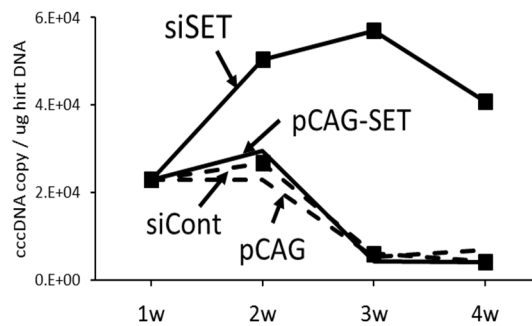


図2 .SET ノックダウンによる cccDNA レベルの変化

### 3 . 研究の方法

本研究では、HBV 持続感染細胞などを用いて、SET による cccDNA の形成やヒストン修飾、pgRNA の転写などを制御する機構を明らかにすることで、HBV 再活性化のメカニズムの解明を試みた。研究期間内に以下の ( 1 ) ( 2 ) の項目を実施した。

#### (1) SET タンパク質発現と cccDNA レベルの維持に関わるメカニズムの解析

SET の発現低下による HBV の発現への影響：潜伏感染している HBV が SET の発現低下により再活性化するかを調べるため、HBV 感染後 3 ~ 4 週間で cccDNA レベルが低下している感染細胞に siRNA による SET のノックダウンを行う。pgRNA、cccDNA レベルをリアルタイム PCR 法により調べた。

SET 発現制御機構の解析：SET 遺伝子プロモーターを Luciferase レポーターベクターにクローニングし、欠失・変異を導入することで SET 遺伝子の発現を制御する転写因子を同定した。

cccDNA 維持に関わる SET 遺伝子内ドメインの同定：これまでに CRISPR/Cas9 システムにより樹立した SET ノックアウト細胞を用いて、SET 完全長およびドメイン欠失体を発現させることで、cccDNA レベルの維持に関わるドメインを明らかにした。

#### (2) SET の機能と HBV 活性化のメカニズムの解析

HBV DNA 修復における SET の機能解析：これまで、HBV 不完全二本鎖 DNA (rcDNA および dsIDNA) が cccDNA に修復される機構に SET が関連していることを示す知見を得ている。SET ノックアウト細胞において修復経路に関連する遺伝子をノックダウンすることで、どのような修復機構が SET 欠損による不完全二本鎖 DNA から cccDNA 形成の亢進に関わっているかを明らかにした。

HBV 再活性化実験系の構築：5) の実験により明らかになったヒストン修飾の変化を誘導する試薬を用いることで、HBV の再活性化を誘導する。また SET ノックダウンによる再活性化がヒストン修飾を変化させる薬剤により抑制することができるかを検討した。

### 4 . 研究成果

本研究開始前に、cccDNA/宿主タンパク質複合体をクロスリンクし、ショ糖密度勾配による分画を行うことで、cccDNA 結合タンパク質として SET を同定した。SET ノックダウンは pgRNA の発現や cccDNA 複製を亢進することから、SET が HBV 複製抑制に関与していることが示唆された。さらに、CRISPR-Cas9 システムを用いて樹立した HepG2-NTCP 細胞由来 SET ノックアウト (KO) 細胞で HBV 感染後の pgRNA や cccDNA レベルが顕著に亢進することを明らかにした。一方で、IP-MS による網羅的な解析を行い、SET タンパク質と相互作用する因子として二本鎖 DNA 切断 (DSB)

修復に関連するヒストン H2AX が同定された。H2AX のノックダウンは pgRNA や cccDNA レベルを低下させること、ChIP アッセイによって H2AX と SET とともに cccDNA にリクルートすることを明らかにした。

そこで本研究では初めに、SET タンパク質発現と cccDNA レベルの維持に関わるメカニズムの解析を行った。DOX 誘導による HBV 発現系( HepAD38.7 細胞 )において SET ノックダウンは cccDNA 形成を亢進させる一方で、H2AX ノックダウンは cccDNA 形成を抑制した。また SET を発現する組換えアデノウイルス感染によって SET KO 細胞での cccDNA 形成の亢進が抑制された。一方で、SET mRNA や SET タンパク質自体の発現は、HBV 感染によって変動はしなかった。また、プレゲノムプロモーターを挿入したレポーターベクターを用いた実験から、SET の発現はプレゲノムプロモーターの転写活性には影響しなかった。次に、SET プロモーター転写制御を明らかにするために SET プロモーターシフェラーゼレポーターベクターを構築した。HBV 感染後の解析により、SET 遺伝子転写開始点上流の-280/-130 および-75/+1 の間に大きく SET プロモーター活性を制御する領域があることが示された。HBV 感染の経験のある患者では、免疫抑制剤や抗がん剤による HBV の再活性化が問題となっており、再活性化の可能性のある薬剤が禁忌となっている。そこで数十種類の薬剤に関して、SET プロモーターシフェラーゼレポーターベクターを用いたスクリーニングを行い、Dexamethasone, Ciclosporin A, いくつかの Abl 阻害剤が SET プロモーター活性を抑制することを明らかにした。Abl 阻害剤のうち nilotinib, bosutinib, ponatinib が SET mRNA およびタンパク質を顕著に低下させることも明らかにし、これらの薬剤による HBV 再活性化の要因のひとつとして SET の発現抑制が示唆された。また、Bcr-Abl の発現により SET の発現が亢進することがこれまでに示されており(Cancer Cell, 8 (2005), pp. 355-368)、この論文では BCR/Abl によって誘導された hnRNAP A1 が SET mRNA の安定性を高めると報告されている。しかしながら、我々も Abl, Bcr-Abl, Bcr, Abl 下流の CRKL の強制発現を試みたが、SET タンパク質の発現の亢進はみられなかった。したがって、Abl 阻害剤による SET の抑制は、本来の Abl とは別の off-target のシグナル伝達に関わっていることが示唆された。

次に、SET の機能と HBV 活性化のメカニズムの解析についていくつかの実験を行った。H2AX は DSB 修復に関わることから、HBV の double strand linear(dsI)DNA の修復を制御していることが考えられた。そこで、dsIDNA をトランスフェクションし、その修復により形成された circular DNA のジャンクション配列を調べた。SET ノックアウトやノックダウンは intact な cccDNA となる相同組換えの割合が増える一方で、過剰発現では相同組換えが起らず末端から離れた位置での Alternative end joining の割合が増加した。一方で、1.3 倍長の HBV プラスミドのトランスフェクションでは SET ノックアウト細胞株での HBV 発現亢進は起きなかった。さらに近位依存性ピオチン化酵素(AirID)による解析により SET と H2AX が相互作用し、この相互作用は HBV 感染により減弱することが示された。SET は脱リン酸化酵素 PP2A の活性を阻害することが報告されていることから、PP2A 阻害剤の添加培養を行ったが SET ノックアウト細胞株における pgRNA レベルの亢進を抑制することができなかった。また SET はヒストンアセチル化の抑制にも関与することが報告されている。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA の添加培養は、pgRNA、cccDNA レベルを亢進させた。以上の結果から、通常時は SET と H2AX が dsIDNA の末端に結合することで抑制されている dsIDNA の修復が、SET の発現低下によって H2AX を介した相同組換え修復が起こることにより rcDNA からだけではなく dsIDNA から cccDNA 形成が起こることが示唆された( 図 3 )

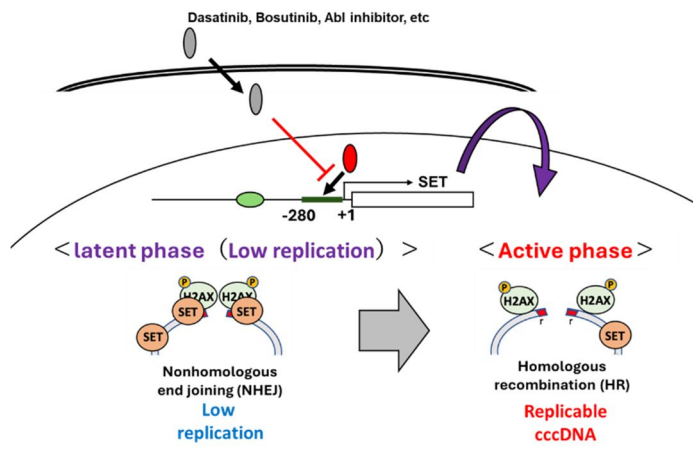


図3 .SET による cccDNA 形成制御機構の模式図

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Li X, Ito M, Aoyagi H, Murayama A, Aizaki H, Fukasawa M, Kato T, Wakita T, Suzuki T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Development and Use of a Kinetic and Real-Time Monitoring System to Analyze the Replication of Hepatitis C Virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 8711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23158711	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 Imagawa T, Ito M, Matsuda M, Nakashima K, Tokunaga Y, Ohta I, Li TC, Suzuki R, Suzuki T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Virus-like particles with FLAG-tagged envelope protein as a tetravalent dengue vaccine candidate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 17542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97038-4	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 Ibrahim MK, Abdelhafez TH, Takeuchi JS, Wakae K, Sugiyama M, Tsuge M, Ito M, Watashi K, El Kassas M, Kato T, Murayama A, Suzuki T, Chayama K, Shimotohno K, Muramatsu M, Aly HH, Wakita T.	4. 巻 95
2. 論文標題 MafF Is an Antiviral Host Factor That Suppresses Transcription from Hepatitis B Virus Core Promoter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e0076721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.00767-21	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 Ohta K, Ito M, Chida T, Nakashima K, Sakai S, Kanegae Y, Kawasaki H, Aoshima T, Takabayashi S, Takahashi H, Kawata K, Shoji I, Sawasaki T, Suda T, Suzuki T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Role of hepcidin upregulation and proteolytic cleavage of ferroportin 1 in hepatitis C virus-induced iron accumulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS Pathog	6. 最初と最後の頁 e1011591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1011591	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 Ariffianto A, Deng L, Abe T, Matsui C, Ito M, Ryo A, Aly HH, Watashi K, Suzuki T, Mizokami M, Matsuura Y, Shoji I.	4. 巻 97
2. 論文標題 Oxidative stress sensor Keap1 recognizes HBx protein to activate the Nrf2/ARE signaling pathway, thereby inhibiting hepatitis B virus replication	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e0128723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01287-23	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 X, Nakashima K, Ito M, Matsuda M, Chida T, Sekihara K, Takahashi H, Kato T, Sawasaki T, Suzuki T.	4. 巻 220
2. 論文標題 SRPKIN-1 as an inhibitor against hepatitis B virus blocking the viral particle formation and the early step of the viral infection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Antiviral Res	6. 最初と最後の頁 105756
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.antiviral.2023.105756	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 Chida T, Watanabe S, Ohta K, Noritake H, Ito M, Suzuki T, Suda T, Kawata K.	4. 巻 212
2. 論文標題 Impact of amino acid substitutions in hepatitis C virus core region on the severe oxidative stress	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med	6. 最初と最後の頁 199-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2023.12.014	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Masahiko Ito, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 SET suppresses HBV cccDNA formation mediated by histone H2AX
3. 学会等名 2022 International HBV meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤昌彦, 鈴木哲朗
2. 発表標題 cccDNA形成およびHBV再活性化におけるSETの役割
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 伊藤昌彦, 鈴木哲朗
2. 発表標題 ヒストンシャペロンSETを介したB型肝炎ウイルスゲノムcccDNA調節機構
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masahiko Ito, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 Regulation mechanism of HBV cccDNA formation via histone chaperone SET/Template-activating factor
3. 学会等名 2021 International HBV meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤昌彦, 鈴木哲朗
2. 発表標題 Nucleosome assembly proteins SET/TAF-I and H2AX regulate HBV cccDNA formation
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Masahiko Ito, Masayoshi Fukasawa, Michinori Kohara, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 PLA2G4C induced by HCV infection is involved in the accumulation of lipid droplets via the inhibition of lipolysis
3. 学会等名 29th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masahiko Ito, Masayoshi Fukasawa, Michinori Kohara, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 PLA2G4C induced by HCV infection is involved in the accumulation of lipid droplets via the inhibition of lipolysis
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masahiko Ito, Hironori Nishitsuji, Kunitada Shimotohno, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 Genome-wide CRISPR/Cas9 library screening identified HPSE2 as an inhibitor for HBV attachment
3. 学会等名 2023 International HBV meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------