

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460993

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスcccDNAを標的とするDNA編集酵素の役割

研究課題名(英文) Host factors involved in HBV cccDNA maintenance

研究代表者

喜多村 晃一 (Kitamura, Kouichi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70378892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)持続感染者は国内で130～150万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ウイルス複製の鋳型となる。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、現在のところcccDNAを標的とする分子機構の知見が少ない。本研究では、HBV cccDNAに対してゲノム情報を改変すると考えられる宿主因子AID/APOBEC蛋白質及び関連するDNA修復機構の作用について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Covalently closed circular DNA (cccDNA) forms a template for the replication of hepatitis B virus (HBV). Despite the crucial role of cccDNA in viral persistence, little is known about the host factors that target this viral intermediate. Recent studies have revealed that AID/APOBEC3 cytidine deaminase family members can induce C-to-U hypermutation on viral genome and restrict viral replication. Uracil residues in DNA are removed by base excision repair (BER) enzyme, uracil DNA glycosylase (UNG), when cytidine deamination is occurred in host genome. We investigated whether uracil residues were generated in HBV cccDNA by APOBEC3G and removed by UNG using in vitro. We found that IFN γ stimulation of hepatocyte cell lines induced the endogenous APOBEC3G expression and HBV cccDNA hypermutation. When UNG activity was inhibited, the IFN γ -mediated hypermutation of cccDNA was enhanced. Our result indicate that BER pathway cancels the mutations of the cccDNA generated by APOBEC proteins.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス

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 130~150 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 からはウイルスゲノム全体が pgRNA として転写され、ウイルス複製の鋳型となる。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。

DNA/RNA の塩基を脱アミノ化するデアミナーゼである AID/APOBEC タンパク質ファミリーの一つである APOBEC3G は、様々なウイルスのゲノムに C から U への高頻度突然変異 hypermutation を誘導しウイルスを不活化するというモデルが提唱されている。また、C-to-U 変換により生じた DNA 上の U は塩基除去因子 UNG (uracil DNA glycosylase) により認識除去される可能性があり、その後塩基除去された DNA には切断 (strand break) と修復の経路が存在する。これはヒトゲノムでは修復機構としてよく知られているが、ウイルスゲノムにおいては strand break による DNA 断片化が想定されており、APOBECs の抗ウイルス活性メカニズムの一つではないかと推測されている。一方で、AID や APOBEC1 の異所性発現は細胞ゲノムにダメージを与えがん化を誘導することが複数のグループから報告されている。また、AID/APOBEC と UNG の活性により、HBV DNA の断片化が起こるのであれば肝細胞ゲノムへの insertional mutagenesis の確率を引き上げ、がん化など病態変化の原因になると考えられる。

実際の慢性 B 型肝炎患者から採取した HBV ゲノムにおいて、hypermutation が起きている事実は確認されているが、HBV 慢性感染における AID/APOBEC の in vivo での働きや発がんとの関連は不明である。また、ウイルス粒子内 HBV DNA から検出される変異頻度は低レベルで、AID/APOBEC の持つ変異導入活性はウイルス抑制にはそれほど貢献していないとの見方もあった。これに対して我々は最近の研究で、cccDNA 解析モデルである Duck HBV (DHBV) を用いて、APOBEC3G が cccDNA にウイルス遺伝情報を破壊するほど高頻度に変異を導入していること、しかし宿主の修復因子 UNG がその変異を修復していることを明らかにした。また、AID と UNG の組み合わせでは DHBV cccDNA の分解に働くことを報告した。

2. 研究の目的

近年、後述する様々な HBV 研究手法が発展し、DHBV を用いていた cccDNA 解析も HBV で行うことが可能になってきた。我々

は DHBV 研究での成果を元に、HBV cccDNA における AID/APOBEC タンパク質及び UNG を始めとする DNA 修復因子の作用について本研究で解析を行った。

3. 研究の方法

主に、HBV レプリコンプラスミドの安定発現細胞株、Tet-Off プロモーター制御下の HBV 安定発現細胞株、及び HBV 感染細胞といった培養肝細胞を用いた解析を行った。HBV 安定細胞株では解析に十分な cccDNA が形成され、感染実験では cccDNA からスタートするウイルス複製能を検討することが可能である。これらの細胞に、塩基除去修復因子 UNG の阻害タンパク質である UGI を発現するコンストラクトを導入し、UNG 活性を制御すると共に、IFN 等のサイトカインで AID/APOBEC タンパク質の発現を誘導し、cccDNA への作用を検討した。AID/APOBEC 発現プロファイルは RT-qPCR で解析した。shRNA ベクターを作成し培養細胞の APOBEC3G ノックダウンを行った。これら APOBEC3G 活性 UNG 活性をコントロールした条件下で cccDNA の定量と配列解析を行うとともに、ウイルス複製能への影響を検討した。変異頻度の解析には 3D-PCR とサンガーシーケンスを行った。3D-PCR は PCR の denature step の温度を下げることにより、AT リッチな DNA を選択増幅する手法である。AID/APOBEC による C-to-U (反対鎖では G-to-A) 変異が生じた配列は元の配列より低温で増幅される。cccDNA 特異的な解析には、閉環状 DNA のみを選択的に増幅する phi29 ポリメラーゼを用いた RCA 法を組み合わせさせた。さらに RCA 法で増幅した cccDNA をクローニングし、細胞内に再導入してウイルス複製能を解析した。AID の新たな抗ウイルス作用として pgRNA の減少を解析した。さらに UNG 以外の DNA 修復因子の作用について siRNA ノックダウン、CRISPR-Cas9 によるノックアウト、阻害剤の実験で予備的な解析を行った。ハイドロダイナミクス法を用いたマウス肝臓へのプラスミド導入により in vivo での AID/APOBEC 作用の検討を行なった。

4. 研究成果

本研究により、肝細胞培養株において内在性 APOBEC3G の脱アミノ化活性と UNG の塩基除去活性が HBV cccDNA に対して作用することが明らかになった。研究開始当初、AID/APOBEC の cytidine deamination による DNA 脱メチル化への関与が提唱されていたが、cccDNA を材料とする我々の予備実験では確認できなかった。AID の新たな抗ウイルス作用として cccDNA から転写される pgRNA に作用してその分解を促しているという結果を得た。さらに新規に cccDNA に作用する DNA 修復因子として FEN1 を明らかにした。これらの研究成果はそれぞれ論文あ

るいは学会発表として報告した。

(1) 培養肝細胞において複数のサイトカインについてAID/APOBEC 発現誘導を検討したところ、IFN でAPOBEC3Gが強く発現上昇するとともに、cccDNAの高頻度突然変異が見られた。この変異導入はAPOBEC3GをshRNAでノックダウンすることにより打ち消された。さらにcccDNA変異はUNG活性を抑制した条件下で促進されることから、宿主の塩基除去修復機構がcccDNA変異を修復していると考えられた。また、感染実験から、この変異頻度の増加に相関して、cccDNAを由来とするウイルス産生量の減少が見られ、cccDNA hypermutationが抗ウイルス効果として働いていることが示唆された。現在、APOBECとUNGのバランスによる変異頻度の増減によって薬剤耐性株が出現するかどうか検討中である。

(2) 他グループによる抗体遺伝子座での研究ではAIDがRNA分解複合体であるRNA exosomeと相互作用していることが示されている。我々は、AIDがcccDNAから転写されるpgRNAとRNAタンパク質複合体を形成しRNA exosome経路でHBV RNA分解に働くことを培養肝細胞及びマウスモデルを用いて示した。

(3) 新たなcccDNA関連因子の探索で、DNA修復因子FEN1がcccDNA形成に関与することをノックダウン、ノックアウト、阻害剤の実験で示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1: 喜多村晃一「B型肝炎ウイルスに対するAID/APOBECタンパク質ファミリーの作用」金沢大学十全医学会雑誌 125(1) 14-17 2016 査読無し
<http://hdl.handle.net/2297/45343>

2: 村松正道、喜多村晃一、若江亨祥「B型肝炎ウイルスとAPOBECファミリー」生化学 2016 88(5)1-6 査読無し doi: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880557,
<http://hdl.handle.net/2297/46611>

3: S. Kondo, K. Wakae, N. Wakisaka, Y. Nakanishi, K. Ishikawa, T. Komori, M. Moriyama-Kita, K. Endo, S. Murono, Z. Wang, K. Kitamura, T. Nishiyama, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, M. Muramatsu and T. Yoshizaki "APOBEC3A associates with human papillomavirus genome integration in oropharyngeal cancers" Oncogene 2016 36(12):1687-1697 査読有り

doi: 10.1038/onc.2016.335.

4: K. Wakae, S. Aoyama, Z. Wang, K. Kitamura, G. Liu, A. M. Monjurul, M. Koura, M. Imayasu, N. Sakamoto, M. Nakamura, S. Kyo, S. Kondo, H. Fujiwara, T. Yoshizaki, I. Kukimoto, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, T. Nishiyama and M. Muramatsu "Detection of hypermutated human papillomavirus type 16 genome by Next-Generation Sequencing" Virology 2015 NOV; 485: 460-466 査読有り doi: 10.1016/j.virol.2015.08.017

5: G. X. Liang, G. Y. Liu, K. Kitamura, Z. Wang, S. Chowdhury, A. M. Monjurul, K. Wakae, M. Koura, M. Shimadu, K. Kinoshita and M. Muramatsu "TGF-beta Suppression of HBV RNA through AID-Dependent Recruitment of an RNA Exosome Complex" Plos Pathogens 2015 Apr; 11(4): e1004780 査読有り doi: 10.1371/journal.ppat.1004780,
<http://hdl.handle.net/2297/43012>

6: M. M. Ahasan, K. Wakae, Z. Wang, K. Kitamura, G. Y. Liu, M. Koura, M. Imayasu, N. Sakamoto, K. Haraoka, M. Nakamura, S. Kyo, S. Kondo, H. Fujiwara, T. Yoshizaki, S. Mori, I. Kukimoto and M. Muramatsu "APOBEC3A and 3C decrease human papillomavirus 16 pseudovirion infectivity" Biochemical and Biophysical Research Communications 2015 Feb; 457(3): 295-299 査読有り doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.103

[学会発表](計6件)

1: Kouichi Kitamura "Flap endonuclease 1 is involved in the cccDNA formation of hepatitis B virus", The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, 2017年1月21日, Center for Learning and Innovation (CLI), Takeda Pharmaceutical Company Limited・大阪府吹田市

2: 喜多村晃一, 島津美幸, 小浦美樹, 村松正道 "Involvement of flap-endonuclease 1 in the cccDNA formation of Hepatitis B virus", 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016年10月23日, 札幌コンベンションセンター・北海道札幌市

3: 喜多村晃一, Guoxin Liang, Guangyan Liu, 村松正道, "AIDによるRNA exosomeを介したHBV RNA分解" 日本生化学会北陸支部第33回大会, 2015年5月23日(土), 富山大学杉谷キャンパス・富山県富山市

4: 喜多村晃一, 島津美幸, 小浦美樹, 村松正道 "Role of host DNA repair factor in the maintenance of hepatitis B virus cccDNA", 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜・神奈川県横浜市

5: 喜多村晃一 "APOBEC demaminases as mutators in oncogenic DNA viruses" International Symposium on Tumor malignant cells, 2014 年 11 月 21 日, 金沢大学がん進展制御研究所・石川県金沢市

6: 喜多村晃一, 島津美幸, 小浦美樹, 村松正道 "B 型肝炎ウイルス cccDNA に対する APOBEC タンパク質の作用", 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 12 日, パシフィコ横浜・神奈川県横浜市

〔その他〕

ホームページ等

[http://molgenet.w3.kanazawa-u.ac.jp/word
press/](http://molgenet.w3.kanazawa-u.ac.jp/wordpress/)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

喜多村 晃一 (KITAMURA KOUICHI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70378892