

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08857

研究課題名(和文) 肝炎ウイルスの増殖制御に関わる細胞内アネキシン分子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of intracellular annexins involved in the propagation of hepatitis virus

研究代表者

阿部 隆之 (ABE, TAKAYUKI)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90403203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、C型肝炎ウイルス(HCV)の増殖制御に関与する細胞内アネキシン分子に対する機能解析を行った。アネキシン分子は、カルシウム依存的なリン脂質結合タンパク質であり、これまでに12種類のアイソフォームが報告されている。本研究の成果として、我々は、アネキシン5分子がHCVの増殖抑制因子として機能することを明らかにした。さらに、アネキシン5分子が、タイトジャンクション形成の制御機構にも関与することを明らかにした。これらの結果より、アネキシン5分子が、タイトジャンクション形成の恒常性維持を介して、肝炎ウイルスの増殖抑制因子として機能している可能性を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の主な成果として、肝炎ウイルスに対する新たな増殖抑制因子として、アネキシン5分子を同定したことが挙げられる。また、学術的な新たな知見として、アネキシン5分子がタイトジャンクション形成の恒常性維持にも関与していることを明らかにした。タイトジャンクション形成の恒常性維持の破綻は、癌、難聴、糖尿病などの様々な疾患の要因になることが示唆されている。アネキシン5分子の機能を詳細に解析することで、肝炎ウイルスの排除のみならず、タイトジャンクション形成の恒常性維持の破綻に起因する様々な疾患に対する分子機序、ならびに治療法開発への道が開ける可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Annexins (ANXs) comprise a family of calcium- and phospholipid-binding proteins and are implicated to involve in not only a numerous of cellular processes but also life-cycle of several viral infections. Here we demonstrate a novel insight of annexin A5 (ANXA5) on the HCV life-cycles. The knockdown of ANXA5 remarkably increased the expression of both HCV proteins and HCV RNA levels in the HCV replicon cells. Using an infectious HCV clones, we confirmed the significant enhancement of HCV propagation in the ANXA5 knockdown cells, suggesting that ANXA5 acts as a negative regulator of HCV infection. Furthermore, the confocal microscopic analysis revealed that ANXA5 is required for the proper cellular localization of tight-junction (TJ) proteins such as CLDN-1 and OCLN, which are critical entry factors for HCV infection. These results provide new insights into the HCV life-cycle on the function of ANXA5 that acts via modulation of TJ proteins assembly.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス アネキシン タイトジャンクション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

劇症肝炎患者の急性期血清より分離された感染性 C 型肝炎ウイルス (HCV) クローン (2a 型 JFH1 株) の分離により、HCV の感染生活環ならびにその病原性発症機序の理解が急速に進んできた。HCV の感染機序は、感染受容体として最初に報告された CD81 に強く依存するが、CD81 依存的及び非依存的なウイルス感染経路にクロードイン (CLDN) やオクルーディン (OCLN) などのタイトジャンクション形成に関与する極性タンパク質が報告されている。しかしながら、CD81 非依存的な極性タンパク質を介した HCV の感染・増殖機構や、肝炎ウイルスの病原性発症機構における極性タンパク質の役割及び影響は依然として明らかにされていない。

一方、我々はこれまでに、HCV 増殖を制御する細胞内宿主因子として、カルシウム依存的リン脂質結合タンパク質であるアネキシン (ANX) 分子を同定した。具体的には、アネキシンファミリーの中で、ANX2 あるいは ANX5 を RNAi で発現抑制すると、HCV の増殖レベルが亢進し、同時に CLDN や OCLN などのタイトジャンクション形成の緩み (disassembly) が誘導されることを見出した。興味深いことに、感染性 HCV クローンの肝細胞への感染のみならず、感染性ウイルス粒子を産生しない HCV ゲノム自律複製細胞 (レプリコン) においてもタイトジャンクション形成の緩みが強く誘導された。これらの結果は、アネキシン分子による極性タンパク質の制御機構を介した HCV 増殖抑制機構の存在を示唆するものである。

2. 研究の目的

HCV 感染に対する直接作用型の抗ウイルス剤 (Direct Acting Antivirals: DAA) の開発により、HCV の治療成績の飛躍的向上が期待されている。しかしながら、一方で未だ薬剤耐性株の出現や、ウイルス排除後の肝発癌などが報告され、新たな学術的知見に立脚した HCV による肝疾患の治療法及び制御方法の確立が急務とされている。

本研究では、これまでに応募者が予備検討で見出した新規肝炎ウイルス増殖制御因子とその作用機序に焦点を当て、肝炎ウイルスの新たな感染制御機構における役割や肝炎ウイルス特異的な病原性発症機序への関与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

極性タンパク質によるタイトジャンクションの形成・維持及び肝炎ウイルスに対する生体防御機構としての役割を、リン脂質結合タンパク質アネキシン分子との相互作用に焦点を当て、それらの分子機序を明らかにする。具体的には、1) ヒト肝癌細胞株におけるアネキシン分子の発現プロファイルを解析し、HCV の増殖制御に関与する新たなアネキシン分子を同定する、2) siRNA 及び CRISPR/Cas9 法によるアネキシン分子の発現制御に及ぼす HCV 複製の影響を解析する、3) アネキシン分子の発現制御に伴うタイトジャンクション形成に及ぼす影響を解析する、などを検討する。上記 3 点の項目を明らかにした上で、新規の脂質代謝及びリン脂質シグナル伝達経路分子を標的にした肝炎ウイルスに起因する病態改善の制御方法を確立することを目的とする。

4. 研究成果

HCV の感染及び増殖を許容するヒト肝癌細胞株である Huh7 細胞を用いて、アネキシン分子の発現プロファイルをリアルタイム PCR 法にて解析した。その結果、これまでに報告のある、ANX2 及び ANX3 に加え、ANX5 分子の発現も有為に上昇していることが確認された。HCV レプリコン細胞を用いた siRNA の実験より、ANX5 分子の特異的な発現抑制に伴い、HCV 複製が飛躍的に促進される事が示された。この結果は、HCV 感染性クロー

ンである J6/JFH1 株の感染実験系でも確認された。これらの結果より、新たに ANX5 分子が HCV の増殖抑制因子(ネガティブレギュレーター)として機能している事が示された。興味深いことに、ANX5 分子の発現抑制に伴い、タイトジャンクションの形成に關与するクローディン (CLDN) やオクルーディン (OCLN) 蛋白質の発現低下や、細胞内局在の緩み (disassembly) が觀察された。これらの結果より、ANX5 分子が HCV の増殖制御のみならず、タイトジャンクション形成にも重要な役割を担うことが示唆された。また、HCV の持続感染細胞系である HCV レプリコン細胞でも、タイトジャンクション形成の破綻が強く觀察された。タイトジャンクション形成の恒常性維持の破綻は、癌、難聴、糖尿病などの様々な疾患の発症要因となることが示唆されている。今後、ANX5 分子の新たな機能を解析することで、HCV の増殖制御方法のみならず、多様な疾患の治療法の開発に貢献できる可能性が提示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Takayuki Abe, and Sagi D. Shapira.	4. 巻 344
2. 論文標題 Negative regulation of cytosolic sensing of DNA.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Rev Cell Mol Biol	6. 最初と最後の頁 91-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.ircmb.2018.09.002.	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 該当する

1. 著者名 Takayuki Abe, Yuki Marutani, and Ikuo Shoji.	4. 巻 63
2. 論文標題 Cytosolic DNA-sensing immune response and viral infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol & Immunol	6. 最初と最後の頁 51-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12669.	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 Lin Deng, Xiang Gan, Masahiko Ito, Ming Chen, Hussein H. Aly, Chieko Matsui, Takayuki Abe, Koichi Watashi, Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Masashi Mizokami, Ikuo Shoji, and Hak Hotta.	4. 巻 93
2. 論文標題 Peroxiredoxin 1, a novel HBx-interacting protein, interacts with exosome component 5 and negatively regulates hepatitis B virus (HBV) propagation through degradation of HBV RNA.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Virol	6. 最初と最後の頁 e02203-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02203-18.	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 Chieko Matsui, Lin Deng, Nanae Minami, Takayuki Abe, Kazuhiko Koike, and Ikuo Shoji.	4. 巻 92
2. 論文標題 Hepatitis C virus NS5A protein promotes the lysosomal degradation of hepatocyte nuclear factor 1a via chaperone-mediated autophagy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Virol	6. 最初と最後の頁 e00639-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00639-18.	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 Chikako Ono, Toru Okamoto, Takayuki Abe, and Yoshiharu Matsuura.	4. 巻 10
2. 論文標題 Baculovirus as a tool for gene delivery and gene therapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 E510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v10090510.	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 Nanae Minami, Takayuki Abe, Lin Deng, Chieko Matsui, Takasuke Fukuhara, Yoshiharu Matsuura, and Ikuo Shoji.	4. 巻 61
2. 論文標題 Unconjugated interferon-stimulated gene 15 specifically interacts with the hepatitis C virus NS5A protein via domain I.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 287-292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12493.	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 Takayuki Abe, Albert Lee, Ramaswami Sitharam, Jordan Kesner, Raul Rabadan, and Sagi D. Shapira.	4. 巻 46
2. 論文標題 Germ-cell-specific inflammasome component NLRP14 negatively regulates cytosolic nucleic acid sensing to promote fertilization.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 621-634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.immuni.2017.03.020.	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 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Masutani Y, Abe T, Matsui C, Deng Lin, Matsuura Y, and Shoji I
2. 発表標題 Annexin 5 participates in the negative regulation of HCV propagation.
3. 学会等名 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology.
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Characterization of pro-viral effects of NS5A-ISGylation among different HCV genotypes.
2 . 発表標題 Abe T, Matsui C, Deng Lin, Fukuhara T, Matsuura Y, and Shoji I
3 . 学会等名 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology.
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Characterization of pro-viral effects of NS5A-ISGylation among different HCV genotypes.
2 . 発表標題 Abe T, Matsui C, Deng Lin, Fukuhara T, Matsuura Y, and Shoji I
3 . 学会等名 26th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Rheza Gandhi Bawono, Abe T, Deng L, Matsui C, Shimotohno K, and Shoji I.
2 . 発表標題 ISylation of HBx protein confers the pro-viral effects on HBV replication and resistance to interferon (IFN)-response
3 . 学会等名 2019 International HBV Meeting (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Abe T, Minami N, Rheza Gandhi Bawono, Matsui C, Deng L, Fukuhara T, Matsuura Y, and Shoji I.
2 . 発表標題 Critical role of NS5A-ISGylation in the efficient HCV RNA replication.
3 . 学会等名 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology.
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Rheza Gandhi Bawono, Abe T, Deng L, Matsui C, Shimotohno K, and Shoji I.
2. 発表標題 The role of ISG15-conjugation on the Hepatitis B virus HBx protein.
3. 学会等名 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology.
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Abe T, Minami N, Rheza Gandhi Bawono, Matsui C, Deng L, Fukuhara T, Matsuura Y, and Shoji I.
2. 発表標題 Critical role of NS5A-ISGylation in the efficient HCV RNA replication.
3. 学会等名 25th International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Abe T, Rheza Gandhi Bawono, Deng L, Matsui C, Shimotohno K, and Shoji I.
2. 発表標題 The role of ISG15-conjugation on the Hepatitis B virus HBx protein.
3. 学会等名 2018 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Abe, Nanae Minami, Ken Tomochika, Chieko Matsui, Lin Deng, Takasuke Fukuhara, Yoshiharu Matsuura, and Ikuo Shoji.
2. 発表標題 Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) regulates HCV RNA replication via different ISGylation sites on HCV NS5A.
3. 学会等名 24th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Abe, Nanae Minami, Ken Tomochika, Chieko Matsui, Lin Deng, Takasuke Fukuhara, Yoshiharu Matsuura, and Ikuo Shoji.
2. 発表標題 Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) regulates HCV RNA replication via different ISGylation sites on HCV NS5A.
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

〔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