

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08001

研究課題名(和文) HBVcccDNAの核内維持メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism for maintenance of hepatitis B virus cccDNA

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルスのキャリアは国内に100万人以上と推定され、抗がん剤・免疫抑制剤などをきっかけに再活性化を引き起こすことが大きな問題となっている。本研究により、cccDNA結合分子としてSETを新規に見出し、SETの発現低下がcccDNAやpgRNAの発現レベルの亢進すること、二本鎖DNA切断修復に関わるヒストンH2AXと相互作用することでdsDNAからcccDNAの形成に関与していることが示された。本研究により得られた知見は、SETによるcccDNAの維持制御機構を明らかにするだけでなく、cccDNA形成の阻害、潜伏感染しているcccDNAの排除、再活性化抑制のための薬剤創出の基盤となる。

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)：Chronic Hepatitis B virus (HBV) infection is a significant public health problem. Around a million people live with chronic HBV infection in Japan. The viral genome persists in the nuclei of hepatocytes, because covalently closed circular DNA (cccDNA) is stable in nondividing cells. However, the detailed molecular mechanisms underlying formation of cccDNA minichromosome and transcriptional reactivation of the viral cccDNA are poorly understood. From the exploration of the host factors associated with cccDNA, SET were identified. Knockdown or knockout of SET results in enhanced expression of cccDNA and pgRNA. In addition, SET was involved in cccDNA formation from double strand linear DNA via Histone H2AX. In this study, I elucidated that the involvement of SET on the HBV lifecycle and the molecular mechanism of latency and reactivation of HBV. The results obtained in this study lead to development of novel antiviral therapeutic agents or removal of cccDNA from the patients.

研究分野：ウイルス学

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

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)。また最近になり細胞質内DNAセンサー分子であるIFI16が核内でエピソーマルDNAを認識し、自然免疫を惹起することが報告されているが、HSVなどでは、このセンサーを回避するメカニズムが報告されている(Orzalli et al., Proc Natl Acad Sci 109:3008-3017, 2012)。

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持続感染状態において、この既知の機構ではcccDNAを長期間維持することは難しいと考えられる。またcccDNAの維持のために核内自然免疫を逃れる必要がある。この2点を本研究の核心をなす学術的な「問い」とし、その解明を試みる。

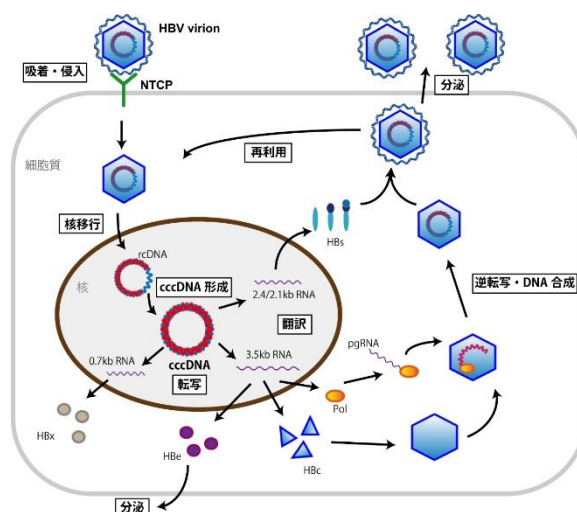


図1. HBVの生活環(肝炎研究会HPより改変)

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)を肝細胞の核内に形成し潜伏している。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。HBV 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 pregenomic RNA やウイルスタンパク質をコードするRNAの転写はヒストンのアセチル化やメチル化などのエピジェネティックな制御を受けていることが知られている。しかしながら、細胞周期依存的な複製機構やその複製起点はHBVゲノムには存在しておらず、潜伏感染した細胞で長期に亘りコピー数が維持される機構はまったく分かっていない。

申請者は、最近の研究で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る分画することで、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。本研究によって HBV cccDNA の維持機構が解明されれば、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ものと考えられる。

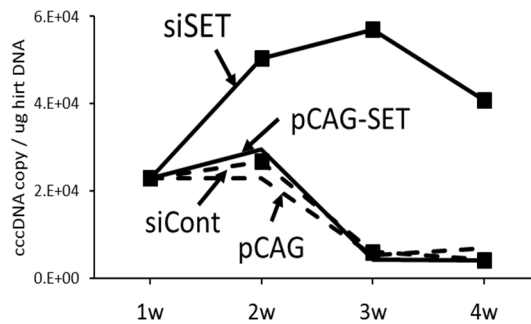


図2 .SET ノックダウンによる cccDNA レベルの変化

3 . 研究の方法

本研究では、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ために、研究期間内に以下の I, II の項目を実施する。

(1) SET タンパク質発現量と cccDNA 量の相関を明らかにする。(平成 30 年度)

HBV感染感受性細胞株におけるSETの発現とcccDNA量との相関解析：HBVが感染可能もしくはHBV粒子産生細胞株(HepG2, HepG2-NTCP, HepaRG, 初代ヒト肝細胞, HepAD38.7, HepG2.215)において、SETの発現量とcccDNAコピー数との相関を明らかにする。

SETノックアウト細胞を用いたcccDNA維持機構の解析：CRISPR-Cas9システムによりHepG2-NTCP由来のSETノックアウト細胞株を樹立する。HBV感染実験を行い、経時的なcccDNAコピー数の変化をリアルタイムPCR法により調べる。

cccDNA維持に関わるSET遺伝子内ドメインの同定：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の維持に関わるドメインを明らかにする。

(2) cccDNA 維持に関わる SET の機能を明らかにする。(平成 31 年度以降)

核内におけるSETとcccDNAの局在解析：免疫染色法とCASIFISHにより、SET(とその欠失体)とcccDNAの共局在を明らかにする。

結合タンパク質の同定および相互作用の解析：FLAGタグを融合したSETタンパク質を免疫沈降することで、相互作用のあるタンパク質を質量分析法により同定する。SETと同定タンパク質やHBVコアタンパク質との相互作用をco-IPにより明らかにする。また、ChIPアッセイにより、SETとcccDNAとの結合を調べる。

SETによるヒストン修飾の解析：SETはヒストンシャペロン活性があり、HAT活性を阻害する機能をもつ。そこで、ChIPアッセイによりSETによるcccDNAのヒストン修飾の変化を解析する。HAT活性の亢進がcccDNAの不安定化を誘導するのかを検討する。

遺伝子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遺伝子の発現に関わる転写因子を同定する。

核内自然免疫系の関与およびHBV実験系への応用：SETのノックダウンによりcccDNAコピー数が低下しない知見から、SETノックアウト細胞株はcccDNA解析実験に有用と考えられる。そこで核内自然免疫分子によるcccDNAが認識されるのかを明らかにする。また、効率のよいHBV粒子産生細胞株になりうるかを検討する。

cccDNA量を調節する化合物の探索：SETの発現や活性を調節するような化合物をライブラ

りからスクリーニングすることで、cccDNAの完全排除を目指した新規薬剤を探索する。

4. 研究成果

本研究開始前に、cccDNA と宿主タンパク質をクロスリンク、シヨ糖密度勾配により分画することで、cccDNA 結合タンパク質として SET を同定した。SET ノックダウンにより pgRNA レベルや cccDNA 複製を亢進することから、SET が HBV 複製を抑制していることが示唆されていた。一方で、SET 発現プラスミドのトランスフェクションにより SET が過剰発現した細胞では、pgRNA と cccDNA レベルの亢進はわずかであった。これは肝癌培養細胞株の内在遺伝子から発現する SET が十分な量であるためと考えられた。

本研究では初めに、HBV 複製における SET の機能を詳細にするために、CRISPR-Cas9 システムを用いて HepG2-NTCP 細胞株由来の SET ノックアウト細胞株を樹立した。HBV 感染後、コントロール細胞と比べて SET ノックアウト細胞では pgRNA や cccDNA レベルが顕著に亢進しており、SET が HBV 複製の抑制に機能していることが示された。この SET ノックアウト細胞での HBV の発現亢進は SET 発現プラスミドによってレスキューされることが確認できた。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。そこで、SET による HBV 複製抑制のメカニズムを明らかにするための実験を行った。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を抑制することも報告されている。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 TSA の添加培養は、pgRNA、cccDNA レベルを亢進させることが分かった。そこで次に、IP-MS により SET タンパク質と結合するタンパク質の網羅的な解析を行った。最もスコアの高い同定タンパク質は、二本鎖 DNA 切断(DSB)の修復に関連するヒストン H2AX であった。H2AX と SET の結合は免疫沈降によっても確かめられ、ChIP アッセイによって H2AX と SET が cccDNA にリクルートすることを明らかにした。H2AX のノックダウンは pgRNA や cccDNA 量を低下させた。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。H2AX は DSB 修復に関わることから、HBV の double strand linear (ds)DNA の修復を制御していることが考えられた。そこで、dsDNA 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こ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。以上の結果から、通常時は SET と H2AX が dsDNA の末端に結合することで抑制されている dsDNA 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 dsDNA から cccDNA 形成が起こることが示唆された(図3)。

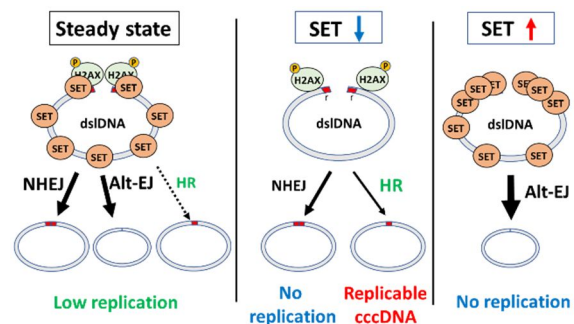


図3 .SET による cccDNA 形成制御機構の模式図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 X. Zhou, H. Bai, M. Kataoka, M. Ito, M. Muramatsu, T. Suzuki, TC. Li.	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization of the self-assembly of New Jersey polyomavirus VP1 into virus-like particles and the virus seroprevalence in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 13085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-49541-y	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 L. Deng, X. Gan, M. Ito, M. Chen, HH. Aly, C. Matsui, T. Abe, K. Watashi, T. Wakita, T. Suzuki, T. Okamoto, Y. Matsuura, M. Mizokami, I. Shoji, H. 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 Ito Noriomi, Nakashima Kenji, Sun Suofeng, Ito Masahiko, Suzuki Tetsuro	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell Type Diversity in Hepatitis B Virus RNA Splicing and Its Regulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2019.00207	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 5件）

1. 発表者名 Masahiko Ito, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 Nucleosome assembly proteins SET and SETAP-1 regulate HBV cccDNA formation and pregenomic RNA expression.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiko Ito, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 Regulation of HBV cccDNA formation and pregenomic RNA expression by SET oncoprotein and its associated protein SETAP-1.
3. 学会等名 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiko Ito, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 Involvement of SET nuclear proto-oncogene in HBV pregenomic RNA expression and cccDNA regulation.
3. 学会等名 7th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiko Ito, Kenji Nakashima, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 Exploration and characterization of host factors associated with reactivation of HBV cccDNA
3. 学会等名 6th TAIWAN-KOREA-JAPAN HBV Research Symposium 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiko Ito, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 Exploration and characterization of host factors involved in the metabolism and regulation of HBV cccDNA
3. 学会等名 2018 International HBV Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiko Ito, Tetsuro Suzuki.
2. 発表標題 Involvement of SET nuclear proto-oncogene in the regulation of HBV cccDNA
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018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
---------	---------