

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460985

研究課題名(和文) HBV複製におけるエピジェネティクス制御機構の解明と新規抗ウイルス療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of epigenetic regulation of hepatitis B virus replication and its therapeutic application

研究代表者

田中 康雄 (TANAKA, YASUO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40422290

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)：本研究ではB型肝炎ウイルス(HBV)複製の鋳型であるcccDNAからのエピジェネティクス転写制御機構の解明を行った。cccDNAのヒストンアセチル化によりHBV プレゲノムRNAの転写が誘導され、複製が亢進することが明らかとなった。さらにデキサメタゾンにより誘導されるHBV複製にもヒストンアセチル化酵素、特にGCN5によるエピジェネティックな機序が関与しており、GCN5阻害剤によるHBV増殖抑制の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms of epigenetic regulation and modification of cccDNA. In HepG 2.2.15 cells, acetylation of histones H3 and H4 in the HBV core promoter region was observed. Dexamethasone treatment enhanced HBV replication by inducing hyperacetylation of histones in the HBV core promoter region. Furthermore, active recruitment of histone acetyltransferases in core promoter region was observed. One of the histone acetyltransferase inhibitors, CPTH2 (GCN5 inhibitor), reduced HBV pgRNA transcription and cancelled transcriptional activation induced by dexamethasone. Our findings may assist in the development of novel effective therapy against HBV.

研究分野：肝臓

キーワード：HBV エピジェネティクス cccDNA ヒストンアセチル化

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は1968年に発見された不完全二重鎖DNAウイルスで、我が国では約7万人のB型慢性肝炎/肝硬変/肝がん患者の他に、HBVキャリアが約100万人近くいると推測されており、健康上の重大な問題となっている。

HBVは肝細胞内に侵入すると、HBVゲノムである不完全環状二本鎖DNAが肝細胞の核内に移行し、ポリメラーゼによって完全閉鎖二本鎖DNA[covalently closed circular DNA(cccDNA)]に修復される。このcccDNAが鋳型となって4種のmRNAが転写され、その中のpregenomic RNAがコア粒子に取り込まれ、逆転写酵素の働きによりマイナス鎖DNAに逆転写、さらにはプラス鎖DNAが合成され不完全環状二本鎖DNAとなる。最終的にこのゲノムDNAはHBs抗原より形成されるエンベロープに包まれて感染性ウイルス粒子となり血中に放出される。

HBVによる肝障害の進展を抑えるためにはHBVの増殖抑制が必要であり、現在抗ウイルス薬としてラミブジン、アデフォビル、エンテカビルなどの核酸アナログ製剤が用いられている。これらはHBVポリメラーゼによる核酸の取り込みを競合的に阻害し、さらにHBV DNAに取り込まれてDNA鎖の伸長を停止することによって強力にウイルス増殖を抑制するが、長期投与が可能である一方でHBV DNAが検出感度以下で維持されても、投与中止によりウイルス血症そして肝炎の再燃がみられることが知られている。この現象は、核酸アナログ製剤がHBVの複製の鋳型であるcccDNAを排除する作用を持たないため、投与中止後に核内に残存したcccDNAが鋳型となってウイルス増殖が再び活発化するためと考えられている。したがってこのcccDNAを排除もしくは制御する治療法の開発が現在のB型肝炎治療の大きな課題となっており、早急な対策が望まれている。

HBVゲノムには4か所のプロモーター領域、2か所のエンハンサー領域が存在し、その領域に様々な転写因子が誘導されて遺伝子の発現が調節されていることが以前から報告されていたが、さらに近年この転写調節がエピジェネティクス(epigenetics)による制御を受けていることが報告され注目されている。エピジェネティクスとは、ヒストン修飾(ヒストンのアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化など)やDNAのメチル化などDNAの塩基配列の変化を伴わない機序で遺伝子発現が調節される機構をいい、このcccDNAが宿主(ヒト)のヒストンタンパクによりクロマチン様構造("minichromosome")を呈した状態で核内に安定に存在し、ウイルスゲノムの転写がヒ

ストンのアセチル化などのエピジェネティックな制御を受けているという報告がなされている。

あるグループはHBV複製の鋳型であるcccDNAが"minichromosome"の状態で核内に存在し、ウイルスの複製が亢進した状態ではcccDNA上のヒストンH3、H4がアセチル化されていることを明らかにした(Gastroenterology. 2006;130:823-37.)。また生体内におけるHBVの複製に不可欠であることが知られている非構造タンパク、B型肝炎ウイルスXタンパク(Hepatitis B virus X protein;HBx)がcccDNA上のヒストンアセチル化を調節することによりpregenomic RNAの転写を調節していることを示した(Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:19975-9.)。さらに彼らはIFN α によるHBV複製の抑制機構にも、cccDNA上のヒストンのアセチル化、メチル化による調節が重要であることも報告している(J Clin Invest. 2012;122:529-37.)また別のグループも同様にHBV minichromosomeの存在、およびHBxによるエピジェネティクスを介したHBV複製の調節機構、すなわちHBxがプロテインホスファターゼ1の機能阻害を介して、転写因子CREBのリン酸化とヒストンのアセチル化を亢進させることによりHBV mRNAの転写を高めることを報告した(Sci Signal. 2012;5:ra1.)。しかしながら、いまだこのHBV転写制御機構そしてその意義に関しては十分には明らかにされていない。

従来エピジェネティックなHBV複製制御機構を利用した抗ウイルス療法は開発されておらず、直接cccDNAからのウイルス複製をコントロールしうる新規のB型肝炎療法につながる可能性がある。本研究では、HBVの複製におけるエピジェネティクスの役割を明らかにし、最終的には新規抗ウイルス療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究では

- (1) HBV複製におけるエピジェネティクス制御機構の解明
- (2) (1)の機序を基にしたHBV複製を抑制できる薬剤の探索

を行う。

3. 研究の方法

- (1) HBV DNAを導入したヒト肝癌細胞株HepG2.2.15細胞をヒストン脱アセチル化酵素(Histone deacetylase; HDAC)阻害剤であるTrichostatin-A(TSA)にて

刺激し、プレゲノム RNA [pregenomic RNA (pgRNA)] の転写および上清中の HBs 抗原や HBV-DNA 量を検討した。さらにウイルス複製時の cccDNA のヒストン H3/H4 のアセチル化状態およびヒストンに誘導されてくるヒストンアセチル基転移酵素 (Histone acetyl transferase; HAT) をクロマチン免疫沈降法 [Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay] にて解析した。

(2) HBV 複製を刺激するデキサメタゾン投与下にて(1)と同様の検討を行った。

(3) HAT 阻害剤の cccDNA からの HBV 転写への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) TSA の投与により HBV pgRNA の転写は容量依存性に増加し、同時に上清中の HBs 抗原や HBV-DNA 量も同様に上昇させた。また、HBV ゲノム全体をカバーするように 6 種類のプライマーを設計し ChIP assay を行ったところ、特に pgRNA の転写が開始されるコア・プロモーター領域での cccDNA ヒストン H3/H4 のアセチル化の亢進が確認された。

(2) デキサメタゾン投与は TSA よりは弱いながらも HBV pgRNA の転写及び cccDNA ヒストン H3/H4 のコア・プロモーター領域のアセチル化を誘導した。同時にデキサメタゾンは HAT である GCN5、PCAF、CBP を pgRNA の転写が開始されるコア・プロモーター領域へ誘導することが、ChIP assay にて確認された。

(3) HAT 阻害剤である CPTH2 (GCN5 阻害剤)、Garcinol (PCAF/p300 阻害剤)、C646 (p300/CBP 阻害剤) のうち、CPTH2 はデキサメタゾンにより誘導された HBV 転写を減弱させた。

以上より cccDNA のヒストンアセチル化により HBV pgRNA の転写が誘導され、複製が亢進した。さらにデキサメタゾンにより誘導される HBV 複製にも HAT の分子群、特に GCN5 によるエピジェネティックな機序が関与しており、GCN5 阻害剤による HBV 増殖抑制の可能性が示された。

従来の薬剤は HBV の逆転写酵素を標的にしてきた薬剤のみで、耐性株の出現が大きな問題であった。本研究により、HBV 増殖抑制におけるエピジェネティック制御化合物の有効性が見いだされ、HBV 再活性化治療にも有効な可能性が考えられた。しかしながら、どれくらい HBV の複製にエピジェネティクスが関与しているのか、またどのような刺激によ

りエピジェネティクス制御機構が発動されるのかなど、時間的空間的な観点からの HBV 転写の制御機構は十分に解明されたとは言えない。HBV は HCV と異なり薬物療法によるウイルスの駆除はほぼ不可能であることが知られており、本研究は临床上の重要な問題の解明に直結する可能性がある。今後は本研究をもとにエピジェネティック制御機構を利用した新規抗ウイルス療法の開発を目指したい。

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 8 件)

Yasuo Tanaka, Keisuke Tateishi, Takuma Nakatsuka, Yotaro Kudo, Ryota Takahashi, Koji Miyabayashi, Keisuke Yamamoto, Yoshinari Asaoka, Hideaki Ijichi, Ryosuke Tateishi, Junji Shibahara, Masashi Fukayama, Takeaki Ishizawa, Kiyoshi Hasegawa, Norihiro Kokudo, and Kazuhiko Koike. Sharpin promotes hepatocellular carcinoma progression via transactivation of versican expression. *Oncogenesis*. 2016;5:e277. (査読有) doi: 10.1038/oncsis.2016.76.

Keisuke Yamamoto, Keisuke Tateishi, Yotaro Kudo, Mayumi Hoshikawa, Mariko Tanaka, Takuma Nakatsuka, Hiroaki Fujiwara, Koji Miyabayashi, Ryota Takahashi, Yasuo Tanaka, Hideaki Ijichi, Yousuke Nakai, Hiroyuki Isayama, Yasuyuki Morishita, Taku Aoki, Yoshihiro Sakamoto, Kiyoshi Hasegawa, Norihiro Kokudo, Masashi Fukayama, Kazuhiko Koike. Stromal remodeling by the BET bromodomain inhibitor JQ1 suppresses the progression of human pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016;7:61469-61484. (査読有) doi: 10.18632/oncotarget.11129.

Dai Mohri, Hideaki Ijichi, Koji Miyabayashi, Ryota Takahashi, Yotaro Kudo, Takashi Sasaki, Yoshinari Asaoka, Yasuo Tanaka, Tsuneo Ikenoue, Keisuke Tateishi, Motohisa Tada, Hiroyuki Isayama, Kazuhiko Koike.

A potent therapeutics for gallbladder cancer by combinatorial inhibition of the MAPK and mTOR signaling networks. *J Gastroenterol*. 2016;51:711-21. (査読有) doi: 10.1007/s00535-015-1145-1.

Koji Uchino, Ryosuke Tateishi, Naoto Fujiwara, Tatsuya Minami, Masaya Sato,

Kenichiro Enooku, Hayato Nakagawa, Yoshinari Asaoka, Yuji Kondo, Haruhiko Yoshida, Kyoji Moriya, Shuichiro Shiina, Masao Omata and Kazuhiko Koike.
Impact of serum ferritin level on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients.
Hepato Res. 2016;46:259-68. (査読有)
doi: 10.1111/hepr.12517.

Tatsuya Minami, Ryosuke Tateishi, Masyuko Kondo, Ryo Nakagomi, Naoto Fujiwara, Masaya Sato, Koji Uchino, Kenichiro Enooku, Hayato Nakagawa, Yoshinari Asaoka, Yuji Kondo, Kyoji Moriya, Shuichiro Shiina and Kazuhiko Koike.
Serum Alpha-Fetoprotein Has High Specificity for the Early Detection of Hepatocellular Carcinoma After Hepatitis C Virus Eradication in Patients.
Medicine (Baltimore). 2015;94:e901 (査読有)
doi: 10.1097/MD.0000000000000901.

Naoto Fujiwara, Hayato Nakagawa, Yotaro Kudo¹, Ryosuke Tateishi, Masataka Taguri, Takeyuki Watadani, Ryo Nakagomi, Mayuko Kondo, Takuma Nakatsuka, Tatsuya Minami, Masaya Sato, Koji Uchino, Kenichiro Enooku, Yuji Kondo, Yoshinari Asaoka, Yasuo Tanaka, Kuni Ohtomo, Shuichiro Shiina, Kazuhiko Koike.
Sarcopenia, intramuscular fat deposition, and visceral adiposity independently predict the outcomes of hepatocellular carcinoma.
J Hepato Res. 2015;63:131-40. (査読有)
doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.031.

Hayato Nakagawa, Naoto Fujiwara, Ryosuke Tateishi, Toru Arano, Ryo Nakagomi, Mayuko Kondo, Tatsuya Minami, Masaya Sato, Koji Uchino, Kenichiro Enooku, Yoshinari Asaoka, Yuji Kondo, Shuichiro Shiina, Haruhiko Yoshida, Kazuhiko Koike.
Impact of serum levels of interleukin-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients.
J Gastroenterol Hepato Res. 2015;30:379-88. (査読有)
doi: 10.1111/jgh.12719.

Naoto Fujiwara, Ryosuke Tateishi, Hayato Nakagawa, Ryo Nakagomi, Mayuko Kondo, Tatsuya Minami, Masaya Sato, Koji Uchino, Kenichiro Enooku, Yuji Kondo, Yoshinari Asaoka, Shuichiro Shiina, Haruhiko Yoshida, Kazuhiko Koike.
Slight elevation of high-sensitivity

C-reactive protein to predict recurrence and survival in patients with early stage hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. Hepato Res. 2015;45:645-55. (査読有)
doi: 10.1111/hepr.12398.

〔学会発表〕(計 4 件)

Sayuri Morimoto, Ryosuke Muroyama, Yasuo Tanaka, Sayaka Ito, Ryo Nakagawa, Kaku Goto, Jun Arai, Yoshimi Kaise
Chemical Compounds that Bind to HBV Inhibit HBV DNA Replication
APASL2017 上海(中国)
2017年02月15日~02月19日

Yasuo Tanaka, Keisuke Tateishi, Takuma Nakatsuka, Yotaro Kudo, Yoshinari Asaoka, Ryosuke Tateishi, Kazuhiko Koike.
Sharppin cooperates with Wnt pathway to transactivate Versican expression to promote HCC invasion
APASL2016 グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)
2016年02月20日~02月24日

田中 康雄, 立石 敬介, 中塚 拓馬, 工藤 洋太郎, 浅岡 良成, 堤武也, 小池 和彦
グルココルチコイドによるエピジェネティクスを介したHBV複製制御メカニズムの解析
第51回日本肝臓学会総会 ホテル日航熊本(熊本県・熊本市)
2015年5月21日~2015年5月22日

Yasuo Tanaka, Keisuke Tateishi, Takeya Tsutsumi, Kazuhiko Koike.
Hepatitis B virus transcription is enhanced with glucocorticoid through the acetylation of covalently closed circular DNA bound histones
The 11th JSH Single Topic Conference ホテルグランヴィア広島(広島県・広島市)
2014年11月20日~11月21日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://gastro.m.u-tokyo.ac.jp/>

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/livercancer/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 康雄 (TANAKA, Yasuo)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40422290

(2) 研究分担者

立石 敬介 (TATEISHI, Keisuke)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20396948

建石 良介 (TATEISHI, Ryosuke)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：50444089

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし