

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890075

研究課題名(和文) 脱メチル化酵素 AID による慢性ウイルス感染再活性化の検討

研究課題名(英文) Role of AID as a demethylating enzymes in reactivation of chronic viral hepatitis

研究代表者

若江 亨祥 (wakae, kousho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70638303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000 円、(間接経費) 690,000 円

研究成果の概要(和文)：遺伝子改変酵素群 AID/APOBEC ファミリーのヒト B 型肝炎ウイルス(HBV) の covalently-closed-circular DNA (cccDNA) に対する DNA 脱メチル化活性の検討を目的とした。Duck Hepatitis B Virus (DHBV) 遺伝子を安定的に発現するニワトリ肝細胞株を代替モデルに用いて検討した結果、APOBEC3G が cccDNA の preC 領域のメチル化を抑制する可能性が示唆された。

同じく環状ゲノムを持つヒトパピローマウイルス(HPV)についても HPV16 陽性子宮頸部上皮細胞株を用いて検討し、同様の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to verify whether AID/APOBEC family could demethylate covalently-closed-circular DNA (cccDNA) of human Hepatitis B Virus (HBV). As an alternative experimental system, we utilized chicken hepatocyte cell line that stably express duck Hepatitis B Virus (DHBV) gene. The result suggested that APOBEC3G demethylate pre-core region of DHBV cccDNA.

We applied the hypothesis to Human Papilloma Viruses (HPVs), that possess circular double-strand DNA. This was supported by the experiment using a HPV16-positive cervical cell line.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：AID/APOBEC HBV 脱メチル化 慢性感染 B型肝炎再活性化

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎の非活動期において、B型肝炎ウイルス(HBV)ゲノムは、宿主細胞核内で covalently closed circular DNA (cccDNA)として維持されると考えられている。キャリアが免疫抑制状態になると肝炎が再燃するケースが報告されている。cccDNAを鋳型としたウイルスゲノム複製が活発となると考えられているが、その分子機構は現在でもほとんどわかっていない。

AID/APOBECファミリーは、DNAにC-to-U点突然変異を導入する遺伝子改竄酵素群である。我々のグループはHBV感染におけるAID/APOBECの病的役割に着目して研究を進めてきた。我々は申請時、TGFβがAID/APOBECの発現を誘導する事を発見していた。またAIDが実際にHBV RNAに対して変異導入活性がある事も確認していた。

一方で、AID/APOBECがDNA脱メチル化に関与する可能性が、発生学領域で注目されていた。具体的には、

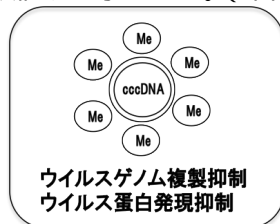
メチル化シトシンがAID/APOBECのターゲットとなりメチル化ウラシルに変換される
 メチル化ウラシルはゲノム修復機構により非メチル化シトシンに置換される事でシトシンが結果的に脱メチル化される

というメカニズムが提唱されていた。

2. 研究の目的

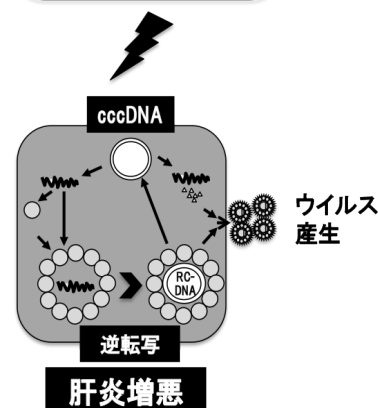
以上の背景より我々のグループはAID/APOBECのHBV cccDNAに対する脱メチル化酵素としての活性、及び慢性B型肝炎における病的役割について以下の作業仮説を立て、検証する事とした。(下図参照)

潜伏感染期



AID/APOBECによる脱メチル化

再活性化



作業仮説

cccDNAは肝炎非活動期にはDNAメチル基転移酵素(DNMT)などメチル化維持機構で作用でメチル化されサイレンシングされている。AID/APOBECの脱メチル化活性によりcccDNAのメチル化率が下がる事でウイルス遺伝子が発現し、肝炎の再活性化状態に移行する。

さらにAID/APOBECのウイルスゲノムの脱メチル化はHBVに限らず他のウイルス感染病態でも起こりうる我々は想定していた。我々はHBVと同じく発癌ウイルスであるヒトパピローマウイルス(HPV)についても、AID/APOBECの感染病態における役割の解明も目指している。HPV16陽性細胞株であるW12を用いた検討により、HPVゲノムに対してAPOBEC3はシトシン-ウラシル変換活性を持つという予備的知見を当時得ていた。またInterferon- (IFN-)によってAPOBECの発現に依存してHPV16 E2遺伝子にC-to-U変異が導入されるという知見も得ていた。さらにHPV16陽性細胞株でウイルスゲノムのメチル化を報告している先行研究も存在した。以上の事実はAPOBECがHPV感染においてウイルスゲノムのメチル化状態を変化させる可能性を示唆すると考え、APOBECのHPVゲノムに対する脱メチル化活性の有無を検討した。

3. 研究の方法

HBV

HBV全長を異所性発現させたヒト肝細胞株を用いてcccDNAを安定して維持する実験系の設立を試みたが、サザンブロット法では検出が困難であった。cccDNAの存在を確認する代替方法として、環状DNAを高感度かつ特異的に増幅するRolling Circular Amplification (RCA)の設立を試みて、実際にHBV安定発現株、及び自然感染系にて検出に成功した。現在cccDNA specific bisulfite PCRをベースにしたメチル化率の評価法について、設立を試みている。

HBV cccDNAコピー数が少ないという実験的難点をクリアすべく、cccDNAコピー数がHBVよりも高いとされるDuck Hepatitis B Virus (DHBV)を代替モデルとして導入した。実際にニワトリ肝細胞株でウイルス遺伝子を異所性発現させ、サザンブロット法にてcccDNAが検出可能であることを確認した。この系でAPOBECの発現レベルを変動させる事でcccDNAのメチル化率が相関して動くか検討を始めた。

In vivoの実験系としてHBVレプリコンプラスミドをマウスに高容量静脈注射することで肝細胞へ導入可能との報告がある。ハイドロダイナミクス法) cccDNAがマウス肝細胞でサザンブロット法、あるいはRCA法で検出可能かも現在検討している。

HPV

HPV 感染成立時のメチル化状態をまず把握する為、ウイルスゲノム全長を HPV(-) 不死化表皮細胞に導入し、どの程度のメチル化率でエピソームが維持されるか、検討している。系が成立すればさらに APOBEC の発現を変動させる事でメチル化率が相関して変動するか検討する予定である。

代替となる実験系として、申請段階で available であった、エピソーム型 HPV16 ゲノムを保持する子宮頸部異形成組織由来細胞株 W12 integrated HPV16 ゲノムを保持する CaSki の 2 つの細胞株を用いた。HPV ゲノム全長のうち Long Control Region(LCR) はウイルスのゲノム複製、遺伝子発現の調節に重要な配列である。よってウイルスゲノムのメチル化率を評価にあたり LCR を primary target とし、APOBEC の発現を変動させる事で LCR のメチル化率が相関して変動するか、バイサルファイト法にて検討した。

また In vivo でのウイルスゲノムのメチル化を評価するため、HPV16 陽性子宮頸部異形成検体を用いて、同様に LCR のメチル化を評価している。解析できた検体数が少なく結論を導いていないが、引き続きデータの蓄積に努める。

4 . 研究成果

HBV

Linear DHBV DNA が integrate されたニワトリ肝細胞株に APOBEC3A 及び 3G を異所性発現させると、cccDNA の preC 領域のメチル化の減少を認め、APOBEC3 が cccDNA のメチル化を抑制している事が示唆された。

HPV

W12 を用いて検討し、先行研究通りエピソーム型 HPV16 LCR はメチル化されている事をバイサルファイト法にて確認した。APOBEC3A 及び 3G を強制発現したところ、Long Control Region(LCR) のメチル化の低下を認め、HBV と同様 APOBEC3 が HPV ゲノムのメチル化を抑制している可能性が示唆された。現在その病的意義についてさらに検討している。

CaSki を用いて同様の検討をした結果、やはり先行研究通り LCR は高度にメチル化されている事を確認した。APOBEC3A, 3G, 3H を強制発現 APOBEC の発現を誘導する IFN γ 、IFN α 、TGF β 存在下で培養する事で LCR のメチル化率が変化するかを検討した。、ともに CaSki のメチル化率の明らかな変動を認めず、episomal 型と integrated 型で AID/APOBEC に対する感受性が異なる可能性が示唆された。

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 2 件)

Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, Monjurul AM, Kukimoto I, Muramatsu M. APOBEC3 deaminases induce hypermutation in human papillomavirus 16 DNA upon beta interferon stimulation. J Virol. 査読有 2014; 88(2):1308-17.

Liang G, Kitamura K, Wang Z, Liu G, Chowdhury S, Fu W, Koura M, Wakae K, Honjo T, Muramatsu M. RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有 2013; 110(6):2246-51.

[学会発表](計 4 件)

Kousho Wakae, Satoru Aoyama, Wang Zhe, Liu Guangyan, Ahsan Monjurul, Mieko Imayasu, Miki Koura, Kouichi Kitamura, Mitsuhiro Nakamura, Satoru Kyo, Satoru Kondo, Tomokazu Yoshizaki, Iwao Kukinmoto, Tomoaki Nishiyama, Masamichi Muramatsu, "APOBEC3 hypermutates human papillomavirus (HPV) 16 genome" 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日~6 日、神戸国際会議場・神戸国際展示場・神戸ポートピアホテル

若江 亨祥, 青山 慧, 王 哲, 喜多村 晃一, 劉 光炎, アハサン=モハメド=モンジュルル, 中村 充宏, 京 哲, 柊元 巖, 西山 智明, 村松 正道「APOBEC3 は HPV ゲノムに hypermutation を導入する」NGS 現場の会・第三回研究会、2013 年 9 月 4 日、5 日、神戸国際会議場

若江 亨祥、「APOBEC3 は HPV ゲノムに hypermutation を導入する」第 31 回生化学会北陸支部大会、2013 年 5 月 25 日、金沢大学角間キャンパス

若江 亨祥, "APOBEC proteins introduce hypermutation in Human papillomavirus-16(HPV-16) viral DNA triggered by IFN stimulation," The 4th Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science, 2012 年 11 月 7 日、金沢大学医学部記念館

6 . 研究組織

(1)研究代表者

若江 亨祥 (Wakae, Kousho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70638303

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし