

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：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790780

研究課題名(和文) 抗B型肝炎ウイルス因子AID/APOBECがもたらす発がん

研究課題名(英文) Antiviral factor AID/APOBECs and Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinogenesis

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) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：AID/APOBEC蛋白質はHBVをはじめとする様々なウイルスDNAにC-to-U変換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。本研究では核内cccDNAに着目し、DHBVモデルを用いてAID、APOBEC3G及び修復因子UNGの作用を検討した。その結果、APOBEC3Gはこれまで知られていたウイルス粒子内DNAよりも高頻度なcccDNA変異導入活性を持つこと、AIDとUNGが協働してcccDNAを切断していることを示した。これらは抗ウイルス活性であると同時に宿主細胞核内の変異導入活性及びHBV DNA断片の存在を示唆しており発がん機構解明においても重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have revealed that AID/APOBEC cytidine deaminase family members can induce C-to-U hypermutation on viral genome and restrict replication of various types of virus including HBV. Uracil residues in DNA are removed by base excision repair (BER) enzyme, uracil DNA glycosylase (UNG) when cytidine deamination is occurred in host genome. Here, we investigated whether uracil residues were removed by UNG from HBV and DHBV DNAs using in vitro cell culture system. When UNG activity was inhibited by the expression of UNG inhibitory protein (UGI), the APOBEC3G-mediated hypermutation of HBV nucleocapsid DNA was enhanced. The enhanced hypermutation by APOBEC3G and UGI was also observed in DHBV cccDNA, which was more frequent than in nucleocapsid DNA. We also found that overexpression of chicken AID caused hypermutation and reduction of DHBV cccDNA levels. These results indicate that UNG excises uracils from viral genome deaminated by AID/APOBEC protein during or after cccDNA formation.

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：ウイルス がん

1. 研究開始当初の背景

我が国の肝がん患者は 20%が B 型肝炎ウイルス (HBV) を保有しており、C 型肝炎ウイルスと並んでウイルス感染による肝がん発症率上昇が知られているが、それがなぜ起こるのかは依然として明らかではない。

DNA/RNA の塩基を脱アミノ化するデアミナーゼである 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、APOBEC3G と同じファミリーに属する 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おり、近年ではピロリ菌感染により胃で AID の発現が異所的に上昇し、胃がんのリスクをあげるといふ報告もある。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。

このように B 型肝炎の病態における AID/APOBEC の役割として、抗ウイルス活性と発がんの双方への関与が推測される。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 への AID や APOBEC3G の作用については未だ記載的な解析にとどまり、hypermutation 活性の *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る。

2. 研究の目的

本研究では AID/APOBEC と UNG の HBV ゲノム及び宿主ヒトゲノムへの関与の解明を目指した。HBV は感染後にそのウイルス DNA が核内へと移行し cccDNA と呼ばれるフォームを形成する。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重要な中間体であるが、その形成維持機構やこれを標的とする抗ウイルス因子の解析がほとんど行われていない。我々は、宿主ゲノムへの二次的影響を念頭に、核内での AID 及び APOBEC3G の働きを明らかにすることを目的とした解

析を行なった。

3. 研究の方法

ウイルス複製の再現が可能な HBV レプリコンプラスミドを用いた実験系を主に利用した。レプリコンシステムは HBV ゲノムすべてをプラスミドベクターに挿入して、このベクターをヒト肝細胞株 HepG2 やマウスに導入し、ウイルス複製を再現する実験系である。また HBV は cccDNA の産生量が極めて少なく定量的な解析が困難なため、cccDNA の解析モデルである DHBV を用いて同様のレプリコンプラスミドを用いた解析を行なった。AID もしくは APOBEC3G を強制発現し、cccDNA の定量と配列解析を行うとともに、定常的に発現している修復因子 UNG の阻害を行って、その影響を検討した。近年開発された閉環状 DNA のみを選択的に増幅する RCA 法を用いて、好感度かつ特異的に cccDNA を検出することに成功した。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。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 hypermutation 活性の検討を行なった。

4. 研究成果

本研究により、AID と APOBEC3G の脱アミノ化活性及び UNG の塩基除去活性が cccDNA に対して作用することが明らかになった。これらの研究成果はそれぞれ論文として報告した。

(1) APOBEC3G はこれまでウイルス粒子内 DNA での解析で考えられていたよりも高頻度に核内 cccDNA に対して hypermutation を導入する活性を持ち、強制発現ではウイルス複製を妨げる程の変異頻度であったが、これらは UNG によって除去され修復されていることを DHBV モデルによる解析で示した。

(2) AID においては、APOBEC3G ほどの変異導入活性は認められなかったが、UNG と共同して cccDNA の量を減少させるという結果が得られ、このウイルス DNA に strand break を引き起こしていることが示唆された。

すなわち宿主細胞の核内で変異導入活性及び HBV DNA 断片が存在する可能性があり、当初の予測通り発がんに関与するゲノム傷害の可能性が示唆される。この成果を踏まえ、現在、HBV cccDNA を用いた解析及び宿主ゲノムへのオフターゲット効果の検討を進めている。また、cccDNA は現行の治療法では除去困難で、肝炎再燃や薬剤耐性株出現の原因となることが知られている。本研究成果はこのウイルス DNA を排除するための分子機構解明にも寄与すると考える。

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: Wang Z, Wakae K, Kitamura K, Aoyama S, Liu G, Koura M, Monjurul A, Kukimoto I, Muramatsu M. "APOBEC3 Deaminases induce hypermutation in human papillomavirus type 16 DNA upon interferon-beta stimulation" *J Virol.* 88 (2): 1308-1317, 2014. 査読有り doi: 10.1128/JVI.03091-13, <http://dspace.lib.kanazawa-u.ac.jp/dspace/handle/2297/36486>

2: Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. "Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID" *J Biol Chem.* 288 (44): 31715-31727, 2013. 査読有り doi: 10.1074/jbc.M113.501122

3: Chowdhury S, Kitamura K*, Simadu M, Koura M, Muramatsu M. "Concerted action of activation-induced cytidine deaminase and uracil-DNA glycosylase reduces covalently closed circular DNA of duck hepatitis B virus" *FEBS Lett.* 587 (18): 3148-3152, 2013. (*Corresponding author) 査読有り doi: 10.1016/j.febslet.2013.07.055, <http://dspace.lib.kanazawa-u.ac.jp/dspace/handle/2297/35619>

4: Kitamura K, Wang Z, Chowdhury S, Simadu M, Koura M, Muramatsu M. "Uracil DNA glycosylase counteracts APOBEC3G-induced hypermutation of hepatitis B viral genomes: excision repair of covalently closed circular DNA" *PLoS Pathog.* 9 (5): e1003361, 2013. 査読有り doi: 10.1371/journal.ppat.1003361, <http://dspace.lib.kanazawa-u.ac.jp/dspace/handle/2297/35146>

5: Nakanishi Y, Kondo S, Wakisaka N, Tsuji A, Endo K, Muroso S, Ito M, Kitamura K, Muramatsu M, Yoshizaki T. "Role of activation-induced cytidine deaminase in the development of oral squamous cell carcinoma" *PLoS One.* 8 (4): e62066, 2013. 査読有り doi: 10.1371/journal.pone.0062066

6: 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.* 110 (6): 2246-2251, 2013. 査読有り doi: 10.1073/pnas.1221921110, <http://dspace.lib.kanazawa-u.ac.jp/dspace/handle/2297/34139>

〔学会発表〕(計11件)

1: 喜多村晃二, "B型肝炎ウイルスcccDNAを標的とするAID/APOBEC及びUNGタンパク質の抗ウイルス機構", 第36回日本分子生物学会年会, 神戸ポートピアホテル, 2013年12月3日

2: 喜多村晃二, "B型肝炎ウイルスcccDNAに対する脱アミノ化酵素AIDの作用", 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸国際会議場, 2013年11月12日

3: Kitamura K, "Concerted action of activation-induced cytidine deaminase and uracil-DNA glycosylase reduces covalently closed circular DNA of duck hepatitis B virus", 2013 International Meeting on Molecular Biology Hepatitis B Viruses, Shanghai Medical College Fudan University, Shanghai, China, 2013年10月21日 (Award of Excellence in Poster Presentation 受賞)

4: 喜多村晃一, "Concerted action of AID/APOBEC proteins and uracil-DNA glycosylase against covalently closed circular DNA of hepatitis B virus", 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 淡路夢舞台国際会議場, 2013年9月11日

5: 喜多村晃一, "塩基除去修復機構はAPOBEC3Gが引き起こすB型肝炎ウイルスゲノム高頻度変異を修復する", 第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場・マリノメッセ福岡, 2012年12月12日

6: 喜多村晃一, "塩基除去修復機構はAPOBEC3Gが引き起こすB型肝炎ウイルス変異を修復しウイルス複製に寄与する", 第60回日本ウイルス学会学術集会, グランキューブ大阪(大阪国際会議場), 2012年11月15日

7: Kitamura K, "Base excision repair counteracts the hypermutation of hepatitis B virus genomes by APOBEC3G", The 4th Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science, 金沢大学医学部記念館メモリアルホール, 2012年11月7日

8: Kitamura K, "Uracil-DNA Glycosylase

(UNG) Counteracts the Hepadnavirus Hypermutation and Restriction Induced by APOBEC3G", 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, University of Oxford Christ Church & Examination Schools Oxford, England, 2012 年 9 月 23 日

9: Kitamura K., "Base Excision Repair Pathway in Hypermutated Hepatitis B virus Genome 高頻度突然変異を受けた B 型肝炎ウイルスゲノムにおける塩基除去修復機構", 第 40 回日本免疫学会学術集会, 幕張メッセ, 2011 年 11 月 27 日

10: Kitamura K., "Contribution of Uracil DNA Glycosylase to anti-Hepatitis B virus effect of APOBEC3G", IUMS2011, XV International Congress of Virology 第 59 回日本ウイルス学会学術集会合同開催, 札幌コンベンションセンター, 2011 年 9 月 13 日

11: Kitamura K., "Uracil Excision Repair Pathway in APOBEC3G-edited Hepatitis B virus Genome", 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム 金沢国際がん生物学シンポジウム, 石川県立音楽堂, 2011 年 5 月 25 日

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