

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790654

研究課題名（和文） 抗B型肝炎ウイルス機構に誘導される発がん

研究課題名（英文） Association of anti-hepatitis B virus pathway with 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

研究成果の概要（和文）：慢性 B 型肝炎では HBV を完全に除去できれば肝硬変、肝がんへの進行が止まるが、既存の治療法では血中 HBV 量を減少させることはできても、ウイルスの核内フォームである cccDNA が細胞に維持されたままである。抗ウイルス因子として知られる APOBEC3G をはじめとする AID/APOBEC ファミリーが HBV においても発現誘導されウイルスゲノムへ変異を導入することが報告されている。本研究では核内の塩基除去修復因子である UNG がこの変異を cccDNA の段階で修復している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Human APOBEC3 proteins are reported to be antiviral factors and catalyze C-to-U conversion on hepatitis B virus (HBV) DNA by cytosine deamination. Extensive G-to-A hypermutation on plus-strand of HBV DNA has been observed from APOBEC3G-expressing hepatoma cells. We investigated whether UNG also process the hypermutated HBV genome with base excision activity. We found that the UNG inhibition caused accumulation of hypermutation in nuclear cccDNA and decrease of cytoplasmic rcDNA level. Sequencing analysis showed that some of these cccDNA mutations resulted in nonsense codons within viral polymerase coding region. These results suggest that the BER pathway triggered from nuclear UNG repairs the viral DNA mutations introduced by the antiviral APOBECs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・ゲノム・免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

DNA/RNA の塩基を脱アミノ化する deaminase である APOBEC3G は DNA/RNA に C-to-U 変異を引き起こして、HIV をはじめ様々なウイルスのゲノムに高

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。一方で、APOBEC3G と同じ APOBEC ファミリーに属する AID (Activation-induced cytidine deaminase) 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、当研究室の村松らをはじめとする複数のグループから報告されており、最近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った報告もある。慢性 B 型肝炎患者から採取した HBV ゲノムに hypermutation が起きている事実は確認されているが、HBV への APOBEC3G 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。

我々のこれまでの研究で、HBV 感染にตอบสนองして産生されるインターフェロン $\gamma$ の肝細胞刺激が HBV hypermutation を引き起こすことを見出し、その因子が APOBECs であることをつきとめた。さらに、C-to-U 変異により生じた DNA 上の U を塩基除去因子 UNG (uracil DNA glycosylase) が除去していることを阻害実験により明らかにした。UNG 作用後は DNA の切断 (strand break) と修復の経路があることが細胞核のゲノムでの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、これが 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 HBV DNA の断片化がもし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。

APOBEC3G や UNG が関与するウイルスゲノム hypermutation 機構の生理学的役割はどのウイルスにおいても未だ明確ではないが、本研究では、この機構が HBV においては肝炎進行、難治性、肝がんに関わるのではないかと病理学的な側面に着目し、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

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。HBV ゲノムは宿主因子である APOBEC3G によって hypermutation が導入されるが、本研究では HBV hypermutation 機構がウイルスのみならず宿主ゲノムへもダメージを与え、結果として肝がん発症の引き金となる可能性を検討する。

これまで、APOBEC と UNG の発現、活性を制御することで HBV hypermutation 頻度が増加することを明らかにしてきた。本研究では、さらに HBV hypermutation 機構を制御することによって、発がんリスクに関す

る因子が影響されるかの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

HBV は霊長類肝細胞にしか感染せず、培養系では HepG2 等ヒト肝細胞でも持続感染が難しいので、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アッセイを行った。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、ウイルス複製から分泌まで誘導する系である。この HBV ベクターと APOBEC3G をはじめとする hypermutation 関連因子発現ベクターを、培養肝細胞株 HepG2 に導入し、B 型肝炎モデル実験系とした。

(1) HBV cccDNA の配列解析 : HBV cccDNA における UNG の関与を調べるために、レプリコンプラスミドのトランスフェクションによる HBV 安定発現 HepG2 細胞に対して、インターフェロン刺激により APOBECs を発現誘導した後、抗ウイルス剤 ラミブジンによって新たなウイルス粒子産生を停止させると同時に UGI (UNG 阻害タンパク質) により UNG 活性を阻害した。cccDNA はラミブジンで排除されずに残るので、この配列を解析し UNG 阻害における変異頻度への影響を検討した。

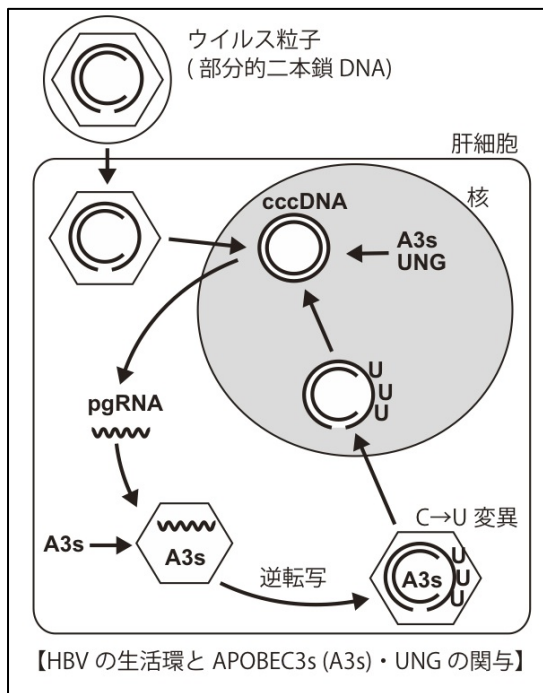
(2) UNG 局在 : 抗 HBV コアタンパク質抗体による細胞質からの免疫沈降でウイルス粒子を濃縮し、そこから抗 UNG 抗体を用いたウェスタンブロット法による検出を試みた。APOBEC3G がウイルス粒子内に存在することは報告されているのでこれをポジティブコントロールとした。さらに GFP 融合 UNG2 タンパク質の局在を、インターフェロン $\alpha$  刺激した HBV 発現肝細胞の観察により調べた。

(3) DHBV 核内 episomal DNA の精製 : Duck HBV (DHBV) をトランスフェクションした肝細胞から Hirt extraction により核内 episomal DNA を精製した。これには DHBV cccDNA とその前駆体 rcDNA が含まれ、それぞれをサザンブロット法で検出した。核内 episomal DNA から cccDNA のみを選択的に PCR で増幅し、産物の配列解析を行った。変異頻度の判定には通常の PCR とクローニングによる配列解析に加え、3D-PCR (different DNA denaturation-PCR) の手法を用いた。3D-PCR は PCR の denaturation ステップの温度を下げることによって、Tm 値の低い AT-rich な配列を選択的に増幅する

手法である。APOBECs による変異は C-to-U / G-to-A であるため、低温で増幅されるほど hypermutation 頻度が高いといえる。

#### 4. 研究成果

慢性 B 型肝炎では HBV を完全に除去できれば肝硬変、肝がんへの進行が止まるが、これには HBV cccDNA の存在が障害となる。HBV cccDNA は HBV 生活環において核内に episomal に局在する段階で、ラミブジンに代表されるウイルス逆転写酵素の阻害剤では排除されない。近年、血中 HBV 抗原陰性だが肝臓組織中に HBV-DNA が存在するオカルト HBV (潜伏性 HBV) が肝炎再燃の原因として問題視されているが、これにはウイルス粒子産生を阻止しても鋳型となる HBV cccDNA が肝細胞核内に長期に存在することが要因と考えられる。我々の予備実験で肝細胞核の UNG が HBV の核内フォームである cccDNA に作用していることを示唆する結果を得たので、さらなる解析を進めた。

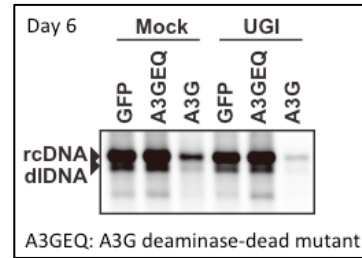


肝細胞培養系で HBV 感染を模するために、HBV 安定発現 HepG2 にインターフェロン α を投与した。これにより APOBEC タンパク質群が発現誘導され、HBV に変異が導入される。この段階でラミブジンを加えると新たなウイルス粒子産生が阻害され cccDNA のみが残る。この条件で UGI によって UNG 阻害を行ったところ、G-to-A (C-to-U の反対鎖) 変異頻度が上昇し、HBV に対する UNG 活性は核内局在型の UNG (UNG2 アイソフォーム) が担っている可能性が示唆された。

ウイルス変異導入を行う APOBEC3G はウ

イルス粒子に取り込まれ、逆転写後の 1st strand DNA に変異を導入すると考えられている。変異頻度に影響を及ぼす UNG もまたウイルス粒子に取り込まれるか否かを免疫沈降と GFP 誘導タンパク質の局在で検討したところ、いずれもウイルス粒子内への存在は認められなかった。検出感度以下の微量の UNG が粒子内で作用している可能性は否定できないが、cccDNA 配列解析の結果とも併せて、核内で UNG がウイルスゲノムに作用していると考えられた。

cccDNA への UNG の関与についてより詳細に解析するため、新たに DHBV レプリコンプラスミドを用いた実験も行った。DHBV は HBV と同じく Hepadnavirus に属するウイルスで、生活環やゲノム構造がよく似ている。in vitro 実験系では cccDNA の産生量が HBV に比べて多いため、この段階に関わる複雑な分子メカニズムの研究に利用されている。細胞質の DHBV DNA における APOBEC3G と UGI の作用を確認したところ、これまで HBV で得られた結果と同じく、hypermutation 頻度が UGI による UNG 阻害で増幅された。次に APOBEC3G と UGI の発現による cccDNA 量への影響をサザンブロット法で解析した。APOBEC3G が DHBV DNA 上に U を作り、UNG がそれを除去したのち、DNA 断片化へと進むのであれば UNG 阻害で cccDNA 量が増加すると思われるが、トランスフェクション後 3 日では UGI 有無による差は見られなかった。細胞質ウイルス粒子内 DHBV DNA 及び核内 rcDNA でも同様の結果であった。ところが、より長期の培養 (6 日) では、予測に反して UGI 存在下 (UNG 阻害) で HBV DNA (右図 rcDNA) 量の減少が見られた。



cccDNA 特異的に増幅するプライマーセットで PCR を行い配列解析したところ、多くの DHBV クローンで高頻度の hypermutation が確認された。変異率は HBV や DHBV のウイルス粒子内 DNA に比べて極めて高く、数多くのナンセンス変異が導入されていた。これらの結果から、UNG の阻害は HBV の遺伝情報を破壊し、ウイルス量を変化させるほどの変異頻度を cccDNA レベルでもたらすと考えられ、通常では UNG がウイルスゲノムに生じた変異を修復している可能性が示唆された。

以上のように、APOBEC3s の抗ウイルス活性について、ウイルス DNA 断片化ではなく、cccDNA レベルでの変異蓄積による

dysfunction を示すデータが得られた。一方これに対して UNG は細胞の核ゲノムに働くのと同様、ウイルスゲノムの塩基除去修復に寄与している可能性が示された。つまり UNG は HBV の機能維持の方向に働き、それは特に難治性の原因と考えられる cccDNA レベルで起きていることが示唆された。また、本研究の配列解析で G-to-A による YMDD 変異が検出された。YMDD モチーフは抗ウイルス剤ラミブジンがターゲットとする HBV ポリメラーゼの活性中心だが、G-to-A によりこのモチーフが YIDD となると、ラミブジン耐性となる。今回の結果では YIDD を持つクローンは同時に他の部位にもナンセンス変異を複数有していたので、ウイルス株として耐性を獲得することはなかったが、APOBEC・UNG 活性の増減によって、cccDNA が薬剤耐性株出現の鋳型になる可能性は十分にあり得ると考えられた。

今後は DHBV での結果を踏まえ、HBV レプリコンプラスミド導入マウスを用いた *in vivo* の感染モデルで、APOBECs と UNG の生体内での役割を検討する。予備実験では肝臓での導入遺伝子発現が確認できている。この実験系ではマウス肝臓内での cccDNA の形成が報告されており、今回の成果の発展を期待している。これにより APOBEC・UNG の肝炎・肝がん進行への役割を明らかにしていきたい。

以上の成果は、免疫学分野で最も歴史のある国際免疫学会議や、ゴードン会議の DNA・RNA 編集分野のカンファレンスで発表し、反響を得た。

## 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)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 喜多村晃一、Uracil DNA Glycosylase Counteracts G to A Hypermutation of Hepatitis B Virus、The 2011 Gordon Research Conference on RNA editing、2011 年 1 月 9 日～14 日、Hotel Galvez (USA)
- (2) 喜多村晃一、Base excision repair by uracil DNA glycosylase counteracts interferon-induced hypermutation on hepatitis B virus DNA、第14回国際免疫学会議、2010年8月24日、神戸国際展示場 (兵庫県)
- (3) 喜多村晃一、B 型肝炎ウイルス高頻度突然変異における塩基除去修復因子 UNG の作用、日本生化学会 北陸支部第 28 回大会、2010 年 5 月 29 日、福井大学 (福井県)
- (4) 喜多村晃一、Effects of APOBEC3G an

d Base Excision Repair on Hepatitis B Viral Genome、2009年12月3日、大阪国際会議場(大阪府)

(5) 喜多村晃一、B型肝炎ウイルスに対する APOBEC3G と塩基除去修復因子の作用、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25日、都市センターホテル(東京都)

## 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

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし