



平成30年6月22日

各報道機関文教担当記者 殿

B型肝炎ウイルス複製の鋳型となる DNA の形成に関わる酵素を発見

金沢大学医薬保健研究域医学系分子遺伝学の喜多村晃一講師，国立感染症研究所の脇田隆宇所長，村松正道部長（2017年9月30日まで金沢大学医薬保健研究域医学系分子遺伝学教授），渡士幸一主任研究官，長崎大学大学院頭頸部放射線学分野の中村卓教授らの共同研究グループは，ヒトの細胞が持つ酵素 FEN1（フラップエンドヌクレアーゼ1）（※1）が B 型肝炎ウイルス（※2）の複製に必須であるウイルス DNA（cccDNA（※3））の形成に関わることを世界で初めて明らかにしました。

B型肝炎ウイルスの cccDNA は持続感染者（※4）からの排除が困難とされているだけでなく，その形成・維持の仕組みはほとんど分かっていませんでした。ヒトの肝細胞で cccDNA 形成に関与している酵素を発見した本研究は，将来の抗ウイルス薬開発につながる新たな知見として期待されます。

本研究成果は，2018年6月21日午後2時（米国東部標準時間）に米国科学雑誌「PLOS Pathogens」に掲載されました。

【研究の背景】

B型肝炎ウイルスの持続感染者は日本国内で110～140万人と推定されています。また、B型肝炎ウイルスの持続感染は、肝硬変、肝がんへと進行していくことが懸念されます。このウイルスは細胞へ感染後、cccDNA と呼ばれる環状二本鎖 DNA (※5) を作ります。感染細胞ではこの cccDNA からウイルスが産生されますが、ワクチンや既存の抗ウイルス薬では cccDNA の除去は難しく、有効な治療法は現在のところありません。また、その形成過程の分子メカニズムもほとんど分かっていませんでした。

そこで、本研究グループは、cccDNA の前駆体 DNA (※6) に特徴的な“フラップ構造”(※7) が存在することに着目し、この構造を切断するタンパク質 FEN1 が cccDNA 形成に関わっているのではないかと考え、培養肝細胞による B型肝炎ウイルス複製モデル実験や、試験管内で cccDNA 形成を再現する新たな研究手法の開発により FEN1 の作用について検討を行いました。

【研究成果の概要】

B型肝炎ウイルスを複製する培養肝細胞について、ゲノム編集等によって FEN1 タンパク質の量を減少させる、あるいは FEN1 阻害剤を用いて機能を抑制しました。その結果、いずれの手法においても FEN1 の機能低下に伴い B型肝炎ウイルス cccDNA 量の減少が認められました。これは細胞内の FEN1 タンパク質が cccDNA 形成に寄与していることを示しています。また、FEN1 の量を少なくした細胞に、FEN1 の酵素活性（フラップ構造を除去する能力）を欠失させた変異型を導入した結果、cccDNA 量は回復しなかったことから、FEN1 の酵素活性が cccDNA 形成に関わることが示唆されました。さらに、より生体の肝細胞に近い性状を持つヒト肝臓培養細胞へ B型肝炎ウイルスを感染させ、FEN1 阻害剤を添加したところ、ウイルス産生量の低下が確認されました。これは FEN1 の酵素活性を阻害したことにより、B型肝炎ウイルス感染後にウイルスを複製する cccDNA 量が減少したためと考えられます。

次に、cccDNA の前駆体 DNA を細胞から抽出し、試験管内において FEN1 に加えて、DNA を伸長させるポリメラーゼ、DNA 末端をつなげるリガーゼの 3 つの酵素と反応させたところ、cccDNA が形成され、この cccDNA を細胞内に再び導入すると B型肝炎ウイルスが産生されました。したがって、この反応により、試験管内でも実際の cccDNA と同等のものが作られたと考えられ、前駆体 DNA のフラップ構造を FEN1 が取り除いているという分子メカニズムが示唆されました。

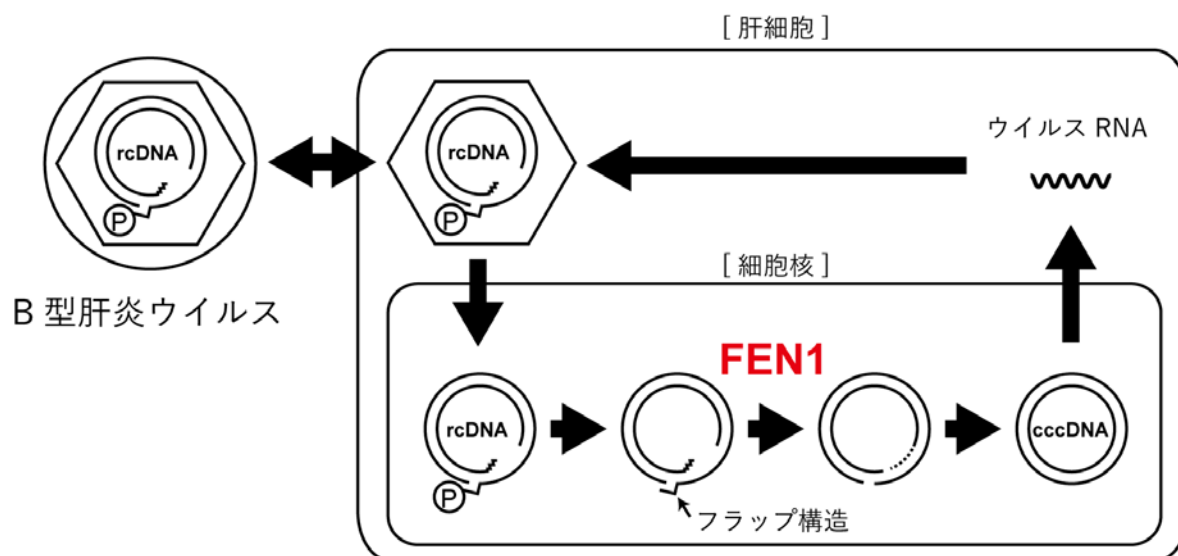


図1 B型肝炎ウイルス複製の模式図と FEN1 の関与

感染し細胞内に侵入したウイルスの DNA は核内に移行し、前駆体 DNA (rcDNA) から cccDNA が作られる。その過程のフラップ構造除去に FEN1 が関与していることが本研究で示された。

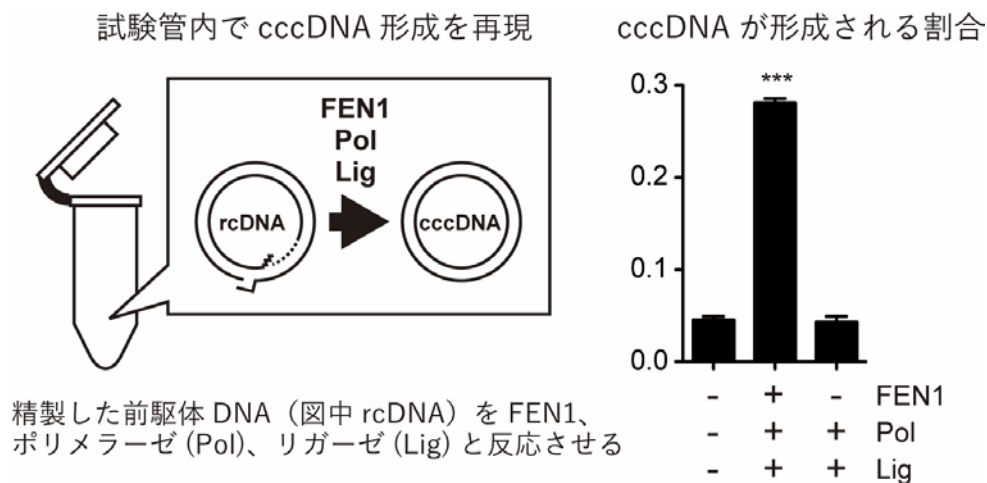


図2 試験管内による cccDNA 形成

精製した前駆体 DNA と FEN1 を含む 3 つの酵素とを反応させたところ cccDNA が形成された。

【今後の展開】

B型肝炎ウイルスは4つしか遺伝子を持たず、その複製には宿主細胞のタンパク質が利用されていることは以前から推定されていましたが、本研究によって細胞のDNA修復因子である FEN1 タンパク質がその一つであることが初めて明らかにされました。この

成果により、**FEN1 と前駆体 DNA(rcDNA)に対する FEN1 の作用機序に注目することで cccDNA 形成を抑える新規の抗ウイルス薬開発につながることを期待されます。**さらに本研究で開発した細胞外で cccDNA 形成を再現する実験方法はこれまでに例がなく、この手法は今後さらなる cccDNA 形成分子メカニズムの解明に役立つものと考えられます。

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)肝炎等克服実用化研究事業の B 型肝炎創薬実用化等研究事業である「B 型肝炎ウイルス感染を制御する宿主因子の探索と解析」(研究開発分担者 喜多村晃一)、平成 26 年度厚生労働科学研究委託費の肝炎等克服実用化研究事業である「B 型肝炎ウイルス cccDNA を標的とした宿主因子の解析」(研究代表者 喜多村晃一)ほかの支援を受けて実施されました。

【掲載論文】

雑誌名 : PLOS Pathogens

論文名 : Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus

(フラップエンドヌクレアーゼ 1 は B 型肝炎ウイルスの cccDNA 形成に関与する)

著者名 : Kouichi Kitamura, Lusheng Que, Miyuki Shimadu, Miki Koura, Yuuki Ishihara, Kousho Wakae, Takashi Nakamura, Koichi Watashi, Takaji Wakita, and Masamichi Muramatsu

(喜多村晃一, 闕路晟, 島津美幸, 小浦美樹, 石原由基, 若江亨祥, 中村卓, 渡士幸一, 脇田隆字, 村松正道)

掲載日時 : 2018 年 6 月 21 日午後 2 時 (米国東部標準時間)

URL : <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1007124>

【用語解説】

※1 FEN1

DNA フラップ構造を切断する酵素 (エンドヌクレアーゼ)。通常、細胞内では DNA 複製や DNA 修復時に機能しているが、B 型肝炎ウイルスはこの仕組みを利用していることが本研究により示された。

※2 B型肝炎ウイルス

主に血液や体液を介して感染する DNA ウイルス。C型肝炎ウイルスとともに肝臓がんの主要な原因とされる。世界保健機関(WHO)の推計では、B型肝炎ウイルス感染者は世界中で 20 億人、そのうち B型肝炎ウイルス持続感染者は 2.57 億人、さらに年間 50～70 万人が B型肝炎ウイルス関連疾患で死亡していると報告されている。

※3 cccDNA

感染後の細胞核内で前駆体 DNA(rcDNA)より形成される B型肝炎ウイルスに特徴的なゲノム DNA。ウイルスゲノム RNA や種々のウイルスタンパク質を作る mRNA 産生の鋳型となる。cccDNA が長期に存在する持続感染が成立してしまうと、ワクチンや既存の抗ウイルス薬では除去が困難である。

※4 持続感染

B型肝炎ウイルスの感染は一過性感染と持続感染に分けられ、6 ヶ月以上感染が続く場合を持続感染と呼ぶ。免疫機能が十分に発達していない乳幼児期に感染するとウイルスを排除できず、持続感染になる場合がある。

※5 環状二本鎖 DNA

ヒトを始めとする真核生物の核内 DNA は直鎖状の二本鎖 DNA として存在するが、原核生物の DNA やミトコンドリア DNA などは環状である。特に、切れ目のない閉環状 DNA は非常に安定で壊れにくいとされる。

※6 前駆体 DNA

B型肝炎ウイルスでは、ウイルス粒子内の DNA は開環状である(図 1 の rcDNA)。これが核内に移行すると、細胞のタンパク質を利用して cccDNA ができると考えられている。

※7 フラップ構造

通常の二本鎖 DNA から枝分かれし三本目の DNA 鎖が突き出したように存在する DNA の構造。通常、DNA 複製時や、DNA 修復時に形成される。

【本件に関するお問い合わせ先】

■ 研究内容に関すること

金沢大学医薬保健研究域医学系分子遺伝学

講師 喜多村 晃一(きたむら こういち)

TEL : 076-265-2176

E-mail : kkita@med.kanazawa-u.ac.jp

国立感染症研究所 ウイルス二部

部長 村松 正道（むらまつ まさみち）

TEL : 03-5285-1111（代表）

E-mail : muramatsu@nih.go.jp

【広報担当】

金沢大学総務部広報室広報係

嘉信 由紀（かしん ゆき）

TEL : 076-264-5024

E-mail : koho@adm.kanazawa-u.ac.jp

金沢大学医薬保健系事務部総務課総務係

上山 聡子（うえやま さとこ）

TEL : 076-265-2109

E-mail : t-isomu@adm.kanazawa-u.ac.jp

【AMED の事業に関すること】

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 戦略推進部 感染症研究課
（肝炎等克服実用化研究事業 担当）

〒100-0004 東京都千代田区大手町 1-7-1

TEL : 03-6870-2225 FAX : 03-6870-2243

E-mail : hepatitis@amed.go.jp