

令和元年6月25日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09033

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスのHBs抗原が関与する肝発癌機序の解明に関する研究

研究課題名(英文) Evaluation of HBsAg-associated hepatocarcinogenesis

研究代表者

加藤 孝宣 (KATO, TAKANOBU)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・室長

研究者番号：20333370

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)：本研究によりHBVの遺伝子型やHBs抗原プロモーター領域の変異がHBs抗原の細胞内蓄積に関わっていることが明らかとなった。各種遺伝子型のHBs抗原発現ベクターによる解析では、遺伝子型C株のHBs抗原が他の遺伝子型株のHBs抗原に比べ培養細胞内に蓄積しやすいことが明らかにした。遺伝子型間キメラHBs抗原発現ベクターを用いた検討により、遺伝子型C株のHBs抗原領域の第一膜貫通領域よりN末端部分のアミノ酸がこのHBs抗原の細胞内蓄積に関与していることが明らかとなった。またpre-Sプロモーター領域のアミノ酸変異に注目し、T2768Gの変異がHBs抗原の細胞内蓄積に関わっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国においてHBV感染はHCV感染に次ぐ主要な肝発癌の原因であり、肝硬変を背景として発癌するケースが多い。しかし、HBVではHCVによる肝発癌と異なり線維化の少ない慢性肝炎からの発癌も認めるため、発癌ポテンシャルはHCVより高いと考えられる。HBs抗原はウイルス粒子を構成する蛋白質であるが、その一方でL-HBs抗原を発現するトランスジェニックマウスでは肝障害とともに肝発癌の発生が報告されている。またHBVのpreS領域に欠失を持つ患者では高率に肝発癌を発症することも報告されている。本研究の成果はHBs抗原が関わる肝発癌機序の解明に繋がる知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I evaluated the accumulation of HBsAg in hepatocytes by using the HBsAg expression vectors. I prepared the HBsAg expression vectors with several clones of genotypes A, B, and C. These vectors were transfected to HepG2 cells and intra- and extra-cellular HBsAg was measured. The expression of HBsAg of genotype C clones resulted in an intra-cellular accumulation of HBsAg in comparison with other genotypes. I also evaluated the effects of polymorphisms at the promoter region of HBsAg. I prepared the HBsAg expression vector harboring the amino acid polymorphisms in the promoter region of HBsAg. The amino acid substitution of T2768G was associated with the accumulation of HBsAg. These observations may explain the HBsAg-associated hepatocarcinogenesis.

研究分野：肝臓学

キーワード：HBV HBsAg HCC

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国において HBV 感染は C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染に次ぐ主要な肝癌の原因であり、HCV 同様に肝硬変を背景として発癌するケースが多い。しかし、HBV では HCV による肝癌と異なり線維化の少ない慢性肝炎からの発癌も認めるため、発癌に関わるポテンシャルは HCV より高いと考えられる。

HBV が関わる肝発癌機序として、そのゲノムの宿主ゲノムへの組み込みや、X 遺伝子・preS/S 遺伝子など HBV 関連蛋白質の影響が考えられている。HBV ゲノムの組み込みについては、HBV 陽性肝癌の約 80% に認めるとの報告もあるが、その組み込みはランダムであり、必ずしも癌遺伝子や癌抑制遺伝子の周辺に組み込まれるわけではない。そのため、その肝発癌への関与はあまり大きくないと考えられている。X 遺伝子については、この遺伝子を発現するトランスジェニックマウスでの肝癌発生が報告されている。X 遺伝子は他の遺伝子発現を活性化する転写活性化能を持ち、癌抑制遺伝子である p53 を含む多くの宿主遺伝子と相互作用することで、その機能を阻害することが報告されており、肝発癌への強い関与が疑われる。しかし、この X 遺伝子単独の作用だけでは肝発癌機序は十分説明できない。

preS/S 遺伝子はエンベロープとなる 3 種類の HBs 抗原 (L 蛋白質、M 蛋白質、S 蛋白質) をコードする遺伝子である。これらの HBs 抗原はウイルス粒子を構成する蛋白質であるが、その一方で L 蛋白質を発現するトランスジェニックマウスでは肝障害とともに肝癌の発生が報告されている。また preS 領域の一部の欠失は血中の HBs 抗原量を低下させ、HBs 抗原の肝細胞内への蓄積を誘導することが知られており、この preS 領域に欠失を持つ患者では高率に肝癌を発症することも報告されている。以上のような知見から、preS/S 遺伝子が関与する肝発癌機序が存在することが推定されるが HBx 遺伝子に比べあまり多くの検討がなされていない。

2. 研究の目的

本研究は B 型肝炎ウイルス (HBV) が関わる肝発癌機序を HBs 抗原の蓄積の面から明らかにしようとするものである。HBs 抗原の蓄積はトランスジェニックマウスでの検討などから肝発癌に関わる因子として捉えられており、S 領域の遺伝子変異や preS 領域の欠失により HBs 抗原の細胞内蓄積が起こることが報告されている。しかし、HBs 抗原が直接関わる肝発癌機序については未だ不明な部分が多い。本研究により、肝発癌のリスクとなる HBV ゲノムの特徴や、直接寄与する宿主因子が明らかになれば、発癌の高リスク群の囲い込みや発癌抑制を目的とした治療法の開発が可能となり、我が国の肝癌発症率の低下や治療費削減に貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

我々は、国内の急性 B 型肝炎症例における HBV ゲノムの塩基配列を検討し、a 抗原決定領域および Major Hydrophilic Region にいくつかの変異を同定した。これらの変異を持つ株の HBs 抗原を発現するベクターを作製し、HepG2 細胞に導入したのちに培養上清中と細胞内の HBs 抗原量を測定したところ、株により培養細胞内と上清中の HBs 抗原の存在比が異なっていた。これらの株の中で細胞内での HBs 抗原量に比べ上清中の HBs 抗原量が低いものでは、培養細胞内に HBs 抗原が蓄積しているものと考えられる。そこで、本研究では HBs 抗原発現ベクターを用いて培養細胞に導入し、HBs 抗原の蓄積に関わる preS/S 領域の変異や欠失など HBV ゲノムの変異を同定する。

4. 研究成果

まず、HBV の遺伝子型が肝発癌に与える影響の違いに注目し、国内で主に検出される遺伝子型株の HBs 抗原の細胞内蓄積について検討を行った。遺伝子型 A, B, C 株の HBs 抗原発現ベク

ターをそれぞれ数クローンずつ作製し、培養細胞に導入後した後に細胞内と上清中の HBs 抗原量を測定した。培養細胞内と上清中の HBs 抗原量の比を見ることで HBs 抗原の細胞内蓄積を評価した。その結果、遺伝子型 C 株の HBs 抗原は遺伝子型 A 株及び B 株の HBs 抗原に比べ培養細胞内に蓄積することが明らかになった。そこで、この遺伝子型 C 株の HBs 抗原領域の細胞内蓄積に關与している場所を同定するため、遺伝子型 A 株、B 株のコンセンサス配列と、遺伝子型 C 株のコンセンサス配列のキメラ HBs 抗原発現ベクターを作製し、HBs 抗原の細胞内蓄積の評価を行った。その結果、遺伝子型 C 株の HBs 抗原領域の第一膜貫通領域より N 末端部分のアミノ酸がこの HBs 抗原の細胞内蓄積に關与していることが明らかとなった。

さらに HBs のプロモーター領域の塩基配列について検討を行った。HBs 抗原の細胞内蓄積を認める HBV 株について、その全長遺伝子配列について検討したところ、pre-S プロモーター領域に特徴的な変異 (T2768G、T2552G) を認めた。そこで、これらの変異を HBs 抗原発現ベクターに挿入し、HBs 抗原の発現状態を解析した。その結果、プロモーター領域への T2552G の変異の挿入では HBs 抗原の発現に影響を与えなかったが、T2768G の変異の挿入により HBs 抗原の細胞内への蓄積が観察された。以上の結果から、HBs 抗原の細胞内蓄積には HBs 領域のアミノ酸配列ではなく、プロモーター領域の変異が關与している可能性があると考えられた。

また、国内の急性 B 型肝炎症例から得られた HBV ゲノムの s 抗原領域の塩基配列を用い、これらの株の HBs 抗原を発現するベクターを作製した。これらの発現ベクターを HepG2 細胞に導入し、培養上清中と細胞内の HBs 抗原量を測定したところ、株により培養細胞内と上清中の HBs 抗原の発現比率が異なり HBs 抗原量に比べ上清中の HBs 抗原量が低いものでは、培養細胞内に HBs 抗原が蓄積しているものと考えられた。そこで、これらの HBV 株の s 抗原領域の配列を比較し、HBs 抗原の細胞内蓄積に影響を与える配列について検討を行ったが、特徴的なアミノ酸配列は同定されなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。