

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15426

研究課題名(和文) 包括的1細胞遺伝子発現解析を用いたB型肝炎ウイルス感染機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of HBV infection using single cell transcriptome analysis

研究代表者

本多 政夫 (HONDA, Masao)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：00272980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)： B型肝炎組織から樹立した新規肝癌細胞KM細胞を用いてHBV陽性細胞で発現上昇する2遺伝子を同定した。その2遺伝子の発現抑制によりcccDNAを抑制し、エンテカビルとの併用で95%以上のcccDNAの抑制を認めた。NTCP発現HepG2細胞で2遺伝子をノックアウトした細胞、キメラマウス由来初代肝細胞(PXB)、及びレンチウイルス発現系にて2遺伝子を過剰発現した細胞を樹立しHBVの複製を評価した。2遺伝子のノックアウト細胞ではHBV-DNA、cccDNA、pgRNAの低下、過剰発現細胞ではそれらの増加を認めた。

研究成果の概要(英文)： We identified two essential host genes for HBV replication by using single cell transcriptome analysis of KM cells that were established from a HCC tissue derived from a patient with chronic hepatitis B. Repression of two genes reduced cccDNA, and by the combination of ETV, more than 95% reduction of cccDNA was obtained. By using HepG2-NTCP cells in which two genes were knocked down, primary human hepatocytes (PXB) and HepG2-NTCP cells in which two genes were overexpressed by lentivirus system, we showed HBV-DNA, cccDNA and pgRNA were substantially changed by the expression of two genes.

研究分野：肝臓病学

キーワード：ウイルス 遺伝子 感染症 発現制御

1. 研究開始当初の背景

B 型慢性肝炎 (CHB) に対する現行の治療のみではウイルスを完全に排除させることはできない。また、免疫抑制状態下での HBV の再活性化や重症肝炎の発症も大きな問題である。HBV 感染症の制御には HBV の複製抑制に止まらず、HBV の完全排除が望まれる。

2. 研究の目的

独自に開発した包括的 1 細胞遺伝子発現解析法 (特願 2014 - 095011) と B 型肝炎組織から新規樹立した HBV 陽性 KM 細胞株を用いて HBV 持続感染に必要な宿主遺伝子を同定し HBV 感染症の新たな治療法の確立のための基盤的研究を行うことを目的とする。また、HBV 感染の様々な病態 (慢性肝炎・キャリアー・既往感染など) の肝組織を用いて包括的 1 細胞遺伝子発現解析を行い、これまで不明とされていた HBV 潜伏感染細胞の同定と感染様式の実態を明らかにする。

3. 研究の方法

B 型肝炎組織から申請者らが樹立した新規肝癌細胞 KM 細胞を用いて包括的 1 細胞遺伝子発現解析を実施したところ、3000 個の細胞中 1 細胞で HBV の mRNA を発現していた。HBV 陽性細胞で発現上昇する遺伝子を同定し shRNA 発現レンチウイルスによる機能的な遺伝子を絞り込み 2 遺伝子を同定した。その 2 遺伝子はそれぞれ単独の発現抑制により cccDNA を抑制し、エンテカビルとの併用で 95%以上の cccDNA の抑制を認めた。しかしながらこれら 2 遺伝子の HBV 複製機構における役割は不明である。

HepAD38 細胞、NTCP 過剰発現細胞 (HepG2-hNTCP-C4)、キメラマウス由来初代肝細胞 (PXB)、HBV 感染粒子を用いて、同定した 2 遺伝子が HBV のエントリー・cccDNA 産生・転写・翻訳・カプシド産生・逆転写・RNA 分解・DNA 複製・アセンブリ・粒子放出のどの段階と関連するかの検討を行う。また、Crisper/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、2 遺伝子をノックアウトした細胞、及びレンチウイルス発現系にて 2 遺伝子を過剰発現した細胞を樹立し HBV の複製を評価する。さらに HBV 陽性細胞が enrichment された KM 細胞を用い、包括的 1 細胞遺伝子発現解析を実施し HBV 関連宿主因子の検証と新規宿主因子の同定を行う。

4. 研究成果

B 型肝炎組織から申請者らが樹立した新規肝癌細胞 KM 細胞を用いて包括的 1 細胞遺伝子発現解析を実施したところ、3000 個の細胞中 1 細胞で HBV の mRNA を発現していた。HBV 陽性細胞で発現上昇する遺伝子を同定し shRNA 発現レンチウイルスによる機能的な遺伝子を絞り込み 2 遺伝子を同定した。そ

の 2 遺伝子はそれぞれ単独の発現抑制により cccDNA を抑制し、エンテカビルとの併用で 95%以上の cccDNA の抑制を認めた。

NTCP 過剰発現細胞 (HepG2-hNTCP-C4)、キメラマウス由来初代肝細胞 (PXB)、Crisper/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、2 遺伝子をノックアウトした細胞、及びレンチウイルス発現系にて 2 遺伝子を過剰発現した細胞を樹立し HBV の複製を評価した。2 遺伝子のノックアウト細胞では HBV-DNA、cccDNA、pgRNA の低下、過剰発現細胞ではそれらの増加を認めた。2 遺伝子のうち一つ (遺伝子 A) はリパーゼに関する遺伝子、もう一つ (遺伝子 B) は E3 ubiquitin ligase に関する遺伝子であった。遺伝子 A は HBV のエントリーに関与していると考えられた。一方、遺伝子 B は cccDNA の維持に関与していると考えられ HBx との関連が示唆された。CHB 肝組織において遺伝子 B は核酸アナログの投与により有意に発現量の低下を認めた。

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 16 件)

すべて査読有

1. Nomura Y, Yamashita T, Oishi N, Nio K, Hayashi T, Yoshida M, Hayashi T, Hashiba T, Asahina Y, Okada H, Sunagozaka H, Takatori H, Honda M, Kaneko S. De Novo Emergence of Mesenchymal Stem-Like CD105+ Cancer Cells by Cytotoxic Agents in Human Hepatocellular Carcinoma. *Transl Oncol.* 2017 Apr;10(2):184-189. doi: 10.1016/j.tranon.2017.01.005. Epub 2017 Feb 6.
2. Matsuura K, Sawai H, Ikeo K, Ogawa S, Iio E, Isogawa M, Shimada N, Komori A, Toyoda H, Kumada T, Namisaki T, Yoshiji H, Sakamoto N, Nakagawa M, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Enomoto N, Kusakabe A, Kajiwara E, Itoh Y, Ide T, Tamori A, Matsubara M, Kawada N, Shirabe K, Tomita E, Honda M, Kaneko S, Nishina S, Suetsugu A, Hiasa Y, Watanabe H, Genda T, Sakaida I, Nishiguchi S, Takaguchi K, Tanaka E, Sugihara J, Shimada M, Kondo Y, Kawai Y, Kojima K, Nagasaki M, Tokunaga K, Tanaka Y; Japanese Genome-Wide Association Study Group for Viral Hepatitis.. Genome-wide Association Study Identifies TLL1 Variant Associated With Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology.* 2017 [Epub ahead of print], doi:10.1053/j.gastro.2017.01.041.

3. Takegoshi K, Honda M, Okada H, Takabatake R, Matsuzawa-Nagata N, Campbell JS, Nishikawa M, Shimakami T, Shirasaki T, Sakai Y, Yamashita T, Takamura T, Tanaka T, Kaneko S. Branched-chain amino acids prevent hepatic fibrosis and development of hepatocellular carcinoma in a non-alcoholic steatohepatitis mouse model. *Oncotarget*. 2017 [Epub ahead of print], doi: 10.18632/oncotarget.15304.
4. Misu H, Takayama H, Saito Y, Mita Y, Kikuchi A, Ishii KA, Chikamoto K, Kanamori T, Tajima N, Lan F, Takeshita Y, Honda M, Tanaka M, Kato S, Matsuyama N, Yoshioka Y, Iwayama K, Tokuyama K, Akazawa N, Maeda S, Takekoshi K, Matsugo S, Noguchi N, Kaneko S, Takamura T. Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of reactive oxygen species and AMP-activated protein kinase in muscle. *Nat Med*. 2017 [Epub ahead of print], doi: 10.1038/nm.4295.
5. Kawashima M, Hitomi Y, Aiba Y, Nishida N, Kojima K, Kawai Y, Nakamura H, Tanaka A, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Abe M, Nakao K, Yamagiwa S, Kaneko S, Honda M, Umemura T, Ichida T, Seike M, Sakisaka S, Harada M, Yokosuka O, Ueno Y, Senju M, Kanda T, Shibata H, Himoto T, Murata K, Miyake Y, Ebinuma H, Tani ai M, Joshita S, Nikami T, Ota H, Kouno H, Kouno H, Nakamuta M, Fukushima N, Kohjima M, Komatsu T, Komeda T, Ohara Y, Muro T, Yamashita T, Yoshizawa K, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Sugi K, Ario K, Takesaki E, Naganuma A, Mano H, Yamashita H, Matsushita K, Yamauchi K, Makita F, Nishimura H, Furuta K, Takahashi N, Kikuchi M, Masaki N, Tanaka T, Tamura S, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Komori A, Migita K, Ito M, Nagaoka S, Abiru S, Yatsushashi H, Yasunami M, Shimoda S, Harada K, Egawa H, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Takikawa H, Ishibashi H, Chayama K, Mizokami M, Nagasaki M, Tokunaga K, Nakamura M. Genome-wide association studies identify PRKCB as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population. *Hum Mol Genet*. 2017 [Epub ahead of print], doi: 10.1093/hmg/ddw406.
6. Yamane D, Selitsky SR, Shimakami T, Li Y, Zhou M, Honda M, Sethupathy P, Lemon SM. Differential hepatitis C virus RNA target site selection and host factor activities of naturally occurring miR-122 3' variants. *Nucleic Acids Res*. 2017 [Epub ahead of print], doi: 10.1093/nar/gkw1332.
7. Kawaguchi K, Honda M, Kaneko S. HBcrAg predicts hepatocellular carcinoma development: An analysis using time-dependent receiver operating characteristics. *Transl Cancer Res* 2016, 5(S2), S216-S220. doi: 10.21037/tcr.2016.08.13.
8. Terashima T, Yamashita T, Arai K, Kawaguchi K, Kitamura K, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Response to chemotherapy improved hepatic reserve for patients with hepatocellular carcinoma and Child-Pugh B cirrhosis. *Cancer Sci*. 2016, 107(9), 1263-9. doi: 10.1111/cas.12992.
9. Liu F, Shimakami T, Murai K, Shirasaki T, Funaki M, Honda M, Murakami S, Yi M, Tang H, Kaneko S. Efficient Suppression of Hepatitis C Virus Replication by Combination Treatment with miR-122 Antagonism and Direct-acting Antivirals in Cell Culture Systems. *Sci Rep*. 2016, 6, 30939. doi: 10.1038/srep30939.
10. Kawaguchi K, Honda M, Yamashita T, Okada H, Shirasaki T, Nishikawa M, Nio K, Arai K, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. Jagged1 DNA Copy Number Variation Is Associated with Poor Outcome in Liver Cancer. *Am J Pathol*. 2016, 186(8), 2055-67. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.04.011.
11. Terashima T, Yamashita T, Takata N, Nakagawa H, Toyama T, Arai K, Kitamura K, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Post-progression survival and progression-free survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated by sorafenib. *Hepatol Res*. 2016, 46(7), 650-6. doi: 10.1111/hepr.12601.
12. Takashima S, Usui S, Kurokawa K, Kitano T, Kato T, Murai H, Furusho H, Oda H, Maruyama M, Nagata Y, Usuda K, Kubota K, Takeshita Y, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Takamura M. Altered gene expression in T-cell receptor signalling in peripheral blood leucocytes in acute coronary syndrome predicts secondary coronary events. *Open Heart*. 2016, 3(1), e000400. doi: 10.1136/openhrt-2016-000400.

13. Yamashita T, Horii R, Arai K, Kawaguchi K, Kitamura K, Yamashita T, Sakai Y, Mizukoshi E, Honda M, Kaneko S. Potential efficacy of therapies targeting intrahepatic lesions after sorafenib treatment of patients with hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. 2016, 16(1), 338. doi: 10.1186/s12885-016-2380-4.
14. Sejima H, Satoh S, Dansako H, Honda M, Kaneko S, Ikeda M, Kato N. Molecular Mechanism Underlying the Suppression of CPB2 Expression Caused by Persistent Hepatitis C Virus RNA Replication. Acta Med Okayama. 2016, 70(2), 75-88. 2016.
15. Nishida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsushashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E, Takikawa Y, Ide T, Hiasa Y, Kojima H, Yamamoto K, Nakamura M, Saji H, Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, Mizokami M. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. Sci Rep. 2016, 6, 24767. doi: 10.1038/srep24767.
16. Honda M, Shirasaki T, Terashima T, Kawaguchi K, Nakamura M, Oishi N, Wang X, Shimakami T, Okada H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatitis B Virus (HBV) Core-Related Antigen During Nucleos(t)ide Analog Therapy Is Related to Intra-hepatic HBV Replication and Development of Hepatocellular Carcinoma. J Infect Dis. 2016, 213(7), 1096-106. doi: 10.1093/infdis/jiv572.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 政夫 (HONDA, Masao)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号：00272980

(2) 研究分担者

橋本 真一 (HASHIMOTO, Shinichi)
金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任教授
研究者番号：00313099

(3) 連携研究者

白崎 尚芳 (SHIRASAKI, Takayoshi)
金沢大学・保健学系・助教
研究者番号：50547180

川口 和紀 (KAWAGUCHI, Kazunori)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：90579632

(4) 研究協力者

大石 尚毅 (Oishi, Naoki)