

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03568

研究課題名(和文) ウイルスゲノム組み込みと生体機能情報のリアルタイム血中可視化による革新的肝癌制御

研究課題名(英文) Suppression of hepatocarcinogenesis based on the real-time blood-borne visualization of viral genome integration and biofunctional information

研究代表者

伊東 文生 (Fumio, Itoh)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：90223180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)DNAのヒトゲノムへの組み込みは、HBV関連肝細胞癌において重要な役割を担っている。我々は、ホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた癌組織特異的HBVゲノム組み込み部位解析法の確立に成功した。血液由来のHBV DNA組み込みヒトゲノムの診断応用のために、肝癌細胞株におけるHBV DNA組み込みヒトゲノムの放出機構を明らかにした。さらに、HBV DNA組み込みヒトゲノムおよび関連する生体機能情報のバイオセンシングの系の確立に成功した。これらの結果は、ウイルスゲノム組み込みと生体機能情報のリアルタイム血中可視化による革新的肝癌制御に応用可能な成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、採血のみでHBV DNA組み込み部位および関連する生体機能情報の可視化が可能になることにより、癌超早期診断や発癌リスク判定などの個別化医療を可能にすることから学術的意義が大きい。さらに、肝癌サバイバーやウイルス持続感染者(国内150万人)のQOL改善を通して国民の健康福祉の増進に寄与することから社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Integration of hepatitis B virus (HBV) DNA into the human genome plays an important role in HBV-related hepatocellular carcinoma. We have successfully optimized the analysis of cancer tissue specific integrated HBV DNA into human genome using formalin fixed paraffin embedded (FFPE) samples. For a diagnostic use of blood-borne HBV DNA-integrated human genome, we have characterized the molecular details of shedding of HBV DNA-integrated human genomes in liver cancer cell lines. We have also successfully developed a biosensing method of HBV DNA-integrated human genome and related biofunctional information. These results can be applied to suppression of hepatocarcinogenesis based on the real-time blood-borne visualization of viral genome integration and biofunctional information.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ウイルスゲノム組み込み HBV 生体機能情報 血液診断 肝癌

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝細胞癌は、全世界で年間 70 万人が罹患し、癌死亡原因として第 3 位である。主因のひとつである B 型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染者は国内 150 万人、世界で 4 億人といわれる。HBV の排除は困難で、HBV 関連肝癌は、癌研究の最重要課題の一つである。HBV 関連肝細胞癌の発症の主因は、HBV ゲノムがヒトゲノムに組み込まれることによる細胞の癌化である。

(2) 現状の問題点として、HBV 関連肝癌の特徴は、肝硬変に至っていない若年者においても発癌がみられ、また、内科的、外科的な癌治療後も再発リスクが高く、頻回の画像検査等によるフォローアップは、HBV 持続感染者や肝癌サバイバーに大きな負担となっている。

(3) 研究の必要性として、HBV 持続感染者や肝癌サバイバーの QOL を高めるために、癌 (初発、再発) の早期発見と予防が重要である。HBV 関連肝癌における直接的発癌機構である体細胞 HBV 組み込み部位の同定とリキッドバイオプシーを用いたその検出系の開発が急務である。

2. 研究の目的

(1) 肝細胞癌ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体から HBV ゲノムのヒトゲノムへの組み込み部位を研究代表者らの特許申請技術である G-NaVI 法 (Genome Res 2015) で同定し、血液中の循環腫瘍 DNA (ctDNA) で同部位を検出できる系を開発する。また、血清を対象にラマン分光法を用いて癌特異的シグナルの可視化と遊離 DNA、無標識循環腫瘍細胞 (CTC) の検出系を確立する。

(2) 採血のみで HBV 組み込み部位および関連する生体機能情報を可視化することにより、癌超早期診断や発癌リスク判定などの個別化医療を可能にする。これにより、肝癌サバイバーやウイルス持続感染者 (国内 150 万人) の QOL 改善を通して国民の健康福祉の増進に寄与する。

3. 研究の方法

(1) FFPE 標本を用いた癌組織特異的 HBV ゲノム組み込み部位解析法 (G-NaVI 法) の確立
クオリティチェックをパスした体細胞ゲノム DNA を用いて、HBV のピオチン化標的プローブとのハイブリダイズを行い、ピオチンと結合するストレプトアビジン磁気ビーズを用いて濃縮を行う。精製した DNA からライブラリーを調製し、次世代シーケンサーを用いて配列を決定する。配列データ解析によって検出された HBV 組み込み部位を実験的に検証する。まず、ジャンクション部位を特異的に増幅する PCR プライマーを設計し、PCR 増幅後にサンガーシーケンサーで配列決定を行う。さらに、組み込まれた HBV 配列の全長をカバーする領域をロング PCR によって増幅し、ナノポアシーケンサーを使った配列決定を行う。得られた配列データを計算機で解析し、HBV の型判定と配列上の変異の検出を試みる。

(2) G-NaVI 法とターゲットシーケンスを用いた HBV 組み込み ctDNA 検出法の確立

検体に対し、専用の DNA 抽出キットを用いて ctDNA の特徴である短い DNA 断片だけを濃縮する。分子バーコード付きターゲットシーケンスキットを用いて腫瘍組織特異的な HBV 組み込み部位のターゲットシーケンスを行う。得られた配列情報は専用のソフトウ

エアを用いて ctDNA をカウントし、前後の ctDNA 量の変化の測定を達成する。

(3) 肝癌細胞株を用いた HBV 組み込み DNA 放出機構の機能解析

親株HepG2細胞株に、HBVゲノムが遺伝子導入されたHepG2.2.15を対象とする。G-NaVI法を用いて、HBVゲノムの組み込みに関しては解析済みである。種々のアッセイ系を用いて、HBV組み込みDNAが、培養上清に放出される機序を解析する。

(4) ラマン分光法による血清の癌特異的シグナル可視化とcfDNA、無標識CTCの検出

血清を対象にラマン分光法による解析を行う。癌特異的シグナルの可視化と遊離 DNA、無標識循環腫瘍細胞 (CTC) の検出系を確立する。DNA のメチル化を伴った癌関連遊離ヌクレオソーム量などの測定も行う。

(5) 機械学習を含めたバイオインフォマティクス解析

機械学習によるHBV組み込み部位および関連する生体機能情報 (DNAメチル化など) の可視化から最適バイオマーカーによるバイオセンシングの系を確立する。

4. 研究成果

(1) HBV ゲノム組み込み部位検出アルゴリズムの開発

FFPE 検体を用いた解析を遂行すべく、線形、非線形、繰り返し配列、配列の欠損といった様々な HBV ゲノム組み込みパターンを同定できるよう HBV ゲノム組み込み部位検出ソフトウェアの改良に成功した。具体的には、シーケンシングで得られた大量の配列データから HBV 組み込み部位を検出するため、HBV とヒトゲノムのジャンクションに該当する配列を検出するソフトウェアを改良した。HBV リファレンスゲノムを取得し、全配列データを HBV リファレンスゲノムに対してマッピングを行う。次に、部分的に HBV にマッピングができた配列データをヒトリファレンスゲノムに対してマッピングを行う。このマッピング解析を効率的に行うための最適なマッピングパラメーターを探索し、ヒト-HBV のジャンクションを検出するソフトウェアを完成させた。

(2) FFPE 標本を用いた癌組織特異的 HBV ゲノム組み込み部位解析法の確立

いくつかの DNA 抽出キットを用いて、G-NaVI 法に適した抽出方法を決定した。抽出した DNA を断片化後、いくつかのキャプチャーキットを用いて、HBV ゲノムキャプチャーに最適な方法を決定した。HBV ゲノム組み込みヒト DNA を回収し、Baits を除去したのち、ロングリード次世代シーケンサーを用いて配列を決定することに成功した。次世代シーケンサーで検出された HBV 組み込み部位を増幅する PCR プライマーを設計し、サンガーシーケンサーで配列決定を行い、結果の検証を行った。

(3) 肝癌細胞株を用いた HBV 組み込み DNA 放出機構の機能解析

肝癌細胞株上清を用いたエピゲノム解析を網羅的に行った。また、HBV DNA 組み込みと関連するエピゲノム異常を明らかにした。さらに、それらのエピゲノム異常の制御機構の一部を明らかにした。

(4) 癌関連遊離ヌクレオソーム量検出法の確立

癌関連遊離ヌクレオソーム量検出法の確立を試み、その一部に成功し、HBV 組み込みとの関連も明らかにした。

(5) 最適マーカーによるバイオセンシング系確立、統合バイオインフォマティクス解析

バイオインフォマティクス解析に基づく、最適マーカーによるバイオセンシング系の確立の一部に成功した。最終的に、得られた全データをもとに、統合バイオインフォマティクス解析を行い、臨床応用に向けた基盤を作ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oikawa Ritsuko, Watanabe Yoshiyuki, Yotsuyanagi Hiroshi, Yamamoto Hiroyuki, Itoh Fumio	4. 巻 24
2. 論文標題 DNA methylation at hepatitis B virus integrants and flanking host mitochondrially encoded cytochrome C oxidase III	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2022.13544	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 及川律子、渡邊嘉行、四柳 宏、山本博幸、伊東文生
2. 発表標題 B型肝炎ウイルス組み込みおよび近傍ヒトミトコンドリア内チトクロームオキシダーゼIIIにおけるDNAメチル化
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 博幸 (Hiroyuki Yamamoto) (40332910)	聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授 (32713)	
研究分担者	渡邊 嘉行 (Yoshiyuki Watanabe) (90329243)	聖マリアンナ医科大学・医学部・講師 (32713)	
研究分担者	渡邊 綱正 (Tsunamasa Watanabe) (20338528)	聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授 (32713)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------