

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590984

研究課題名(和文)組み込みHBVをターゲットとした肝癌細胞増殖制御

研究課題名(英文)Growth control of liver cancer cells by targeting viral-host chimeric transcript resulted from hepatitis B virus integration

研究代表者

南 祐仁(Minami, Masahito)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：60326220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)は肝癌細胞において宿主のDNAに組み込まれることが知られていた。我々は、HBV組み込みが、慢性肝炎の組織にすでに存在していることを明らかにした。これらの組み込みの中には、宿主遺伝子の読み取り枠の途中に存在し、その遺伝子の発現に大きな影響を与えることが示唆された。また、HBV組み込みは3番染色体や染色体脆弱部位(common fragile sites)に統計学的に有意に存在することを明らかにした。これにより、HBV組み込みがランダムなイベントではないこと、肝発癌に先行する慢性肝炎の時期より宿主遺伝子に変異を来し、細胞の存続や癌化に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus (HBV) has been known to be integrated in the host genome in hepatocellular carcinoma. Here, we have clearly demonstrated that HBV integration occurs in chronic hepatitis tissues. These events can cause insertional mutagenesis in integrated genes and influence the transcription of the affected genes. We also found that HBV integration has favorite sites, such as chromosome 3 and common fragile sites, demonstrating that HBV integration is not a random event, but may result in some selection probably by affected genes. These findings suggest that HBV integration causes host genome mutation at early stages of chronic HBV infection preceding hepatocellular carcinoma and may be associated with persistence and carcinogenesis of affected cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学，消化器内科学・肝臓学

キーワード：肝癌 B型肝炎ウイルス

1. 研究開始当初の背景

ウイルス遺伝子の宿主細胞への組み込みは、B 型肝炎ウイルス (HBV) を始め、retrovirus 属やアデノウイルス、EB ウィルス、ヒトパピローマウイルス (HPV) など多くのウイルスで見られる現象である。ウイルス組み込みの意義は、従来、明らかではなかったが、近年、組み込まれたウイルス遺伝子が、宿主遺伝子の発現調節を修飾し、発癌や細胞のクローナルな増殖 (clonal proliferation) に関与したと考えられる例が、さまざまな動物種で多数報告されてきている。

ウイルスは自らの遺伝子を効率よく伝えていくために、癌抑制遺伝子やアポトーシスを阻害したり、細胞増殖を活性化させたりして、宿主細胞を長く存続させようとする機構を有しているが、ウイルスの組み込みも、こうした宿主細胞の維持・存続の一役を担っていることが示唆される。

HBV は肝癌の 90%以上でモノクローナルな組み込みが証明されるが、従来、その組み込み部位には一定の傾向はなく、ランダムに起こるとされていた。しかし、我々が開発した HBV-Alu PCR (Minami et al. Genomics 1995) を用いた方法など PCR を応用した技術の進歩とゲノムデータベースの充実に伴い、解析症例が増加し、HBV のヒト遺伝子近傍への組み込みは稀な現象でなく、また、Ras シグナル調節、Ca シグナル調節、細胞周期、テロメアなどに関連した遺伝子の近傍に好発することが我々を含め、複数のグループより報告されている。(Minami et al. Genomics 1995. Gozuacik et al. Oncogene 2001. Horikawa et al. J Natl Cancer Inst 2001. Paterlini-Brechot et al. Oncogene 2003. Ferber et al. Oncogene 2003. Murakami, Minami et al. Gut 2005.)

2. 研究の目的

(1) HBV 組み込みが細胞増殖に与える影響はどの程度か

HBV 組み込みが慢性 B 型肝炎においては、ほぼ全例に存在するが、一部では細胞増殖には中立的な影響しか与えない組み込みも存在する可能性がある。慢性肝炎、肝硬変、肝癌など、さまざまな肝組織で HBV 組み込みのある遺伝子を解析し、その意義をデータベースにて検索する。

(2) 得られた組み込み関連宿主遺伝子と HBV の接合部にプライマーを作成することにより、肝組織で同じ組み込みを持つ細胞がどれぐらいのコピー数存在するかを推定できる。これにより、組み込みのある遺伝子の増殖に与える影響を検討する。

(3) HBV の組み込みはランダムなイベントなのか

human papilloma virus (HPV) の組み込みは染色体脆弱部位 (common fragile sites) に後発することが in situ hybridization によ

り証明されている。我々の解析した HBV 組み込み部位の配列を利用して、HBV 組み込みがこれらの染色体脆弱部位に好発するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) B 型肝炎ウイルス陽性の肝組織 (慢性肝炎、肝硬変、及び、肝癌の癌部、非癌部) よりゲノム DNA を抽出し、HBV-Alu PCR により HBV とヒトゲノムの接合部位を増幅する。プラスミドにクローニング後、塩基配列を決定する。得られた配列をもとにデータベース解析により、細胞増殖に関連した遺伝子や、過去に HBV 組み込みの報告のある遺伝子への組み込み (common integration sites) があるかどうかを、検討する。

(2) 上記で得られたウイルス-宿主接合部にプライマーを設定し、宿主 DNA に設定したプライマーとの間で定量的 PCR を行う。これにより、ウイルス組み込みのある細胞がどれぐらいのコピー数存在するかを解析する。

(3) HBV 組み込みのあった染色体に相当する部位の YAC プローブを作成する。このプロローブを in situ hybridization 法を用いて、分裂期にある正常ヒトリンパ球上のどのような部位にそのプロローブが結合するかを解析する。染色体脆弱部位に組み込みがあることを、染色体の断裂している部位の両側にプロローブが位置することで同定ができる。

4. 研究成果

(1) HBV の組み込みが、データベース上の既知の遺伝子を中断させるような部位、あるいは既知の遺伝子の 250kb 以内の上流または下流に存在する時に遺伝子に影響を及ぼしうると判定した。我々の検討した症例の中には同一遺伝子に組み込みのある common integration sites は存在しなかった。

HBV 組み込みにより、読み込み枠 (open reading frame) の中断される遺伝子が多数同定され、それらの中から細胞増殖への関連が高そうなものとして、AXIN1, BBX, EYA3, CTNND2, ODZ2, AL713702 を選択してさらなる検討を加えた。肝癌細胞株や肝癌の癌部、非癌部でのこれらの遺伝子発現を調べたところ、AXIN1, BBX, EYA3, は癌細胞で発現が低い傾向があり、また、CTNND2 は癌細胞で発現が高い傾向があり、癌組織での細胞増殖に関連のある遺伝子であることが示唆された。

これらの遺伝子への HBV 組み込みは、慢性肝炎の組織にすでに存在していた。肝発癌に先行する時期に HBV 組み込みが明らかに存在しており、HBV 組み込みが慢性肝炎の初期の段階ですでに細胞増殖に関連した遺伝子の発現に変化を及ぼしている可能性が示唆された。

(2) 上記の遺伝子の発現コピー数は検討した一つの組織から 1-6 種類の HBV 組み込みが検出され、それらの内、コピー数が解析できたものでは、肝細胞 5000 個あたり、50 から 70

個の同一組み込みを持つクローンが存在することがわかった。肝癌においてはHBV組み込みは単一クローンであることがすでに知られており、慢性肝炎の段階では数%しか存在しないクローンが癌化に伴いクローナルに増殖するものと思われた。

(3) 上に述べたHBV組み込み部位の解析の結果、我々の症例と過去のデータベースでの解析から、HBV組み込みが染色体の3番に統計学的に好発していることが明らかになった。また、染色体脆弱部位(Common fragile sites)に組み込みの多い可能性が示唆された。

染色体脆弱部位は、細胞増殖の際にその脆弱性ゆえに、欠失、転座、姉妹染色分体交換などの染色体異常が起こりやすい領域として知られ、ヒトゲノム中に約300箇所存在する。この領域には細胞増殖に関連した遺伝子が多く、転写・翻訳が盛んであるため、上述の脆弱性が存在するとされている。すでに子宮頸癌においてHPVの組み込みがこの部位に高頻度であるということが報告されており、我々のクローンをもとに、HBVの組み込みがこの染色体脆弱部位に好発するかどうかを検討することにした。

HBV組み込みのある部位にYACプローブを設定し、in situ hybridization法で解析した。解析の可能であった20個のクローンの内、4個においてそれぞれ染色体脆弱部位1p36 (FRA1A), 2q31 (FRA2G), 3p14.2 (FRA3B), 7q22 (FRA7F)にHBV組み込みが存在していることが確認された。これはHBV組み込みがランダムであると仮定した場合より有意($p < 0.003$)に高率であった。

これらの結果によりHBV組み込みはランダムなイベントではなく、染色体の3番に好発すること、染色体脆弱部位に多く見られることがわかった。HBV組み込みによる遺伝子発現の変化が宿主細胞の増殖や存続に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

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 12 件)

- (1) Jo M, Yasui K, Kirishima T, Shima T, Niimi T, Katayama T, Mori T, Funaki J, Sumida Y, Fujii H, Takami S, Kimura H, Mitsumoto Y, Minami M, Yamaguchi K, Yoshinami N, Mizuno M, Sendo R, Tanaka S, Shintani H, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y. Efficacy and safety of sorafenib in very elderly patients aged 80 years and older with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 査読あり. 2014 Feb 14. doi: 10.1111/hepr.12308. [Epub ahead of print]
- (2) Fujii H, Itoh Y, Ohnishi N, Sakamoto

M, Ohkawara T, Sawa Y, Nishida K, Ohkawara Y, Yamaguchi K, Minami M, Okanoue T. Factors associated with the overall survival of elderly patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 査読あり. 2012 Apr 28;18(16):1926-32. doi: 10.3748/wjg.v18.i16.1926.

- (3) Yokomizo C, Yamaguchi K, Itoh Y, Nishimura T, Uemura A, Minami M, Yasui K, Mitsuyoshi H, Fujii H, Tochiki N, Nakajima T, Okanoue T, Yoshikawa T. High expression of p300 in HCC predicts shortened overall survival in association with enhanced epithelial mesenchymal transition of HCC cells. *Cancer Lett*. 査読あり. 2011 Nov 28;310(2):140-7. doi: 10.1016/j.canlet.2011.06.030. Epub 2011 Jul 1.
- (4) Jo M, Nishikawa T, Nakajima T, Okada Y, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Yasui K, Minami M, Iwai M, Kagawa K, Itoh Y, Yoshikawa T. Oxidative stress is closely associated with tumor angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 査読あり. 2011 Jun;46(6):809-21. doi: 10.1007/s00535-011-0392-z. Epub 2011 Mar 31.
- (5) 南 祐仁. 抗HBV薬 II. 抗ウイルス薬の特性と適応・使い分け 抗肝炎ウイルス薬, インターフェロン製剤. *日本臨床* 査読なし 70(4): 609-613. (2012) 2012年4月1日
- (6) 南 祐仁, 岡上 武. HBV感染症の自然史 III 血液感染するウイルス肝炎 1. B型肝炎. 化学療法の領域 査読なし 28(S-1): 146-150. (2012) 2012年4月30日
- (7) 南 祐仁. B型肝炎に対する核酸アナログ療法の現況と今後の展開. *総合臨床* 査読なし. 60(1); 87-93. (2011) 2011年1月1日
- (8) 南 祐仁, 岡上 武. Sequential therapyのエビデンス ウイルス肝炎診療の変貌: 近づく疾患克服. *肝胆膵* 査読なし. 62(2): 259-264. (2011) 2011年2月28日
- (9) 片山貴之, 南 祐仁, 吉川敏一. インタ

ーフェロン少量維持投与 good or not?
ウイルス肝炎診療の変貌：近づく疾患克服
肝胆膵 査読なし .62(2):291-296 .
(2011)2011年2月28日

- (10) 南 祐仁, 岡上 武 . B型慢性肝炎に対する治療学の進歩と展望 . 日本臨牀 査読なし . 69(4):737-741 .(2011)2011年4月1日
- (11) 岡上 武, 南 祐仁 . B型慢性肝炎に対する治療学の進歩と展望 . III . B型肝炎 B型肝炎に対する治療学の進歩 . 日本臨牀 査読なし . 69(suppl.4):469-474 .
(2011)2011年5月20日
- (12) 南 祐仁 . 核酸アナログとインターフェロンの併用療法 . 消化器内科 査読なし . 53(3):316-320 .(2011)2011年9月

〔図書〕(計 3 件)

- (1) 岡上 武, 南 祐仁 . B型慢性肝炎の治療戦略 第2章慢性肝炎の治療 . 消化器BOOK04 これでわかる!慢性肝炎の治療戦略 肝癌を防ぐためのマネジメント . 井廻道夫, 企画 . 羊土社, 東京 . pp51-55 .(2011)2011年4月25日
- (2) 飯島尋子, 南 祐仁, 他, 共著 . 肝臓専門医テキスト . 日本肝臓学会, 編 . 南江堂, 東京 . 2013年3月30日
- (3) 竹原徹郎, 田中榮司, 南 祐仁, 持田 智, 森脇久隆, 四柳 宏, 共著 . 慢性肝炎・肝硬変の診療ガイド 2013 . 日本肝臓学会, 編 . 文光堂, 東京 . 2013年4月2日

6. 研究組織

(1)研究代表者

南 祐仁 (MINAMI, Masahito)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：60326220