

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461016

研究課題名 (和文) HBV組み込みが肝発癌に果たす役割

研究課題名 (英文) Significance of HBV integration during hepatocarcinogenesis

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)・客員講師

研究者番号：60326220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、HBV感染肝細胞の遺伝子中に見られる組み込みウイルスが、細胞増殖に関連した遺伝子近傍に存在すること、染色体脆弱部位(common fragile sites)と呼ばれるゲノムの転写・翻訳が盛んな領域に組み込みの頻度が多いこと、hTERTなど複数の症例に共通の組み込み(common integration site)が存在することを明らかにした。これらのことから、HBV組み込みはランダムな現象ではなく、肝発癌に至るまでの宿主細胞の維持・存続に有利な影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated that (1) integrated HBV genomes are often located near host genomes associated with cell growth, (2) integrated HBV genomes are frequently seen in the common fragile sites that are preferentially transcribed and translated during cell cycles, and (3) some HBV-integrated genes like hTERT are found in different cases as common integration sites. These findings suggest that HBV integration is not a random event and that it can give positive effects for affected host cells to survive and proliferate during chronic inflammation state.

研究分野：肝臓病学

キーワード：B型肝炎ウイルス 肝発癌

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。

murine leukemia virus や type B leukemogenic virus などは白血球に組み込まれ白血病やリンパ腫を引き起こす可能性が示唆されている。また、jaagsiekte sheep retrovirus はヒツジの肺癌細胞の特定遺伝子に組み込みのあることが報告されている。HBV の近縁の woodchuck hepatitis virus は肝癌で N-myc 遺伝子近傍に高頻度に組み込みが見られる。

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ようなものか

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。特に、異なる個体で共通の遺伝子に組み込みが見られた場合、その組み込みは common integration site (共通組

み込み部位)と呼ばれ、肝発癌過程に強い影響を及ぼす遺伝子であることが示唆される。(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) に好発することが 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。

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。

また、我々の解析した症例の中には、同一遺伝子に組み込みのある common integration sites は存在しなかったが、hTERT 遺伝子に組み込みのある症例が存在した。この hTERT 遺伝子への組み込みは、近年、次世代シーケンシングを用いた解析などにより、複数症例で HBV の組み込みが報告されており (Sung et al. Nat Genet 2012, Fujimoto et al. Nat Genet 2012, Jiang et al. Plos One 2012, Ding et al. Plos Genet 2012, Toh et al. Carcinogenesis 2013) common integration site と考えてよい。我々の結果と次世代シーケンシングを用いた結果は、別々の手法で得られたものであり、HBV の組み込みがランダムではなく、好発部位のあることが明らかになった。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。肝発癌に数十年先行する慢性肝炎の段階から HBV 組み込みが存在し、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一定の影響を及ぼし、肝発癌に寄与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 5 件)

- (1) Okajima A, Sumida Y, Taketani H, Hara T, Seko Y, Ishiba H, Nishimura T, Umemura A, Nishikawa T, Yamaguchi K, Moriguchi M, Mitsiyoshi H, Yasui K, Minami M, Itoh Y. Liver stiffness measurement to platelet ratio index predicts the stage of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research* 2016 (in press) doi: 10.1111/hepr.12793 査読有り
- (2) Okanoue T, Shima T, Hasebe C, Karino Y, Imazeki F, Kumada T, Minami M, Imai Y, Yoshihara H, Mita E, Morikawa T, Nishiguchi S, Kawakami Y, Nomura H, Sakisaka S, Kurosaki M, Yatsushashi H, Oketani M, Kohno H, Masumoto A, Ikeda K, Kumada H. Long-term follow up of peginterferon- α 2a treatment of hepatitis B e-antigen (HBeAg) positive and HBeAg negative chronic hepatitis B patients in phase II and III studies. *Hepatology Research*. 2016 Sep;46(10):992-1001. doi: 10.1111/hepr.12638. 査読有り
- (3) 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. *Hepatology Research* 2014 Dec;44(13):1329-38. doi: 10.1111/hepr.12308. Epub 2014 Apr 2. 査読有り
- (4) Minami M. Future therapy for hepatitis B virus. *Clinical Journal of Gastroenterology*. 2015 8:167-171. doi:10.1007/s12328-015-0590-y 査読有り
- (5) 南 祐仁. HBV ゲノムのインテグレーション. *日本臨牀* 73(9): 409-413. (2015) 査読なし

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 南 祐仁,ほか共著. ウイルス肝炎の臨床像と慢性化, 肝炎ウイルスの感染様式, HBe 抗原セロコンバージョンの意義. 肝臓専門医テキスト改訂第2版. 日本肝臓学会 編. 南江堂, 東京: pp40-46, 2016.

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・客員講師

研究者番号: 60326220