

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05196

研究課題名(和文) 肝炎ウイルスの長期複製による肝がん誘発機構に関する研究

研究課題名(英文) Research on the mechanism of hepatocarcinogenesis by long-term replication of hepatitis virus

研究代表者

加藤 宣之 (Kato, Nobuyuki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40150883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：HBVやHCVの長期複製と発癌との関係を明らかにすることを目的として、以下に示す研究成果を得た。(1) HCVの長期複製により顕著に発現低下したCPB2遺伝子の発現制御にVCX2とAGR2が関わっていた。(2) ヒト不死化肝細胞株NKNT-3とヒト肝癌細胞株Li23由来でHBVに高感受性を示すサブクローン化細胞株の樹立に成功した。(3) HBV感染前後で有意な発現変動を示す数種類の遺伝子を同定した。(4) 培養細胞から産生されるexosomeを精製する方法並びにその定量法を開発した。HBV低感受性細胞から産生されるexosome量が、高感受性細胞由来の量より有意に高い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

本研究の成果は、HCVやHBV感染により高頻度に生じる肝癌の発症を未然に防ぐ方法の開発に資する知見となるので、学術的意義があるばかりでなく、難治癌の1つで我が国に多い肝癌患者に対する社会的意義も大きい。今後も継続してこの関連の研究を展開していく必要性を示す研究成果になったことは、この研究課題の大きさを物語っていると云える。

研究成果の概要(英文)：We studied to clarify the relation of long-term replication of HBV or HCV and hepatocarcinogenesis, and then obtained the following results. (1) We clarified that VCX2 and AGR2 contributed to the expression control of the CPB2 gene whose expression level was remarkably decreased by the long-term HCV replication. (2) We successfully established two cloned cell lines exhibiting high HBV susceptibility by the subcloning of human immortalized hepatocyte NKNT-3 cells and human hepatoma Li23 cells. (3) We identified several genes whose expression levels significantly changed before and after HBV infection. (4) We developed the purification and quantitative methods for exosome produced from cultured cells. We demonstrated that the amount of exosome produced from HBV insusceptible cells was significantly higher than that of HBV susceptible cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス B型肝炎ウイルス 長期HCV複製細胞 遺伝子発現変動 HBV感受性 Exosome

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

### 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)やC型肝炎ウイルス(HCV)感染は慢性肝炎を引き起こし、10年以上経過すると肝硬変そして肝がんを発症させる。B型慢性肝炎に対する抗HBV剤(各種核酸アナログ)でHBVの増殖を制御することや、C型慢性肝炎に対する抗HCV剤で80%以上の治癒が期待されている。しかしながら、これらのウイルスの増殖制御や排除に成功しても肝がんの発症率は半分程度にしか低下しない。従って、慢性肝炎の段階で既にかん化のイニシエーションが起きていると考えられる。すなわち、肝炎ウイルスの増殖が長期に及ぶと、がん化を誘導する宿主因子の不可逆的变化が一定の確率で起こるのではないかという仮説が考えられる。このような仮説を立証するには、HBVやHCVの感染増殖が長期化した細胞でがん化を誘発する不可逆的な変化が起こることを明らかにする必要がある。しかし、現状では正常肝細胞でHBVやHCVを長期に増殖させる実用的システムがなく、上記仮説を直ちに立証することは困難である。一方、研究代表者らは、ヒト肝がん細胞株(汎用されているHuH-7やオリジナルのLi23)を用いたHCV感染増殖システムや抗HCV剤の開発に携わり、これまで多くの成果を挙げてきた。また、これらのノウハウを活かしてHBVに関する研究でも成果を挙げている。さらに、オリジナルの各種ヒト不死化肝細胞株を用いたがん化に関する研究にも携わって来た。研究代表者らが独自に開発したHCV複製細胞を長期に培養し、上記仮説の立証に向けた研究を行った結果、HCVの長期複製により不可逆的に発現レベルが変動した複数の宿主遺伝子を同定することができた。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに得られたHCVに関する研究をさらに進展させるとともに研究対象をHBVにも拡げ、両者の研究結果を比較しながら上記仮説の立証を目指すことを目的とした。さらに、細胞間情報伝達機構として最近注目されているexosomeについても研究対象として、肝炎ウイルスの複製時におけるexosomeの量的質的変動についても明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、上記目的のため、以下に示す4項目を研究の主な柱とした。

(1)HCVの長期複製により顕著な不可逆的発現低下を示したCPB2遺伝子の発現制御候補遺伝子の機能解析

CPB2遺伝子の発現制御候補として得られた14遺伝子(*GPX2*, *ALDH1A1*, *AGR2*, *VCX2*, *ALB*, *SSX4*, *ANXA1*, *FGG*, *FGB*, *TFP1*, *FGL1*, *AHSG*, *CPB2*, *ZKSCAN7*)について、それぞれレトロウイルス発現ベクター(pCX4)を作成して、CPB2遺伝子の発現が低下した培養細胞(2年間継代培養したHCV複製細胞)に導入し、CPB2遺伝子の発現レベルが回復するかどうかを定量的RT-PCR法を用いて解析した。必要な場合に依りて、複数の遺伝子を共発現させ、CPB2遺伝子の発現レベルを同様に解析した。

(2)HBV高感受性ヒト肝クローン化細胞株の樹立とその性状解析および長期HBV複製細胞の作出  
ヒト不死化肝細胞株であるNKNT-3細胞(HBV受容体であるNTCPを過剰発現させている)から限界希釈法により数十個のクローン化細胞を単離し、それぞれを増殖させた後にHBV/NL(Nanoluciferase(NL)遺伝子がHBVゲノムに組み込まれているので、NL活性を測定するだけでHBVの感染増殖レベルを容易に定量できるアッセイシステムに用いられる感染性HBV)を感染させる。1-2週間培養後、最もNL活性の高い(NL活性とHBV感受性は相関している)クローン化細胞を選択した。必要に応じて、この選択法を繰り返して、NTCPを過剰発現させたHepG2細胞と同等以上のHBV感受性を有するNKNT-3由来のクローン化細胞株の樹立を試みた。ヒト肝がん由来の細胞株であるLi23細胞についても、NKNT-3細胞と同様に、HBV感受性の高いクローン化細胞株の樹立を試みた。HBV感受性が極端に異なるクローン化細胞を用いて、どのような宿主因子がHBV感受性の高低に関与しているかについても比較解析を行った。

(3)HBVの感染・複製により発現変動を示す遺伝子に関する解析

前項で得られたHBV高感受性クローン化細胞を用いて、HBVを長期に複製維持できる細胞システムの構築を試みた。また、HBV感染前と感染後(1週間)の細胞を用いたcDNAマイクロアレイ解析を行い、発現変動を示す遺伝子の同定を試みた。

(4)HBVの複製によるexosomeの産生変動に関する解析

培養細胞から産生されるExosomeを安定的に精製できる方法の開発を行った。NKNT-3細胞株由来でHBV感受性の異なる細胞におけるexosomeの産生量について解析した。また、これらの細胞にHBVを感染させexosomeの細胞間伝達機構についても解析した。

### 4. 研究成果

4項目についての研究を行い、以下に示すような成果を得た。

(1)HCVの長期複製により顕著な不可逆的発現低下を示したCPB2遺伝子の発現制御候補遺伝子の機能解析

HCVの長期複製により不可逆的に発現低下するCPB2遺伝子の発現制御候補として得られた14遺伝子について、それぞれレトロウイルス発現ベクターを作成した。作成したベクターをCPB2の発現が低下している培養細胞(2年間継代培養したHCV複製細胞)に導入し、CPB2遺伝子の発現が回復するかどうかを定量的RT-PCR法により調べた。その結果、5種類(VCX2, FGG, TFPI, AHSGおよびCPB2)の遺伝子を導入した場合に内在性のCPB2遺伝子の発現レベルが有意に高まることが分かった。この結果から、複数の遺伝子を共発現させるとさらにCPB2遺伝子の発現を回復させることができると考え、2遺伝子ごとの様々な組み合わせでレトロウイルス発現ベクターにてCPB2の発現が低下している培養細胞で共発現させCPB2遺伝子の発現が回復するかを調べた。その結果、VCX2とAGR2を共発現させた場合にCPB2遺伝子の発現がさらに上昇することを見出した。単独の遺伝子発現ではCPB2遺伝子の発現上昇効果が認められなかったAGR2遺伝子が関与していたことから、CPB2遺伝子の発現制御機構は複雑であることが示唆された。CPB2遺伝子の発現回復が完全に元のレベルに戻るわけではないので、VCX2とAGR2の他にもう1遺伝子(上出の14遺伝子より選択)を加えて3遺伝子を同時に発現させたが、VCX2とAGR2を共発現させた場合より効果的な組み合わせを見出すことはできなかった。CPB2遺伝子の発現制御遺伝子候補として得た14遺伝子以外の遺伝子が関与している可能性も否定できないことから、CPB2遺伝子の発現低下を引き起こす遺伝子群の完全解明には至らなかった。しかしながら、今回得られた結果は、CPB2遺伝子の不可逆的変化の分子機構を解明するための足がかりになるものと考えられる。

#### (2)HBV高感受性ヒト肝クローン化細胞株の樹立とその性状解析および長期HBV複製細胞の作出

ヒト不死化肝細胞株であるNKNT-3とヒト肝がん細胞株であるLi23を用いて、HBVに高感受性を示すヒト肝細胞株の樹立を目指した。本研究では、まず、NKNT-3細胞を用いた実験を先行させた。親のNKNT-3細胞から限界希釈法によりまず数十個のクローン化細胞を単離した。得られたクローン化細胞にHBV/NL(上述したように簡便にアッセイできるように分子改変された感染性HBV)を感染させ、1-2週間後の培養上清のNL活性値が親のNKNT-3細胞より数倍高く、各クローン間の比較で最も高い値を示した細胞クローン(#28)を選択した。得られた細胞クローンを1ヶ月程度継代培養後、再度、限界希釈法による細胞のサブクローニングを行った。得られたサブクローン化細胞に再度、HBV/NLを感染させ、感染性がさらに高いサブクローン化細胞(#28.3)を得た。さらに、もう一度細胞のサブクローニングを行い、HBV/NL感染に最も高い感受性を示すサブクローン化細胞(#28.3.8)を細胞株として樹立することができた。このサブクローニングの過程において、HBVに対して顕著な低感受性を示すサブクローン化細胞株(#28.3.25.13)も得られた。#28.3.8細胞にHepG2.2.15細胞由来のHBVを感染させたところ、汎用されているHepG2/NTCP細胞と同程度のHBVの複製が2週間以上維持された。その後の検討で、HBVの複製が1ヶ月程度は維持されていることを確認した。次に、ヒト肝がんLi23細胞からもNKNT-3細胞で成功した限界希釈法による細胞のクローン化を4回繰り返すことにより、HepG2/NTCP細胞と同程度あるいはそれ以上のHBV/NLに対する高い感受性を示すサブクローン化細胞(A8.15.78.10細胞)が得られ、細胞株として樹立することができた。A8.15.78.10細胞においてもHBV感染から3週間以上HBVの複製が認められることが分かった。本研究で得られたHBV高感受性細胞(#28.3.8とA8.15.78.10)やHBV低感受性細胞(#28.3.25.13)を用いた解析から、HBVに対する高感受性化は自然免疫関連因子であるSTINGの発現量が低下することにより生じることが示唆された。また、Li23細胞株由来のA8.15.78.10細胞と汎用されているHepG2/NTCP細胞に対するHBVの感染阻害剤の効果を比較したところ、rosiglitazoneの効果に大きな違いがあることを明らかにした。A8.15.78.10細胞は、抗HBV剤の正当な評価にも有用であることが分かった。本研究の期間内では、年単位のHBV複製を維持できる細胞システムの構築までには至らなかったが、本研究で得られたHBVに高感受性を示す細胞株は、今後のHBV研究を行う上での有用な手段になると期待される。

#### (3)HBVの感染・複製により発現変動を示す遺伝子に関する解析

前項で得られたNKNT-3細胞株由来の#28.3.8細胞にHepG2.2.15細胞から産生されたHBVを感染させ、感染前と感染後1週間で有意な発現変動を示す遺伝子をマイクロアレイ解析により数種類同定することができた。現在、これらの遺伝子について解析中であることから遺伝子の実名を記載することはできないが、これらの遺伝子がHBVの複製に関与している可能性がある。今後、Li23細胞株由来のA8.15.78.10細胞を用いて同様の解析を行う予定である。細胞の系統が違う両者から共通の遺伝子が得られることが期待される。また、HBV感染後、HBVの複製が長期間維持された状態におけるマイクロアレイ解析によって、さらに有益な情報が得られるものと期待される。

#### (4)HBVの複製によるexosomeの産生変動に関する解析

HBVの複製によるexosomeの産生変動を解析するために、ヒト不死化NKNT-3細胞から産生されるexosomeを安定的に精製する方法の開発を行った。様々な条件検討の結果、市販の各種精製キットを使用するよりも従来から使用されている超遠心法を改良することにより再現性良くexosomeが得られることが分かった。また、CD9やHSP70などのexosomeマーカーを用いたexosome産生量の定量法も開発した。研究項目(2)において得られたNKNT-3細胞株由来のHBV

高感受性細胞と HBV 低感受性細胞を用いて、今回開発した exosome 定量法により比較解析した結果、HBV 低感受性細胞から産生される exosome 量が HBV 高感受性細胞の場合より有意に高いことが明らかになった。また、HBV 感染により誘導された抗ウイルス活性が exosome を介して細胞間で伝達されていることを示唆する結果を得た。この点については、今後さらに検討して行く予定である。今回、HBV 感染後の長期に渡る exosome 量の詳細な定量までには至らなかったが、HBV が複製している状態における exosome の産生状況を今後明らかにできるものと期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Satoh S, Onomura D, Ueda Y, Dansako H, Honda M, Kaneko S, Kato N, Ribavirin-induced downregulation of CCAAT/enhancer-binding protein leads to suppression of lipogenesis, *Biochem. J.*、査読有、476 巻、2019、137-149.  
DOI:10.1042/BCJ20180680

Ueno M, Nogawa M, Siddiqui R, Watashi K, Wakita T, Kato N, Ikeda M, Okimura T, Isaka S, Oda T, Ariumi Y, Acidic polysaccharides isolated from marine algae inhibit the early step of viral infection, *Int. J. Biol. Macromol.*、査読有、124 巻、2019、282-290.  
DOI: 10.1016/j.ijbiomac

Dansako H, Imai H, Ueda Y, Satoh S, Shimotohno K, Kato N, High level expression of STING restricts susceptibility to HBV by mediating type III IFN induction, *FASEB Bioadv.*、査読有、1 巻、2019、67-80.  
DOI:10.1096/fba.1022

Murakami Y, Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Ojiro K, Chu P-S, Taniki N, Saito Y, Teratani T, Koda Y, Suzuki T, Saito K, Fukasawa M, Ikeda M, Kato N, Kanai T, Saito H, Dual effects of the Nrf2 inhibitor for inhibition of hepatitis C virus and hepatic cancer cells, *BMC Cancer*、査読有、18 巻、2018、680.  
DOI: 10.1186/s12885-018-4588-y

Kuwashiro T, Iwane S, Jinghe X, Matsushashi S, Eguchi Y, Anzai K, Fujimoto K, Mizuta T, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Ozaki I, Regulation of interferon signaling and HCV-RNA replication by extracellular matrix, *Int. J. Mol. Med.*、査読有、42 巻、2018、957-965.  
DOI: 10.3892/ijmm.2018.3693

Imai H, Dansako H, Ueda Y, Satoh S, Kato N, Daunorubicin, a topoisomerase II poison, suppresses viral production of hepatitis B virus by inducing cGAS-dependent innate immune response, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読有、504 巻、2018、672-678.  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.195

Ueda Y, Gu W, Dansako H, Kim HS, Yoshizaki S, Okumura N, Ishikawa T, Nishitsuji H, Kato F, Hishiki T, Satoh S, Ishii K, Masuda M, Shimotohno K, Ikeda M, Kato N, Multiple antiviral activities of the antimalarial and anti-hepatitis C drug candidates N-89 and N-251, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*、査読有、15 巻、2018、1-6.  
DOI: 10.1016/j.bbrep.2018.05.007

Dansako H, Imai H, Ueda Y, Satoh S, Wakita T, Kato N, ULBP1 is induced by hepatitis C virus infection and is the target of the NK cell-mediated innate immune response in human hepatocytes, *FEBS. Open Bio.*、査読有、8 巻、2018、361-371.  
DOI: 10.1002/2211-5463.12373

Satoh S, Mori K, Onomura D, Ueda Y, Dansako H, Honda M, Kaneko S, Ikeda M, Kato N, Ribavirin suppresses hepatic lipogenesis through inosine monophosphate dehydrogenase inhibition: involvement of adenosine monophosphate-activated protein kinase-related kinases and retinoid X receptor, *Hepatol. Commun.*、査読有、1 巻、2017、550-563.  
DOI: 10.1002/hep4.1065

Ueda Y, Dansako H, Satoh S, Kim HS, Wataya Y, Doi H, Ikeda M, Kato N, Evaluation of preclinical antimalarial drugs, which can overcome direct-acting antivirals-resistant hepatitis C viruses, using the viral reporter assay systems, *Virus Res.*、査読有、235 巻、2017、37-48.

DOI: 10.1016/j.virusres.2017.03.015

Takeda M, Ikeda M, Satoh S, Dansako H, Wakita T, Kato N, Rab13 is involved in the entry step of hepatitis C virus infection, Acta Med. Okayama、査読有、70 巻、2016、111-118.  
DOI: 10.18926/AMO/54190

Nitta S, Asahina Y, Matsuda M, Yamada N, Sugiyama R, Masaki T, Suzuki R, Kato N, Watanabe M, Wakita T, Kato T, Effects of resistance-associated NS5A mutations in hepatitis C virus on viral production and susceptibility to antiviral reagents, Sci. Rep.、査読有、6 巻、2016、34652.  
DOI: 10.1038/srep34652

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、査読有、70 巻、2016、75-88.  
DOI: 10.18926/AMO/54186

[学会発表](計 26 件)

上田 優輝, 谷 焯琳, 團迫 浩方, 金 惠淑, 吉崎 佐矢香, 奥村 暢章, 石川 知弘, 西辻 裕紀, 加藤 文博, 日紫喜 隆行, 佐藤 伸哉, 石井 孝司, 増田 道明, 下遠野 邦忠, 池田 正徳, 加藤 宣之、抗マラリア及び抗 HCV 薬候補 N-89 と N-251 が有する幅広い抗ウイルス活性、第 28 回抗ウイルス療法学会学術集会、2018 年

團迫 浩方、今井 大誉、上田 優輝、佐藤 伸哉、加藤 宣之、B 型肝炎ウイルス感染ヒト不死化肝 NKNT-3 細胞由来のエクソソーム内タンパク質の解析、第 5 回日本細胞外小胞学会、2018 年

Ueda Y, Dansako H, Satoh S, Shimotohno K, Kato N、Analysis of the new host factors necessary for susceptibility to HBV using plural human cell lines、2018 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Virus、2018 年

Imai H, Dansako H, Ueda Y, Satoh S, Kato N、Topoisomerase II inhibitor triggers cyclic GMP-AMP synthase-dependent innate immune response in human immortalized hepatocyte NKNT-3、第 66 回日本ウイルス学会、2018 年

Ueda Y, Dansako H, Satoh S, Shimotohno K, Kato N、Screening of the new host factors necessary for HBV proliferation using plural human cell lines、第 66 回日本ウイルス学会、2018 年

Dansako H, Imai H, Ueda Y, Satoh S, Shimotohno K, Kato N、Highly expression of STING restricts HBV infection by mediating the induction of type III interferon in human immortalized hepatocyte NKNT-3、第 66 回日本ウイルス学会、2018 年

Ueda Y, Dansako H, Satoh S, Shimotohno K, Kato N、Development of human hepatoma cell line, Li23-derived cells possessing high susceptibility to HBV、2017 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Virus、2017 年

Dansako H, Imai H, Ueda Y, Satoh S, Shimotohno K, Kato N、Development of HBV infection system using human immortalized hepatocyte NKNT-3 cells、第 65 回日本ウイルス学会、2017 年

平本 洸貴、團迫 浩方、上田 優輝、佐藤 伸哉、池田 正徳、加藤 宣之、全長 HCV-RNA 複製細胞における exosome 産生量の増加、第 3 回日本細胞外小胞学会、2016 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ(<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/dmb/research.html>)に研究成果を随時更新して記載した。

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：金 惠淑

ローマ字氏名：KIM Hye-Sook

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：70314664

研究分担者氏名：團迫 浩方

ローマ字氏名：DANSAKO Hiromichi

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80379841

研究分担者氏名：佐藤 伸哉

ローマ字氏名：SATO H Shinya

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：80333558

研究分担者氏名：上田 優輝

ローマ字氏名：UEDA Youki

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：90756074

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：瀬島 寛恵

ローマ字氏名：SEJIMA Hiroe

研究協力者氏名：谷 燐琳

ローマ字氏名：KOKU Irin

研究協力者氏名：小野村 大地

ローマ字氏名：ONOMURA Daichi

研究協力者氏名：平本 洸貴

ローマ字氏名：HIRAMOTO Hiroki