

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09334

研究課題名(和文) C末端欠損HBx遺伝子インテグレーションによる肝発癌・悪性化機構の検討

研究課題名(英文) Effect of truncated Hepatitis B virus X protein integration on malignant potential of HCC

研究代表者

須田 剛生 (Goki, Suda)

北海道大学・大学病院・特任助教

研究者番号：20447460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：C末端欠損HBX蛋白のインテグレーションを肝細胞癌cell lineに導入しCSCsに与える影響を検討した。C末端欠損HBX蛋白のインテグレーションを導入する事により殺細胞性抗癌剤に対して有意に、耐性となり、更に非足場依存性の腫瘍形成能が有意に上昇していた。これらのC末端欠損HBX蛋白のインテグレーションのCSCsマーカーの発現を検討するとCD44、CD133の発現上昇が確認されLTBP-1の発現が関与する事を明らかにした。C末端欠損HBX蛋白のインテグレーションを介した肝癌悪性化機構の一部に、このLTBP-1が関与している可能性があり、新たな治療ターゲットとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HBV肝癌におけるC末端欠損HBX蛋白のインテグレーションの影響は十分には明らかではなかった。今検討では、C末端欠損HBX蛋白のインテグレーションによりCSCsが高率に誘導される事、その機序としてLTBP-1が関与している事が明らかとなった。CSCsは抗癌剤耐性や、転移に関与する事が知られており、C末端欠損HBX蛋白のインテグレーションがみられる症例では肝癌悪性化が惹起されている事が想定され注意を要する事が初めて明らかとなった。更に、CSCsをターゲットとして治療を考えるうえでLTBP-1が新たな治療ターゲットとなりうる事を今研究で初めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recently GWAS about HBV-related HCC revealed that COOH-truncated HBx was integrated in host genome at high frequency. We aimed to analyze the relationship between COOH-truncated HBx expression and CSCs which is related to malignant potential. COOH-truncated HBx (truncated HBx/HepG2) shows significantly resistant to anti-tumor agent, 5-FU. Soft gel agar colony formation assay shows that truncated-HBx/HepG2 cells make significantly more colonies than control. Flow cytometry analysis reveals that truncated HBx/HepG2 cells express high levels of CD44, one of cancer stemness maker. Subsequently we investigated what factor up-regulate CD44 in truncated HBx/HepG2 cells by Human Stem Cell PCR Array (Qiagen). This PCR-array results indicated that LTBP1 is significantly up-regulated in only Truncated-HBx/HepG2. The expression level of CD44 were significantly down-regulated by siRNA knockdown of LTBP1. In sorted CD44high cells, LTBP1 were significantly up-regulated compared with CD44low cells.

研究分野：Hepatology

キーワード：HBV HCC HBx truncated HBx

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)キャリアは世界で約4億人、国内でも100万人以上存在すると推定され、肝癌の主因である。C型肝炎患者と異なり肝硬変となる前の若年からの発癌も認められHBVのホストゲノムへのインテグレーションの関与が報告されている。本邦では原発性肝癌の80%以上がHCVまたはHBV感染を背景に発症する。ウイルス肝炎では、肝臓全体の発癌ポテンシャルが高く初回治療が成功しても肝内再発率が高い。更に、抗ガン剤による治療にも抵抗性で予後不良な癌である。その為に肝細胞癌の治療抵抗性機序の解明、新規治療法の開発が必須である。

ごく最近、HBV関連肝細胞癌のホールゲノムシーケンシングの成果として、癌部に高率にHBV遺伝子のインテグレーションが起こっている事が明らかとなった。特にC末端の欠損したB型肝炎ウイルスのX蛋白が多くインテグレーションされている事が報告された(Nature Genetics 2012)。HBx蛋白は多機能蛋白であり、転写促進や、シグナル伝達活性の調節など様々な作用とウイルス増殖促進とともに発癌との強い関連が多数報告されている。C末端欠損HBxについても、全長X蛋白と同じく、様々な転写調節作用の他、全長X蛋白と比較しrasやmycのtransforming活性を増加させることが報告されている(J Hepatol 2002)。しかしながら、B型肝炎癌ホールゲノムシーケンスにて明らかとなつたC末端欠損HBxのインテグレーションの肝がんの治療抵抗性との関連については十分には明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者らはC末端欠損HBxのインテグレーションによるB型肝炎に及ぼす影響をin vitro, in vivo 実験系とともに、臨床検体を用いて検討し、B型肝炎における治療抵抗性の機序の解明、新規治療法の開発を目的とした

3. 研究の方法

C末端欠損HBx蛋白のヒトゲノムへのインテグレーションのB型肝炎がんへの影響を明らかにする為に、肝癌研究にて一般に使われるHepG2細胞にレンチウイルスベクターを用いてHBx, C末端欠損HBx恒常発現肝がん細胞を樹立し以下の検討を行った(Suda 2015 AASLD)。

4. 研究成果

(1) C末端欠損HBxゲノム発現細胞の樹立

C末端欠損HBx蛋白のヒトゲノムへのインテグレーションのB型肝炎がんへの影響を明らかにする為に、肝癌研究にて一般に使われるHepG2細胞にレンチウイルスベクターを用いてHBx, C末端欠損HBx恒常発現肝がん細胞を樹立した。全長HBx発現細胞・C末端欠損HBx蛋白発現細胞、コントロール細胞のHBx抗体による蛋白発現をウエスタンブロットにて確認した。

(2) C末端欠損HBx発現細胞は抗がん剤に耐性

HBx(HBx/HepG2), C末端欠損HBx(30HBx/HepG2)恒常発現細胞とコントロール細胞(con/HepG2)の抗ガン剤(5FU)に対する耐性について検討をしHBx, C末端欠損HBx恒常発現細胞は、有意にコントロール細胞よりも抗ガン剤に耐性である事を明らかとした。

(3) C末端欠損HBx発現細胞は非足場性腫瘍形成能が上昇する

また腫瘍形成能を評価する目的で各種細胞を用いてソフトアガー内でのコロニー形成能を評価し、C末端欠損HBx恒常発現細胞が、最も多くのコロニーを形成し非足場依存性の高い腫瘍形成能を有している事を確認した。

(4) C末端欠損HBx蛋白発現細胞ではCD44high/CD133high cancer stem like cell が上昇する

各細胞の表面マーカーを検討したところ、C末端欠損HBx恒常発現細胞においてのみ癌幹細胞マーカーであるCD133, CD44の発現上昇を認め、特にCD44の発現上昇が顕著であった。癌幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、癌組織を再構築させる能力を持ち続ける細胞と考えられている。癌再発には、癌治療に対し抵抗性の高い癌幹細胞が関与し、抗がん剤治療にても残存した癌幹細胞が再び腫瘍構成細胞を供給し腫瘍再発を来すと考えられている。そのため癌幹細胞は、腫瘍の再発転移、抗がん剤治療に関して非常に重要な役割を担っている。近年、各固形癌において臓器別癌幹細胞の存在とその表面マーカーが同定され、肝細胞癌でも同様に癌幹細胞の存

在が報告されている。C末端欠損 HBx 恒常発現細胞は、肝癌肝細胞マーカーである CD44 を高発現し、抗がん剤に耐性と高い腫瘍形成能を有する事が明らかとなり CD44 high 肝がん幹細胞を誘導する事が想定された。

(5) C末端欠損 HBx 発現細胞は、LTBP1 の発現を介して CD44high 肝がん幹細胞を誘導する

続いて、C末端欠損 HBx 発現細胞が如何に CD44high 肝がん幹細胞を誘導するかを明らかにする為に Human Stem Cell PCR Array (Qiagen)を用いて検討を行った。HBx, C末端欠損 HBx 発現細胞、コントロール細胞では stemness に関する遺伝子の発現パターンが異なり、その中で C末端欠損 HBx 発現細胞においてのみ LTBP1(Latent transforming growth factor-beta 1 binding protein)が高発現していた。ウエスタンブロットにて LTBP1 発現が、C末端欠損 HBx 発現細胞でのみ上昇している事が確認された。

更に siRNA で、LTBP1 をサイレンシングすると C末端欠損 HBx 細胞は CD44 の発現が低下する事が確認された。LTBP1 サイレシングにてよる抗がん剤感受性の変化を検討した。LTBP1 サイレシングする事により C末端欠損 HBx 発現細胞は 5-FU への感受性が回復した。以上の結果より、C末端欠損 HBx は LTBP1 の高発現を介して CD44high 肝がん幹細胞を誘導する可能性が想定された。LTBP1 は、TGF-β 結合蛋白のアイソフォームの一つで転移乳がんでの高発現、悪性度の高い malignant glioma cell で高発現が報告されている。

(6) 進行 B 型肝炎治療予測マーカーとしての LTBP1 検討

LTBP1 は分泌蛋白であり、細胞外へ分泌される。つい最近、心不全増悪時に血中 LTBP2 が上昇し悪化時のマーカーとなる事が報告された (Biomarkers. 2012)。我々は当院の倫理委員会の了承後、抗がん剤の動注療法が行われた進行 B 型肝炎症例 15 例においてレトロスペクティブに治療前の血清 LTBP1 値と治療効果の関連を検討した。LTBP1 低値群が、治療効果が高くなる傾向を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 22 件)

Hirata K, Kuwatani M, Suda G, Ishikawa M, Sugiura R, Kato S, Kawakubo K, Sakamoto N. A Novel Approach for the Genetic Analysis of Biliary Tract Cancer Specimens Obtained Through Endoscopic Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration Using Targeted Amplicon Sequencing. Clin Transl Gastroenterol. 2019 Mar;10(3):e00022. doi: 10.14309/ctg.0000000000000022 in press 査読あり

Suda G, Hasebe C, Abe M, Kurosaki M, Itakura J, Izumi N, Uchida Y, Mochida S, Haga H, Ueno Y, Abe K, Takahashi A, Ohira H, Tsukuda Y, Furuya K, Baba M, Yamamoto Y, Kobayashi T, Inoue J, Terasita K, Ohara M, Kawagishi N, Izumi T, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N; NORTE Study Group. 「Safety and efficacy of glecaprevir and pibrentasvir in Japanese hemodialysis patients with genotype 2 hepatitis C virus infection.」 J Gastroenterol. 2019 Feb 18. doi: 10.1007/s00535-019-01556-y. 査読あり

Masatsugu Ohara, Shunsuke Ohnishi, Hidetaka Hosono, Koji Yamamoto, Kohei Yuyama, Hideki Nakamura, Qingjie Fu, Osamu Maehara, Goki Suda and Naoya Sakamoto. Extracellular vesicles from amnion-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic inflammation and fibrosis in rats. Stem Cells International 2018 in press. 査読あり

Goki Suda, Masato Nakai, Takuya Sho, Megumi Kimura, Tomoe Shimazaki, Osamu Maehara, Taku Shigesawa, Kazuharu Suzuki, Akihisa Nakamura, Masatsugu Ohara, Machiko Umemura, Naoki Kawagishi, Masaru Baba, Mitsuteru Natsuizaka, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, and Naoya Sakamoto for the NORTE Study Group. Successful retreatment with glecaprevir and pibrentasvir for genotype 1 or 2 HCV infected hemodialysis patients who failed to respond to treatment with HCV NS5A inhibitor and HCV protease inhibitor: a case report. Internal medicine 2018 in press. 査読あり

Takuya Sho[¶], Goki Suda[¶], Megumi Kimura¹, Tomoe Shimazaki¹, Osamu Maehara¹, Taku Shigesawa¹, Kazuharu Suzuki¹, Akihisa Nakamura¹, Masatsugu Ohara¹, Machiko Umemura¹, Takaaki Izumi¹, Naoki Kawagishi¹, Masaru Baba², Masato Nakai¹, Mitsuteru Natsuizaka¹, Kenichi Morikawa¹, Koji Ogawa¹, and Naoya Sakamoto¹ for the NORTE Study Group. Glecaprevir and pibrentasvir for Japanese patients with human immunodeficiency virus and genotype 3 hepatitis C virus coinfection: Report of 3 cases. Internal medicine 2018 in press. (¶)

equal contribution) 査読あり

Goki Suda, Masayuki Kurosaki, Jun Itakura, Namiki Izumi, Yoshihito Uchida, Satoshi Mochida, Chitomi Hasebe, Masami Abe, Hiroaki Haga, Yoshiyuki Ueno, Ikuto Masakane, Kazumichi Abe, Atsushi Takahashi, Hiromasa Ohira, Ken Furuya, Masaru Baba, Yoshiya Yamamoto, Tomoe Kobayashi, Atsuhiko Kawakami, enichi Kumagai, Katsumi Terasita, Masatsugu Ohara, Naoki Kawagishi, Machiko Umemura, Masato Nakai, Takuya Sho, Mitsuteru Natsuizaka, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, and Naoya Sakamoto for the NORTE Study Group. Safety and efficacy of elbasvir and grazoprevir in Japanese hemodialysis patients with genotype 1b Hepatitis C infection. *J Gastroenterol.* 2018 in press 査読あり

Masatsugu Ohara, Shunsuke Ohnishi, Hidetaka Hosono, Koji Yamamoto, Qingjie Fu, Osamu Maehara, Goki Suda, Naoya Sakamoto. Palmitoylethanolamide ameliorates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats: *Frontiers in Pharmacology* 2018 in press 査読あり

Masatsugu Ohara [¶], Koji Ogawa [¶], Goki Suda [¶] *, Megumi Kimura, Osamu Maehara, Tomoe Shimazaki, Kazuharu Suzuki, Akihisa Nakamura, Machiko Umemura, Takaaki Izumi, Naoki Kawagishi, Masato Nakai, Takuya Sho, Mitsuteru Natsuizaka, Kenichi Morikawa, Shunsuke Ohnishi and Naoya Sakamoto([¶] equal contribution, *Corresponding author) *Hepatology Communications*, 2018 in press. 査読あり

Cai C, Koch B, Morikawa K, Suda G, Sakamoto N, Rueschenbaum S, Akhras S, Dietz J, Hildt E, Zeuzem S, Welsch C, Lange CM. Macrophage-Derived Extracellular Vesicles Induce Long-Lasting Immunity Against Hepatitis C Virus Which Is Blunted by Polyunsaturated Fatty Acids. *Front Immunol.* 2018 Apr 12;9:723. doi: 10.3389/fimmu.2018.00723. eCollection 2018. PMID:29706960 査読あり

Sho T [¶], Suda G [¶], , Nagasaka A, Yamamoto Y, Furuya K, Kumagai K, Uebayashi M, Terashita K, Kobayashi T, Tsunematsu I, Onodera M, Meguro T, Kimura M, Ito J, Umemura M, Izumi T, Kawagishi N, Ohara M, Ono Y, Nakai M, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N; NORTE Study Group([¶]Equal contribution). Safety and efficacy of sofosbuvir and ribavirin for genotype 2 hepatitis C Japanese patients with renal dysfunction. *Hepatol Res.* 2018 Jan 9. doi: 10.1111/hepr.13056. [Epub ahead of print] PMID:29316051 査読あり

Suda G, Ogawa K, Morikawa K, Sakamoto N. Treatment of hepatitis C in special populations. *J Gastroenterol.* 2018 Jan 3. doi: 10.1007/s00535-017-1427-x. [Epub ahead of print] Review. PMID:29299684 査読あり

Nakai M, Ogawa K, Takeda R, Ohara M, Kawagishi N, Izumi T, Umemura M, Ito J, Sho T, Suda G, Morikawa K, Sakamoto N. Increased serum C-reactive protein and decreased urinary aquaporin 2 levels are predictive of the efficacy of tolvaptan in patients with liver cirrhosis. 査読あり
Hepatol Res. 2018 Feb;48(3):E311-E319. doi: 10.1111/hepr.12988. Epub 2017 Nov 3.

Osamu Maehara [¶], Goki Suda [¶], Mitsuteru Natsuizaka, Shunsuke Ohnishi, Yoshito Komatsu, Fumiya Sato, Masato Nakai, Takuya Sho, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, Tomoe Shimazaki, Megumi Kimura, Ayaka Asano, Yoshiyuki Fujimoto, Shinya Ohashi, Shingo Kagawa, Hideaki Kinugasa, Seiji Naganuma, Kelly A. Whelan, Hiroshi Nakagawa, Koji Nakagawa, Hiroshi Takeda, Naoya Sakamoto([¶]Equal contribution) Fibroblast growth factor-2-mediated FGFR/Erk signaling supports maintenance of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2017 Oct 26;38(11):1073-1083. doi: 10.1093/carcin/bgx095. 査読あり

Suda G, Ito J, Nagasaka A, Yamamoto Y, Furuya K, Okamoto M, Terashita K, Kobayashi T, Tsunematsu I, Yoshida J, Meguro T, Ohara M, Kawagishi N, Kimura M, Umemura M, Izumi T, Tsukuda Y, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N; NORTE Study Group. Add-on effects of fluvastatin in simeprevir/pegylated-interferon/ribavirin combination therapy for patients with genotype 1 hepatitis C virus infection: A randomized controlled study. *Hepatol Res.* 2018 Feb;48(3):E146-E154. doi: 10.1111/hepr.12938. Epub 2017 Aug 10. 査読あり

Goki Suda, Norihiro Furusyo, Hidenori Toyoda, Yoshiiku Kawakami, Hiroki Ikeda, Michihiro Suzuki, Keiko Arataki, Nami Mori, Keiji Tsuji, Yoshio Katamura, Koichi Takaguchi, Toru Ishikawa1, Kunihiro Tsuji, Noritomo Shimada, Atsushi Hiraoka, Sho Yamsaki, Masato Nakai1, Takuya Sho1, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, Mineo Kudo, Atsushi Nagasaka, Ken Furuya, Yoshiya Yamamoto, Kanji Kato, Yoshiyuki Ueno, Etsuko Iio, Yasuhito Tanaka, Masayuki Kurosaki, Takashi Kumada, Kazuaki Chayama and Naoya Sakamoto. Daclatasvir and asunaprevir in hemodialysis patients with hepatitis C virus infection: a nationwide retrospective study in Japan. *J Gastroenterol.* 2018 Jan;53(1):119-128. doi: 10.1007/s00535-017-1353-y. Epub 2017 May 30. 査読あり

Naoki Kawagishi [¶], Goki Suda [¶] *, Masahiro Onozawa, Megumi Kimura, Osamu Maehara, Masatsugu Ohara, Takaaki Izumi, Machiko Umemura, Jun Ito, Masato Nakai, Takuya Sho,

Mitsuteru Natsuizaka, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, and Naoya Sakamoto (¶ Equal contribution). Comparing the risk of hepatitis B virus reactivation between direct-acting antiviral therapies and interferon-based therapies for hepatitis C. J Viral Hepat. 2017 Dec;24(12):1098-1106. doi: 10.1111/jvh.12737 査読あり

Takuya Sho, Mitsuru Nakanishi, Morikawa Kenichi, Masatsugu Ohara, Naoki Kawagishi, Takaaki Izumi, Machiko Umemura, Jun Ito, Masato Nakai, Goki Suda, Koji Ogawa, Makoto Chuma, Takashi Meguro, Michio Nakamura, Atsushi Nagasaka, Hiromasa Horimoto, Yoshiya Yamamoto, and Naoya Sakamoto. A Phase I study of combination therapy with sorafenib and 5-fluorouracil in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Drugs R D. 2017 Sep;17(3):381-388. doi: 10.1007/s40268-017-0187-7. 査読あり

Kawagishi N¶, Suda G¶, Onozawa M, Kimura M, Maehara O, Ito J, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N (¶ Equal contribution). Hepatitis B virus reactivation during hepatitis C direct-acting antiviral therapy in patients with previous HBV infection. J Hepatol. 2017 Nov;67(5):1106-1108. doi: 10.1016/j.jhep.2017.04.008. 査読あり

Takahiko Kobayashi, Junich Ishida, Yuichi Shimizu, Hiroshi Kawakami, Goki Suda, Tetsuhito Muranaka, Yoshito Komatsu, Masahiro Asaka and Naoya Sakamoto. Decreased RNA-binding motif 5 expression is associated with tumor progression in gastric cancer Tumor Biology March 2017: 1-9 査読あり

Suda G, Ogawa K, Yamamoto Y, Katagiri M, Furuya K, Kumagai K, Konno J, Kimura M, Kawagishi N, Ohara M, Umemura M, Ito J, Izumi T, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Tsubota A, Shimada N, Iio E, Tanaka Y, Sakamoto N; NORTE Study Group. Retreatment with sofosbuvir, ledipasvir, and add-on ribavirin for patients who failed daclatasvir and asunaprevir combination therapy. J Gastroenterol. 2017. Oct;52(10):1122-1129 doi: 10.1007/s00535-017-1328-z. 査読あり

⑪ Suda G, Nagasaka A, Yamamoto Y, Furuya K, Kumagai K, Kudo M, Terashita K, Kobayashi T, Tsunematsu I, Yoshida J, Meguro T, Kimura M, Ito J, Umemura M, Izumi T, Tsunematsu S, Sato F, Tsukuda Y, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N; NORTE Study Group. Safety and efficacy of daclatasvir and asunaprevir in hepatitis C virus infected patients with renal impairment. Hepatol Res. 2017 Oct;47(11):1127-1136. doi: 10.1111/hepr.12851 査読あり

⑫ Suda G, Ogawa K, Kimura M, Nakai M, Sho T, Morikawa K. Novel Treatment of Hepatitis C Virus Infection for Patients with Renal Impairment. J Clin Transl Hepatol. 2016 Dec 28;4(4):320-327. doi: 10.14218/JCTH.2016.00032. Review. 査読あり

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 坂本直哉 ローマ字氏名: Naoya Sakamoto

所属研究機関名: 北海道大学 部局名: 医学研究院

職名: 教授 研究者番号(8桁): 10334418

研究分担者

研究分担者氏名: 森川賢一 ローマ字氏名: Kenichi Morikawa

所属研究機関名: 北海道大学 部局名: 大学病院

職名: 助教 研究者番号(8桁): 60384377

(2) 研究協力者 なし

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、研究者個人に帰属されます。