

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22951

研究課題名(和文) HBc抗体陽性非ウイルス性肝癌のHBVゲノム挿入部位の同定及び発癌機構の解明

研究課題名(英文) The analysis of oncogenesis induced by the integration of HBV genome in HBc positive non-B non-C hepatocellular carcinoma

研究代表者

鈴木 理滋 (Suzuki, Rigel)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：60870532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、非ウイルス性肝癌患者の中にHBV既往感染マーカーであるHBc抗体陽性の患者がいることが明らかになった。これはHBV既往感染と肝癌発症に関係性がある事を示しているが、どのようにHBV既往感染者は肝癌を発症するのか謎に満ちていた。そこで、実際の検体を用いてHBVゲノム挿入による発癌の影響を調べるため、次世代シーケンス解析を試みた。新型コロナウイルスの影響により次世代シーケンス解析ができなかったが、HBVゲノムの挿入が発癌に関与することを明らかにするため、既に培養細胞で報告されているHBVゲノムの挿入部位を欠損した時の影響を調べた結果、HBVゲノムの挿入は腫瘍形成に関与する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

本研究でHBVゲノムが挿入された培養細胞を用いて、CRISPR-Cas9システムでHBVのインテグレーション箇所を欠損させた場合、腫瘍形成が抑制されることを見出した。この結果と今後、HBc抗体陽性非ウイルス性肝癌のHBVゲノム挿入箇所を同定し、その変異の入ったマウスモデルを作製し、実際に同定した配列を標的とするCRISPR-Cas9システムで腫瘍形成が抑制された場合、これまで問題になっていたHBc抗体陽性非ウイルス性肝癌の新たな治療方法になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been revealed that some patients with non-B non-C hepatocellular carcinoma are positive for HBc antibody, a marker of pre-existing HBV infection. Although this indicates that there is a relationship between pre-existing HBV infection and the development of hepatocarcinogenesis, how HBV pre-existing infection causes hepatocarcinogenesis has remained unclear. Therefore, we attempted next-generation sequencing analysis to investigate the effect of HBV genome insertion on carcinogenesis using HBc positive non-B non-C hepatocellular carcinoma. Although next-generation sequencing analysis could not be performed due to the effect of the SARS-CoV-2, we examined the effect of deletion of the HBV genome insertion site, which had already been reported in cultured cells, to clarify that the HBV genome insertion is involved in tumorigenesis. The results showed that the insertion of the HBV genome is involved in tumorigenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：HBV インテグレーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)に感染した場合、慢性肝炎または急性肝炎を発症する。慢性肝炎を発症した場合、肝硬変、肝臓と症状が進行するため、適切な治療を受ける必要がある。一方、急性肝炎を発症した場合、多くの感染者は軽症または自覚症状がないまま経過する。これは自己免疫により、HBVの複製が抑えられるからである。それ故、体内にHBVの中和抗体であるHBs抗体やHBVに感染していたことを示すHBc抗体が作られる。このような自己免疫によりHBVの増殖を抑制した感染者のことを、ここではHBV既往感染者と言う。このHBV既往感染者はHBV再発リスクのある抗癌剤・免疫抑制剤を投与する場合や肝移植を行う場合以外は、症状もほとんど無いため、慢性肝炎に比べ明確な治療方針はこれまで特に無い状態であった。

近年、非ウイルス性肝癌患者の中にHBc抗体陽性の症例が一定数以上存在する事が明らかになってきた。これはHBV既往感染と肝細胞癌(HCC)発症に関係性がある事を示唆しているが、どのようにしてHBV既往感染者はHCCを発症するのかといった問題が残っていた。非ウイルス性肝癌患者のゲノム解析が行われた所、ヒトゲノム中にHBVゲノムが様々な箇所に挿入されていることが明らかになった。この結果からHBVゲノムのインテグレーションにより発症することが考えられるが、インテグレーションがHCC発症に関与するかは不明のままである。そのため、HBV既往感染者におけるHBVゲノムのインテグレーションがHCC発症に及ぼす影響を明らかにすることは、HCC発症のリスク因子としてHBV既往歴の顕在化や新たなHCC発症のメカニズムに繋がり、学術的に非常に重要である。

### 2. 研究の目的

そこで本申請研究ではHBV既往感染者とHCC発症に着目し、ヒト検体を用いてHBVゲノムのインテグレーションサイトの網羅的同定を行う。また、同定したHBVゲノムのインテグレーションサイトによるHCC発症のメカニズムを明らかにすることで、HBc抗体陽性のHBV既往感染者でも発癌リスクがあることを提唱する。

### 3. 研究の方法

本研究ではHBc抗体陽性の非ウイルス性肝癌検体を用いてHBVゲノムのインテグレーションサイトを網羅的に同定し、同定したサイトによって惹き起こされる発癌メカニズムを解明する。また、HBV遺伝子が既にゲノムDNAに挿入された細胞に対して、CRISPR-Cas9システムを用いてHBV遺伝子をノックアウトした時の腫瘍形成も調べる。

#### (1): Viral DNA Capture-seq Approach法(VDCA法)を用いたHBVゲノム挿入部位の同定

HBc抗体陽性の非ウイルス性肝癌検体からDNAライブラリーを調製する。調製後、HBVゲノムの挿入部位を感度よく網羅的に解析するため、VDCA法を行う。VDCA法とはHBVゲノムが挿入されたヒトゲノムをHBVゲノムに対するビオチン化標識プローブを用いて濃縮する方法である。この方法でHBVゲノムが組み込まれたヒトゲノムを濃縮した後に次世代シーケンス解析を行う。この様にしてインテグレーションサイトを網羅的に決定した後、複数症例で認められるHCC発症に関与する新しいインテグレーションサイトを同定する。

#### (2): CRISPR-Cas9システムを用いたHBVゲノム挿入部位欠損による腫瘍形成の影響

HBV肝癌由来細胞で既に報告されているHBV挿入部位に対するsgRNAを作製し、CRISPR-Cas9システムで挿入部位を欠損した時の腫瘍形成能について調べる。これを行うことによりHBVゲノムのインテグレーションが発癌と関わり合いがあることを調べる。

### 4. 研究成果

本研究期間全体を通じて研究代表者は実験に使用するHBc抗体陽性非ウイルス性肝癌検体のピックアップを行い、全29検体の患者情報(年齢、性別、基礎疾患等)をまとめた。次に次世代シーケンス解析を行うため、まずはHBVゲノムがインテグレートされた培養細胞を用いてDNAライブラリー調製の条件検討を行った。DNA抽出後のDNAを目的の大きさの断片にするため、ソニケーションの条件検討を行った所、断片の大きさはDNA量に依存せず、ソニケーションの強さに依存することを見出した(図1)。これにより、目的のDNA断片を調製することができ、DNAライブラリーを調製することができた。また、肝臓組織を用いても見出した条件でDNAライブラリーを作製することに成功した。その後、新型コロナウイルスの影響により共同研究先との次世代シーケンス解析がで

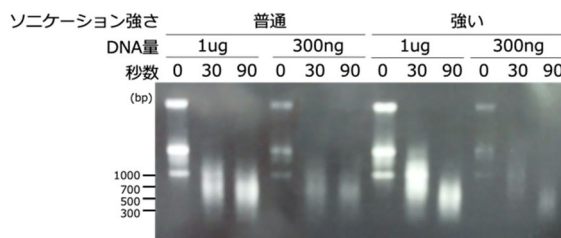


図1 DNA断片化の結果

きなかった代わりに、インテグレーションによる発癌機構を明らかにするため、HBV 肝癌由来の培養細胞で既に報告されている HBV ゲノムの挿入部位に対する sgRNA を作製し、CRISPR-Cas9 システムを用いて HBV ゲノムをノックアウトした時の影響を調べることを試みた。その結果、HBV ゲノムをノックアウトした細胞だと腫瘍形成を抑制しうることを見出した。これらの結果から、HBV のインテグレーションは腫瘍形成に関与することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------