

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15764

研究課題名（和文）HBVのヒトmtDNAへの組み込み解析と創薬への応用

研究課題名（英文）Analysis of HBV integrantion into human mtDNA and its application to drug discovery

研究代表者

及川 律子（Oikawa, Ritsuko）

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：60449395

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：HBV持続感染を介した肝発がんのメカニズムには、長期慢性炎症を要さない肝発がんにおけるHBVの直接的な関与も考えられる。我々はHBV陽性肝がん細胞株HepG2.2.15におけるヒトゲノム内へのウイルスDNA組み込みに着目し、NGS解析および組み込み部位近傍のメチル化解析を行った。HepG2.2.15はMT-CO3/HBVの組み込みが継続的に保存されているものの、その組み込み部位に関してはDNAメチル化という形でエピジェネティックな制御を受けていることが分かった。HepG2.2.15におけるミトコンドリア機能障害は示唆されたが、その要因がMT-CO3/HBV組み込みによる影響ではないと考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、HBV組み込み部位の特定は様々されてきたが、肝発癌機序の解明には至っていない。我々が開発した組み込み部位特異的抽出法を用いたNGS解析では、膨大な組み込み部位の情報を得ることに成功している。更にHepG2.2.15では、ミトコンドリア内MTCO3に組み込みを発見した。近年、ミトコンドリアにメチル化シトシンの存在が明らかになったが、ミトコンドリア機能とエピジェネティクス制御機構の関連は不明瞭なままである。本研究でMTCO3へのHBV組み込みによるメチル化制御メカニズムを明らかにすることはHBVウイルス組み込みにおける早期肝発癌メカニズムの解明が期待され、臨床応用への発展も見込まれた。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of hepatocarcinogenesis via persistent HBV infection may include direct involvement of HBV in liver carcinogenesis that does not require long-term chronic inflammation. We focused on viral DNA incorporation into the human genome in the HBV-positive hepatocarcinoma cell line HepG2.2.15 and performed NGS analysis and methylation analysis near the sites of incorporation. Although mitochondrial dysfunction in HepG2.2.15 was suggested, we did not think that this was caused by MT-CO3/HBV incorporation.

研究分野：エピジェネティック

キーワード：MTCO3 B型肝炎ウイルス ゲノム組み込み 肝がん

1. 研究開始当初の背景

日本における原発性肝細胞がんは約 90%が、基礎疾患に HBV あるいは HCV の持続感染を有しており、初期感染より慢性肝炎・肝硬変を経て肝臓がんに至ることから、長期感染に伴う慢性炎症が肝臓がんの要因として重要と考えられている。一方で、HBV 肝臓がん症例においては、必ずしも長期慢性炎症期間を要しないことから、肝臓がんメカニズムには宿主側の要因だけでなく、ウイルス側の要因、さらにはウイルスゲノムのヒトゲノム内への組み込みも重要と考えられている(1)(2)(3)。

次世代シーケンサー (NGS: Next Generation Sequencing) の導入によりヒトゲノムの網羅的な解析は進み、組み込み部位の特定は多数報告されたが、確定的な診断、治療に結びつく発癌機序の解明には至っていない。その理由として HBV の組み込みはランダムであるためノンコーディング領域への組み込みの報告が大多数であること、更に膨大なヒトゲノム情報から HBV 組み込み部位の抽出は技術的な面で困難であるため抽出できる情報量が少ない事も要因としてあげられる。

我々が開発した NGS を用いた組み込み部位特異的抽出法では、HBV の DNA 組み込みはランダムに生じるが、ヒトゲノムにおける組み込み部位の相違によって HBV が関連する疾患の重篤度が異なることが示唆された。この手法により HBV 感染肝癌細胞株 HepG2.2.15 では、興味深いことにヒトミトコンドリア内シトクロム c オキシダーゼ・サブユニット (MTCO3) 近傍に HBV が組み込まれていた。MTCO3 はエネルギーを産生する電子伝達系の最終酵素であり、MTCO3 の電子輸送を担うシトクロム c は活性酸素 (ROS) の除去としても機能している。ROS の上昇は癌や糖尿病、神経変性疾患などの報告が多々ありミトコンドリア機能異常との関連性も示唆されることから、HBV 組み込みによる MTCO3 遺伝子異常が肝臓癌に関与すると考えられた。

2. 研究の目的

我々は HBV 特異的 bait を用いて HBV 感染肝がん細胞の DNA から、選択的に HBV ゲノム組み込み部位の DNA 断片を Genome capture することで、効率的に NGS-based 組み込み解析を実現する方法 (Next Generation Sequencer Based Structural Methylation Analysis of Virus Genome Integration (G-NAVI 法)) を開発し(4)、HBV 感染肝がん細胞株を解析した結果、HepG2.2.15 においては核ゲノム内への HBV 断片の組み込みだけでなく、ミトコンドリアゲノム内への組み込みを発見した。ミトコンドリアの遺伝子異常による発癌の関与も報告されることから、HBV 組み込みによるミトコンドリア機能障害は肝臓癌発症の機序となり得るのか検討した。

3. 研究の方法

(1). 試料

PLC/PRF/5 (Alexander) および HepG2 細胞株は Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB, Tokyo, Japan) から購入した。HepG2.2.15 細胞株は Professor Stephan Urban at University Hospital Heidelberg より提供して頂いた。

(2). ダイレクトシーケンス解析

HBV ゲノム特異的に Target DNA enrichment を行った後、NGS 解析により HBV 組み込み部位を同定 (G-NAVI 法) した。G-NAVI 法で同定した。HepG2.2.15 細胞株における MT-CO3 近傍 HBV 組み込みの結果が正しいのか、ダイレクトシーケンサーにて配列の確認を行った。また HepG2.2.15 で HBV 組み込みを同定した配列箇所について、同様に HepG2 および PLC/PRF/5 細胞株で確認を行った。

(3). 細胞増殖能および乳酸測定

細胞増殖能は Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA) を使用した。乳酸測定については Lactate Assay Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, Rockville, MD, USA) を使用した。

(4). ウェスタンブロット

BCA 法によりたんぱく量を決定した。PVDF メンブランにより転写を行い、抗体は Rabbit polyclonal anti-MT-CO3, Cytochrome C antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を使用した。

(5). 発現解析およびメチル化解析

発現解析には SYBR green 法を用いた。メチル化解析はバイサルバイト処理を行った後、PCR 反応として熱変性 95 30 秒、アニーリング 60 30 秒、伸長反応 72 30 秒、40 サイクルを行った。

組み込み部位におけるエピジェネティックな変化を組み込みがあった近傍のヒトゲノム側と HBV ゲノム側でプライマーを作成し、組み込み近傍のメチル化率をパイロシーケンス法により解析した。

4. 研究成果

HepG2.2.15 細胞株における HBV のミトコンドリアゲノムへの組み込みが、MT-CO3 (NC-012920, Chromosome M, 9652) と HBV (AB205126, HBx, 1804) に "CACCA" の共通した塩基 (microhomology) を介して存在していることが分かった。さらに、アライメント解析では、ミトコンドリアゲノムに組み込まれた HBV 断片ゲノムは、HBV 全長ではなく、HBx (1804) から preC/C (1080) まで (contig) であることが確認できた (図 1A, 1B)。

HepG2 と HepG2.2.15 における体細胞内 MT-CO3 発現レベルは同レベルであるものの、PLC/PRF/5 より低い傾向にあった ($p=0.001$, $p=0.002$)。

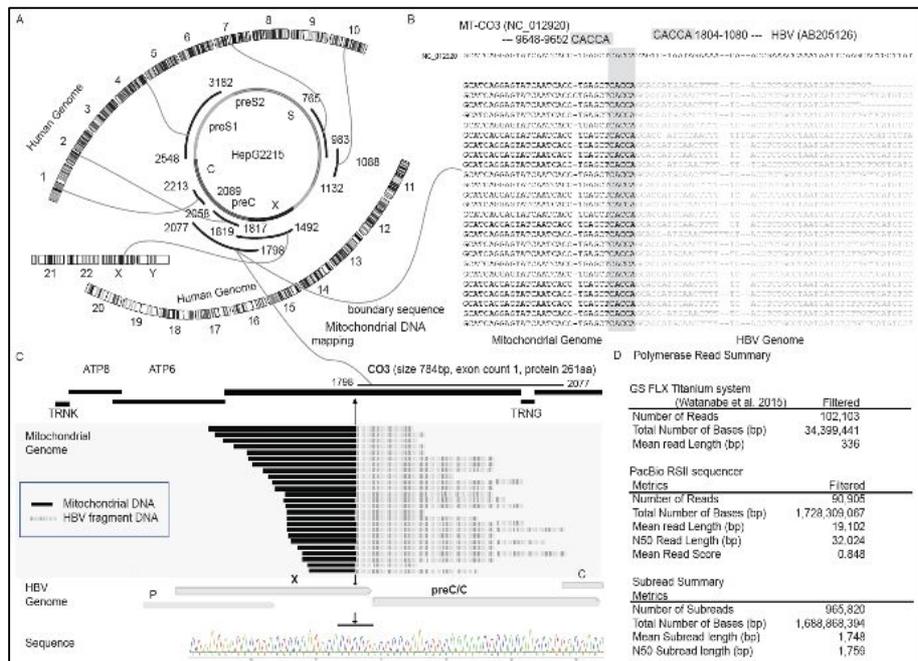


図 1. NGS 解析の結果

HepG2 に比し、HepG2.2.15 の細胞増殖能は Cell viability Assay (cell counting kit-8) にて有意に高かった ($p=0.01$) (図 2A)。

HepG2 と比した HepG2.2.15 の MT-CO3 蛋白質量は、cytoplasm 内では大きな差がみられないものの、ミトコンドリア内において高値であり (図 2B)、チトクローム C 蛋白質も同様に、ミトコンドリア内にて高値であった (図 2C)。また、Lactate Assay では、HepG2 に比して HepG2.2.15 の乳酸産生量が有意に高値 ($p=0.0003$) であり、メディウムの色調変化 (黄色調) も顕著であることからミトコンドリアの機能異常が示唆された (図 2D)。

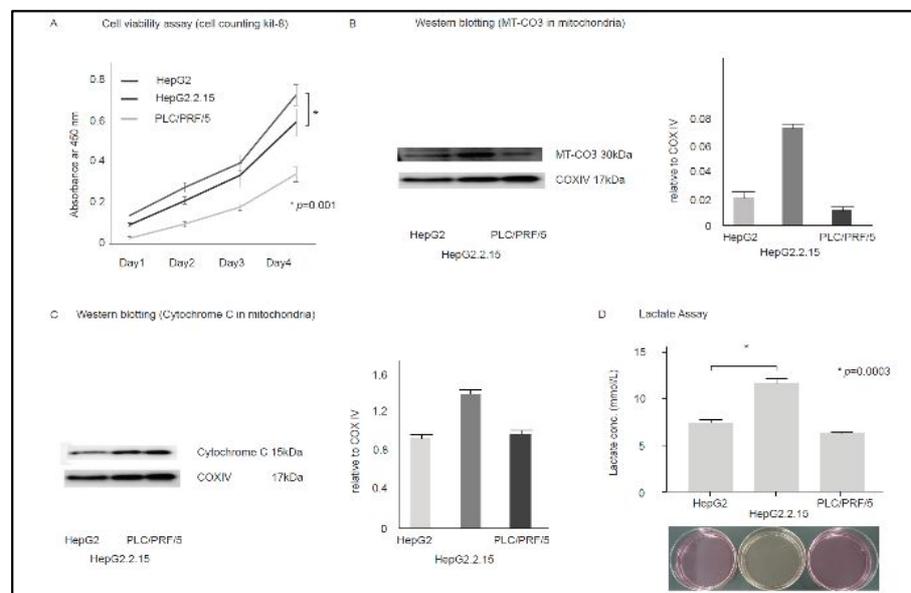


図 2. 細胞増殖能および WB の結果

HepG2.2.15 には HBV の組み込みを認める MT-CO3 ゲノム (HBV/MT-CO3) と組み込みのない MT-CO3 が存在することが PCR により分かった。

パイロシーケンス法による DNA メチル化の定量解析では、組み込みのない HepG2.2.15 MT-CO3 において低メチル化を示していた (3.0%)。また、MT-CO3 同部位は、HepG2、PLC/PRF/5 細胞株においても同様に低メチル化 (HepG2: 4.3%、PLC/PRF/5: 4.0%) であった。一方で、HepG2.2.15 における HBV/MT-CO3 のメチル化は HBV 側および MT-CO3 側の両サイドともに高メチル化 (HBV 側: 92.3%、MT-CO3 側: 95.5%) を呈していた。

ミトコンドリアは、酸素吸収により生体が必要とするエネルギーの大部分を産生しているオルガネラであり、呼吸機能をつかさどる酵素など 37 個の遺伝子をコードするゲノム配列を有している。ミトコンドリアゲノムの異常は、全身のミトコンドリア機能異常をとまなうミトコンドリア病のほか、糖尿病、神経変性疾患、癌を引き起こすだけでなく、老化したヒト組織にも関連のあることが報告されている (4)(5)。しかしながら、ミトコンドリアの研究において、とくに遺伝子組み換え研究が容易ではないことから、詳細な検討がなされず未だにその機能と疾患発症メカニズム解明にまでは至っていない。一方で、肝がん細胞におけるミトコンドリア DNA の変異は以前より報告されており、

これによるミトコンドリア機能障害の関与が示唆されるが、詳細なメカニズムは十分解明されていない(5)。

以前、我々の検討では、組み込まれる前の低メチル化だった部位は、ヒト核ゲノム内に HBV が組み込まれることで、HBV 側とヒトゲノム側ともに高メチル化になることを報告した。よってミトコンドリアゲノムで同様の現象が起きている可能性を考え検証を行った。核内に複数個存在するミトコンドリアはヘテロプラスミーという形をとる。HBV の組み込みがない MT-CO3 では 3 つの細胞株ともに低メチル化であった。一方組み込みが存在する HepG2.2.15 は HBV 側と MT-CO3 側の両方で高度にメチル化されていることから、ミトコンドリアゲノム内への組み込みもまた、メチル化により制御を受けることが分かった。ただし遺伝子発現解析と HBV の組み込み近傍における DNA メチル化解析の結果から関連性を明確にすることはできなかった。

以上の結果から HBV 感染肝がん細胞株 HepG2.2.15 は、MT-CO3/HBV の組み込みが継続的に保存されているものの、その組み込み部位に関しては DNA メチル化におけるエピジェネティックな制御を受けていることが分かった。HepG2.2.15 におけるミトコンドリア機能障害は示唆されるが、その要因が MT-CO3/HBV 組み込みによる影響でないと示唆された。

< 参考文献 >

1. Shibata T, *et al.* Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014;11:340-349.
2. Koike K. Cancer Lett. 2009;286:60-68.
3. Al Shahrani M, *et al.* J. Clin. Med. 2017;6:100.
4. Watanabe Y, *et al.* Genome Res. 2015; 25 (3):328-37
5. Machida K, *et al.* Virol. 2004;78:8835-8843.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 及川律子
2. 発表標題 HeG2.2.15細胞株におけるB型肝炎ウィリアムDNAのミトコンドリアCOX3遺伝子への組み込み
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 及川律子
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスのヒトゲノム組み込みからみた肝発がん研究
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------