

令和 4 年 5 月 1 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07583

研究課題名(和文) B型肝炎ウイルスのゲノム挿入現象の分子機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of hepatitis B virus DNA integration

研究代表者

村松 正道 (Muramatsu, Masamichi)

国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長

研究者番号：20359813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルスのDNAが、肝細胞のゲノムに挿入されるゲノム挿入現象は、発がん機構を理解する上で重要な現象だが、解析が難しく、これまで手軽な検出方法がないことが課題であった。そこで本研究では、手軽にできる検出方法の開発を目指した。B型肝炎ウイルスゲノムの挿入部位が、既に明らかな培養細胞を試験サンプルとして用いて、試験的解析をしたところ、本研究で開発した新規手法が、既存の方法と遜色なく、しかもより効率的にウイルスゲノム挿入が検出できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、B型肝炎の基礎研究では、ウイルス学的な研究や抗ウイルス剤探索などの研究報告は多い。一方、B型肝炎がどのように発癌を誘導するかについては、王道的テーマではあるものの、この十年大きな進展を見たとは言えない状況である。その一つの原因が、ウイルス発癌の中心的分子機構であるウイルスゲノム挿入現象の解析がなかなか進まないからである。本研究は、ゲノム挿入現象の検出方法の開発研究で、結果、新規手法により、手軽にウイルスゲノム挿入が検出できることがわかった。

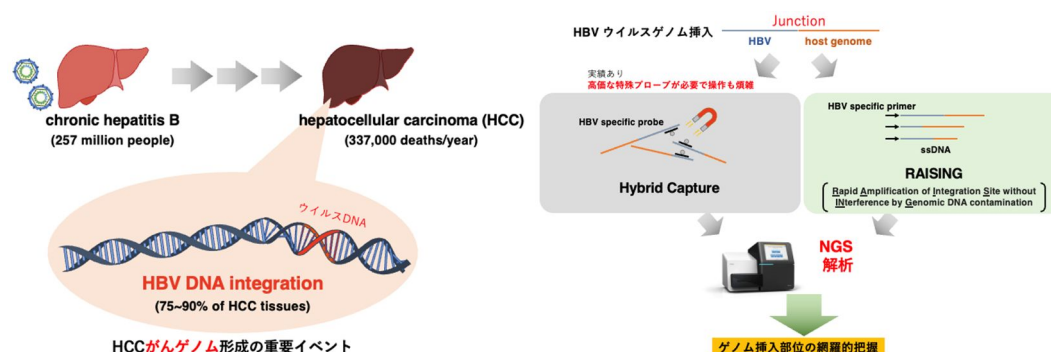
研究成果の概要(英文)：During hepatitis B virus related tumorigenesis, viral DNA integration is a key stone genetic alteration. However, fast convenient detection methods have not been available. Target-capture method have been used for this purpose, however, it requires expensive special probes to fish out viral-host DNA junction. Therefore, in this study, we aim to develop a well accessible detection method for viral DNA integration. Two authentic hepatic cell lines containing HBV viral DNA integration were used as a test samples. It was revealed that our novel approach, which is faster and cheaper than the target-capture method, shows comparable ability to detect viral integration events in the test samples comparing the target-capture method.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎 B型肝炎ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

世界的には 2.5 億人の HBV 感染者があり、年間約 88 万人が HBV 感染や感染による肝硬変/肝がんで死亡している (WHO 統計)。現在、逆転写酵素阻害剤やワクチンが臨床現場で使用されているものの、未だ HBV 感染から誘発される肝疾患は克服されておらず、HBV は今でも主要な公衆衛生上の問題である。肝がんが発生する機構は様々なモデルがあるが、HBV 遺伝子の持続的発現と慢性炎症に由来するゲノム損傷の蓄積が重要と考えられている。特に HBx (や HBs) の持続発現が発がん重要と推測する研究が多い。ゲノム挿入現象は HBx や HBs の持続的発現とゲノム損傷蓄積の両方に寄与するが、ゲノム挿入の多様性と解析の難しさが障害となり、その形成機構の解明は困難を極めてきた。最近、次世代シーケンズ技術の浸透によりゲノム挿入の定量的解析も可能となりつつあるが、これらの方法は普段使いで使える技術ではなく、もっと手軽に安価に解析する手法が望まれている。



## 2. 研究の目的

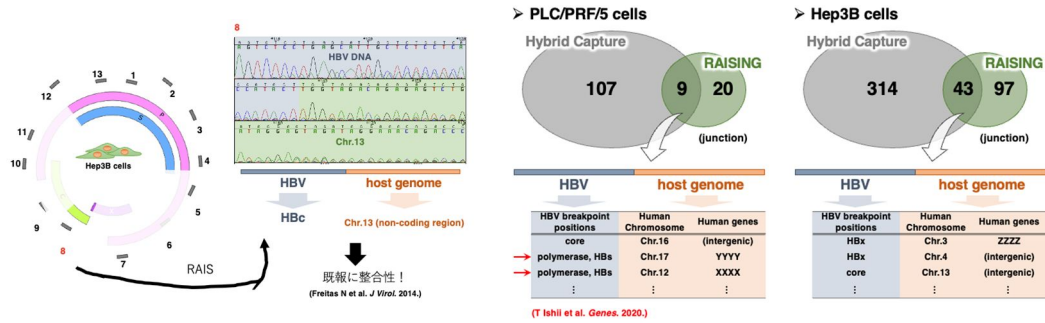
HBV 誘発性発がんにおいてウイルスゲノム挿入現象は、発がん過程を推し進める上で最も重要な現象である。そのプロセスの分子基盤を解明することが目的である。そのためにもウイルスゲノム挿入を解析する方法を確立し、分子機序の解明に取り組む。その結果、予後予想因子、発がん進行を止める方法の開発につながる基盤的情報獲得を期待したい。

## 3. 研究の方法

ウイルスゲノム挿入現象の解析を難しくするボトルネックの一つは検出方法であるので、その開発に力を注ぐ。これまで PCR を基本にした手法と、ハイブリットキャプチャー法が主に使われてきたが、前者は再現性や網羅性に問題があり、後者は、特殊プローブが必要で操作も複雑という欠点がある。本研究では、共同研究者が HTLV-1 で起こるゲノム挿入を検出するために新規に開発したウイルス・宿主ジャンクション (ゲノム挿入箇所) 検出法 (Saito et al. 2020) を HBV ゲノム挿入検出に適応し、その性能を既存のハイブリットキャプチャー法と比較する。培養細胞系や感染系では、感染のどのような時にどの程度の頻度でゲノム挿入が起こるかも不明な点が多いので、培養細胞感染系 (NTCP 発現 C4 細胞) や動物モデル (ヒト肝キメラマウス) など、より感染病態に近いサンプルを解析対象にするが、まずはゲノム挿入が既に確認されている培養細胞株 Hep3B などを用いて、2 つの検出方法を比較した。次に NTCP 発現 C4 細胞のウイルス感染系やヒト肝キメラマウスの解析を行なった。

## 4. 研究成果

本研究では、新規のゲノム挿入方法を開発することを目指している。最終年度は、前年度に得たサンプルのウイルスゲノム挿入の検出、及び、解析を継続して行なった。ゲノムに安定してウイルスゲノムが挿入されている肝細胞株 2 系統、初代肝細胞も含む培養感染系、ヒト肝キメラマウスを使った B 型肝炎ウイルス動物感染モデルを用いたサンプルから得たゲノム DNA を解析対象にした。主に検出できるゲノム挿入部位や頻度の検討をについて、我々が進めている新規手法を既存の方法と比較しつつ開発を進めた。その結果、2 系統の細胞株に既に既存の研究でウイルスゲノム挿入が報告されている挿入部位を検出したのみならず、新規の挿入部位を多数見つけることができた。さらに、既存の方法（ハイブリッドキャプチャー法）で検出されたウイルス-宿主ゲノムジャンクション DNA 部位の多くを、我々の方法（RASING）でも検出でき、加えて、既存の方法では検出できない部位も検出できた。また感染細胞や動物モデル系でも頻度は低いもののゲノム挿入を捉えることができた。今後、ウイルスゲノム挿入の解析方法の簡易版として B 型肝炎発癌研究に貢献できることが期待された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kakizaki Masatoshi, Yamamoto Yuichiro, Otsuka Motoyuki, Kitamura Kouichi, Ito Masatoshi, Kawai Hideki, Derek, Muramatsu Masamichi, Kagawa Tatehiro, Kotani Ai	4. 巻 295
2. 論文標題 Extracellular vesicles secreted by HBV-infected cells modulate HBV persistence in hydrodynamic HBV transfection mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 12449 ~ 12460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.014317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Shogo, Watashi Koichi, Fukano Kento, Tsukuda Senko, Wakae Kousho, Aizaki Hideki, Muramatsu Masamichi, Wakita Takaji, Toyoda Tetsuya	4. 巻 55
2. 論文標題 Non-nucleoside hepatitis B virus polymerase inhibitors identified by an in vitro polymerase elongation assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 441 ~ 452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01643-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li Yingfang, Que Lusheng, Fukano Kento, Koura Miki, Kitamura Kouichi, Zheng Xin, Kato Takanobu, Aly Hussein Hassan, Watashi Koichi, Tsukuda Senko, Aizaki Hideki, Watanabe Noriyuki, Sato Yuko, Suzuki Tadaki, Suzuki Hiroshi I., Hosomichi Kazuyoshi, Kurachi Makoto, Wakae Kousho, Muramatsu Masamichi	4. 巻 10
2. 論文標題 MCP1P1 reduces HBV-RNA by targeting its epsilon structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-77166-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yato Keigo, Onodera Taishi, Matsuda Mami, Moriyama Saya, Fujimoto Akira, Watashi Koichi, Aizaki Hideki, Tanaka Tomohisa, Moriishi Kohji, Nishitsuji Hironori, Shimotohno Kunitada, Tamura Koji, Takahashi Yoshimasa, Wakita Takaji, Muramatsu Masamichi, Kato Takanobu, Suzuki Ryosuke	4. 巻 95
2. 論文標題 Identification of Two Critical Neutralizing Epitopes in the Receptor Binding Domain of Hepatitis B Virus preS1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 veab003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01680-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Murayama Asako, Yamada Norie, Osaki Yoshiki, Aly H Hassan, Watashi Koichi, Matsuda Mami, Suzuki Ryosuke, Tanaka Tomohisa, Moriishi Kohji, Suzuki Tetsuro, Nishitsuji Hironori, Sugiyama Masaya, Mizokami Masashi, Shimotohno Kunitada, Wakita Takaji, Muramatsu Masamichi, Liang. Jake, Kato Takanobu	4. 巻 73
2. 論文標題 N Terminal PreS1 Sequence Regulates Efficient Infection of Cell Culture?Generated Hepatitis B Virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 520 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwamoto Masashi, Shibata Yukino, Kawasaki Junna, Kojima Shohei, Li Yung-Tsung, Iwami Shingo, Muramatsu Masamichi, Wu Hui-Lin, Wada Kazuhiro, Tomonaga Keizo, Watashi Koichi, Horie Masayuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Evolution	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ve/veab003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu Guangyan, Ma Xiancai, Wang Zhe, Wakae Kousho, Yuan Yaochang, He Zhangping, Yoshiyama Hironori, Iizasa Hisashi, Zhang Hui, Matsuda Mami, Sugiyama Ryuichi, Yuan Zhiyu, Muramatsu Masamichi, Li Linghua	4. 巻 294
2. 論文標題 Adenosine deaminase acting on RNA-1 (ADAR1) inhibits hepatitis B virus (HBV) replication by enhancing microRNA-122 processing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 14043 ~ 14054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.007970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukano Kento, Oshima Mizuki, Tsukuda Senko, Aizaki Hideki, Ohki Mio, Park Sam-Yong, Wakita Takaji, Wakae Kousho, Watashi Koichi, Muramatsu Masamichi	4. 巻 95
2. 論文標題 NTCP Oligomerization Occurs Downstream of the NTCP-EGFR Interaction during Hepatitis B Virus Internalization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 JV10093821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.00938-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村松正道
2. 発表標題 cccDNA 形成機構を狙った B 型肝炎慢性化阻止の基礎研究
3. 学会等名 平成30年度宮川庚子記念研究財団 研修会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村松正道
2. 発表標題 ウイルス感染で発現誘導される宿主変異原酵素APOBECと病態相関
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会 第50回記念大会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------