

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17438

研究課題名(和文) B型肝炎の核酸アナログ製剤治療後の発がんリスクに関わるmiRNA異常の解明

研究課題名(英文) Analysis of miRNA dysregulation and the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B after nucleos(t)ide analogue treatment

研究代表者

若杉 英樹 (Wakasugi, Hideki)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90784314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎に対する核酸アナログ製剤(NA)治療は、肝細胞がん(HCC)の発症リスクを低下させるが、一部の症例はNA治療後にHCCを発症する。慢性B型肝炎のNA治療前後のmiRNA発現を網羅的に解析した結果、B型肝炎ではmiRNA発現プロファイルが大きく変化していること、NA治療はmiRNA発現の正常化を促すが、治療後に発がんした症例ではmiRNA発現異常が持続していることが明らかとなった。これらのmiRNAには、iR-199a-3p、miR-101、miR-152などHCCとの関わりが深いものが多数含まれていた。これらの結果から、miRNA異常がNA治療後の肝臓がんに関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、核酸アナログ(NA)などの抗ウイルス薬の進歩により、B型慢性肝炎の治療および発がんの抑制が可能となりつつある。しかし治療により肝炎が改善したにも関わらず、発がんする症例が肝硬変例を中心に見られることから、そのメカニズム解明はB型肝炎患者の予後改善に重要な意義がある。本研究は、NA治療後の肝臓がんリスクにmiRNA発現異常が関わることを世界で初めて明らかにした。miRNA発現はNA治療後の発がんリスク予測マーカーになりうるとともに、miRNA発現の正常化は発がんを予防するための新たな戦略となりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis B virus (HBV) infection is a major cause of hepatocellular carcinoma (HCC). Nucleos(t)ide analogue (NA) therapy effectively reduces the incidence of HCC, but it does not completely prevent the disease. We found that dysregulation of microRNAs (miRNAs) is involved in post-NA HCC development. We divided chronic hepatitis B (CHB) patients who received NA therapy into two groups: 1) those who did not develop HCC during the follow-up period after NA therapy (no-HCC group) and 2) those who did (HCC group). miRNA expression profiles were significantly altered in CHB tissues as compared to normal liver, and the HCC group showed greater alteration than the no-HCC group. NA treatment restored the miRNA expression profiles to near-normal in the no-HCC group, but it was less effective in the HCC group. Our results suggest that altered miRNA expression in CHB contributes to HCC development, and that improvement of miRNA expression after NA treatment is associated with reduced HCC risk.

研究分野：消化器内科学

キーワード：B型肝炎 肝細胞がん 核酸アナログ製剤 miRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞がん(hepatocellular carcinoma, HCC)の発生原因は、C型慢性肝炎、B型慢性肝炎、過度のアルコール摂取、非アルコール性脂肪性肝疾患などである。先進国ではC型慢性肝炎が肝がん原因の多くを占めるが、本邦ではB型肝炎も主要な肝がんの原因である。近年、核酸アナログ(NA)などの抗ウイルス薬の進歩により、B型慢性肝炎の治療およびがんの抑制が可能となりつつある。しかし治療により肝炎が改善したにも関わらず、がんする症例が肝硬変例を中心に見られる。

近年、microRNA(miRNA)と肝がんとの関わりが急速に明らかにされつつある。例えば、miR-199a/bの発現低下が肝がんに関わること(Cancer Cell, 2011)、miR-140がTGFB1を標的とすることで肝がん抑制に働くこと(Hepatology, 2013)、miR-152はDNAメチル化酵素DNMT1を標的とし、肝がんではmiR-152の低下がDNAメチル化異常を誘導すること(Hepatology, 2010)など多数の研究結果が報告されている。

このようにHCCとmiRNAとの関係について多くの研究結果が報告されているが、B型肝炎のNA治療後に発症するHCCとmiRNAとの関わりは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、B型肝炎に対するNA治療前後におけるmiRNA発現の変化と、NA治療後のHCC発症の有無を比較検討することで、NA治療後HCCにおけるmiRNAの役割を解明し、NA治療後のがんリスク予測や、予防法開発につながる知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 解析対象

エンテカビル(ETV)にて治療を受けた慢性B型肝炎52例を解析対象とした。NA治療開始前の肝組織を、肝生検を施行した42例から採取した。NA治療後の肝組織を、肝生検あるいは肝がんに対する肝切除術を施行した28例から採取した。正常肝組織を、肝血管腫切除を受けた5例より採取した。HCC細胞株(HLE, HLF, HepG2, Hep3B, huH-1, HuH-7, Li-7, PLC/PRF/5, HT-17)およびHBVを感染させたHCC細胞(HepG2-hNTCP-C4)をmiRNA発現および機能解析に用いた。

#### (2) miRNA発現解析

網羅的なmiRNA発現解析を、Human miRNA Microarray V3 (Agilent)を用いて行った。また個々のmiRNA発現をTaqMan miRNA assays (Thermo Fisher Scientific)を用いて解析した。

#### (3) 機能解析

HCC細胞株にLipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いてmirVana miRNA mimic (Thermo Fisher Scientific)をトランスフェクトした。また標的遺伝子に対するsiRNAをHCC細胞株にトランスフェクトして、ノックダウンを行った。細胞増殖をcell viability assayで解析した。細胞の遊走能およびMatrigel浸潤能をBoyden Chamberアッセイで解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 慢性B型肝炎におけるmiRNA発現異常とNA治療による改善効果

まず、NA治療後少なくとも2年以上HCCを発症しない群を非発がん群、NA治療後にHCCを発症した群を発がん群とした。次に、非発がん群のNA治療前(n=8)、NA治療後(n=8)、発がん群のNA治療前(n=3)、NA治療後のがん部(n=10)および非がん部(n=9)、健常人正常肝(n=4)を対象に、miRNA発現をマイクロアレイによって網羅的に解析した。miRNA発現のクラスタリング解析から、NA治療前のmiRNA発現は正常肝と比較して大きく異なっていること、そしてNA治療後は正常肝の発現パターンに近づくことが分かった。興味深いことに、非発がん群は発がん群と比較してmiRNA発現異常がよりマイルドであり、NA治療後には正常肝にかなり近づくが、発がん群はmiRNA発現異常が顕著であり、NA治療にも依然として正常肝からは隔たりがあることが分かった。これらの結果から、miRNA発現パターンはNA治療後のHCC発症リスクと関連することが示唆された。

#### (2) NA治療後HCCリスクと関連するmiRNAの同定

マイクロアレイの結果を、より多くの検体で定量RT-PCRで検証し、NA治療後HCCと関連のあるmiRNAを絞り込んだ。慢性B型肝炎で発現が変化し、非発がん群ではNA治療後に発現が正常に近づくが、発がん群では十分に回復しないmiRNAとして、miR-17\*, miR-98, miR-101, miR-140, miR-146a, miR-148b, miR-152, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-374a, miR-376c, miR-660, let-7gを抽出した。これら中は、HCCとの関わりが報告されているmiRNAが多く含まれていた。HCC細胞株におけるこれらのmiRNA発現を定量RT-PCRで解析した結果、miR-17\*, miR-98, miR-199a-3p, miR-101, miR-152, miR-376c, let-7gの発現が、正常肝と比較してHCC細胞株で低下して

いることを見いだした。これらのうち、miR-98, miR-101, miR-140, miR-152, miR-199a-3p, miR-376c, miR-660, let-7g の miRNA mimic を HCC 細胞株に導入した結果、増殖の抑制が認められた。さらに、miR-140, miR-199a-3p, miR-376c, miR-660 は HCC 細胞の遊走・浸潤能を抑制した。以上の結果から、これらの miRNA 発現異常が、NA 治療後の HCC 発症に関わることが示唆された。

### ( 3 ) miRNA の機能解析

miR-199 ファミリーは HBV 感染や HCC に関わることがこれまでに複数報告されていることから、次に miR-199a-3p に着目した。HBV 陽性の HepG2 細胞(HepG2-hNTCP-C4)における miR-199a-3p はの発現は、親株と比較して発現低下していた。HCC における miR-199a-3p の機能を詳細に解析するため、miR-199a-3p mimic を導入した HCC 細胞株 (HLE および HLF) の遺伝子発現をマイクロアレイ解析した。その結果、両方の細胞株で発現低下する 819 遺伝子を同定した。パスウェイ解析の結果、これらには MAPK シグナル、インスリンシグナル、DNA ダメージ応答に関する遺伝子が多く含まれていた。マイクロアレイの結果と、TargetScan による miRNA 標的遺伝子予測アルゴリズムを比較することで、新たな miR-199a-3p 標的遺伝子候補として CDK7, TACC2, DEPDC1B を抽出した。これらの候補遺伝子の 3'UTR を導入したルシフェラーゼレポーターベクターを用いた解析から、miR-199a-3p がこれらの遺伝子を抑制することが示唆された。また The Cancer Genome Atlas の HCC 症例の RNA-seq データを用いた解析から、これらの遺伝子と miR-199a-3p の発現レベルの間に逆相関が認められた。また、CDK7 と TACC2 のノックダウンは、HCC 細胞の増殖、遊走、浸潤能を抑制した。これらの結果から、miR-199a-3p は CDK7 や TACC2 を含む複数の遺伝子を制御することで、腫瘍抑制遺伝子として働くことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishiguro K, Kitajima H, Niinuma T, Ishida T, Maruyama R, Ikeda H, Hayashi T, Sasaki H, Wakasugi H, Nishiyama K, Shindo T, Yamamoto E, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Nakase H, Suzuki H.	4. 巻 104
2. 論文標題 DOT1L inhibition blocks multiple myeloma cell proliferation by suppressing IRF4-MYC signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 155-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2018.191262	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 -

〔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
---------	---------