

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17453

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたゲノムとHBV integrationが関わる肝発癌機構の解明

研究課題名(英文) Research for hepatocarcinogenesis using iPS cells with genetic mutations and information of HBV integration

研究代表者

北畑 富貴子(河合)(Kawai-Kitahata, Fukiko)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00755580

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)：本検討では、核酸アナログ内服によるHBV複製制御下における肝細胞癌においてHBs抗原陽性慢性肝炎とHBs抗原陽性ALT持続正常群では遺伝子変異、HBV integrationともに類似のプロファイルであり同様の発癌機構が考えられた。またHBV既往感染におけるHBV integrationの頻度はHBs抗原陽性例と異なるが、共通するHBV integration領域も新たに明らかとなった。そしてこの検討で得られたTERTとKMT locus breakpointsを再現してiPS細胞株への挿入変異を導入し肝幹・前駆細胞への分化誘導を行い、健常型細胞との形質比較解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的に蔓延するB型肝炎ウイルス(HBV)感染症において、HBV制御下におけるB型肝炎の癌関連遺伝子やウイルスDNAのヒトゲノムへの挿入を調べ、さらにHBV breakpointsを再現してiPS細胞株への挿入変異を導入した。HBV制御状態により発癌過程が共通するまたは異なる可能性を示したことにより今後癌進展機構など臨床的な知見となり得る。またiPS細胞を用いた新たな応用研究分野を開発する知的・技術的基盤の確立に貢献することにつながる。

研究成果の概要(英文)：We investigated cancer-related genes and viral integration using next generation sequencing in HCC tissues with HBV suppression by nucleotide/nucleoside analogues. In HBs antigen positive patients with chronic persistent HBV infection, gene mutational profile and HBV integration breakpoints were similar to those in HBs antigen positive patients with normal ALT. In patients with prior HBV infection, HBV integration were found in common cancer-related genes although a total number of HBV integration breakpoints was small compared with those in chronic persistent HBV infection. Based on these results, we also established human induced pluripotent stem cell model with HBV integration breakpoints at TERT and KMT locus.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝細胞癌 B型肝炎ウイルス ヒトiPS細胞

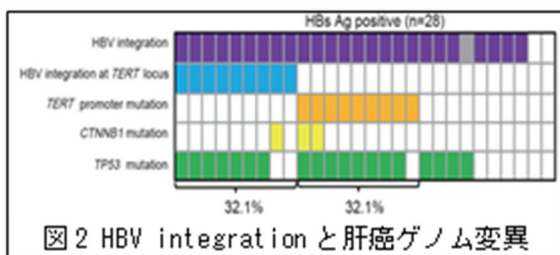
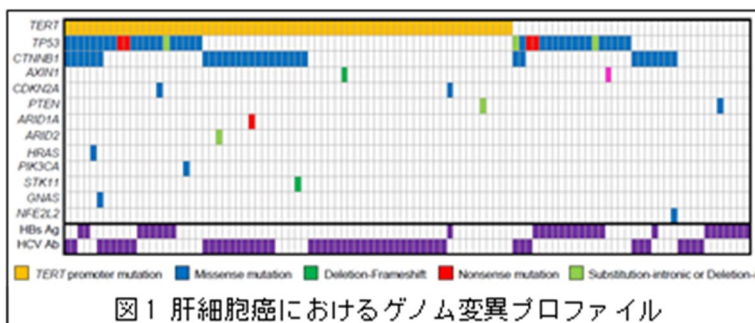
### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は世界の癌死の第3位に挙げられる予後不良の癌で、ウイルス肝炎や非アルコール性脂肪性肝炎等が主な原因となり、ウイルス持続感染や代謝ストレスにより宿主側遺伝子に異常が蓄積し、様々な癌の病態を決定していると考えられている。

中でもB型肝炎ウイルス(HBV)は世界的に蔓延する感染症で、持続感染者は約2億4千万人にのぼる。近年、核酸アナログ薬治療によりHBV複製抑制がほぼ可能にはなったが、本治療ではウイルス複製の鋳型となる covalently closed circular DNA (cccDNA) 及び宿主ゲノムに integration された HBV の直接排除は起こらないため、発癌抑制効果は限定的であり、わが国においては現行治療による HBV 制御下における B 型肝炎癌が増加しており、その死亡者数は減少していない。従って、HBV と HBV integration が関与する発癌機構の解明と、これまでの抗ウイルス療法とは発想を異にする肝癌を抑止する治療法の開発が急務である。

これまで申請者らは、臨床情報の詳細が判明している肝細胞癌手術例 104 例の癌関連遺伝子変異および HBV integration について次世代シーケンズ(NGS)を用いて網羅的な解析を行い、癌部では TERT promoter、TP53、CTNNB1 の変異が高頻度であることや、B型肝炎癌はC型および非B非C肝癌とは異なる遺伝子変異プロファイルを有し、TERT promoter 変異例は予後が不良など、臨床病態学的背景との関連を明らかとした (Kawai-Kitahata et al. Hepatology 2014, J Gastroenterol 2016, 図1)。さらに HBs 抗原陽性 28 例の癌部における HBV integration について、HBV ゲノム配列から作成したオリゴキャプチャライブラリと癌部 DNA とのハイブリダイズライブラリを NGS 解析しヒトと HBV ゲノムの junction point の効率的抽出法を確立、B型肝炎癌における HBV integration の詳細を明らかとした (若手 B2017-18 北畑, 図2)。

この様に申請者らは HBV integration と遺伝子変異、および臨床背景因子との関連を明らかとしてきたが、核酸アナログ薬による HBV 制御下における発癌機構や、わが国に2,000万人存在すると推定されている HBV 既感染者、および潜在的 HBV 感染者における HBV integration や癌ゲノム変異が関わる発癌機構の詳細は不明である。



### 2. 研究の目的

(1) 核酸アナログ内服による HBV 複製制御下における肝細胞癌の遺伝子変異および HBV integration の解析、(2) これら HBV integration と癌関連遺伝子変異をゲノム編集により導入した iPS 細胞の樹立と、これを用いた癌形質獲得について細胞生物学的解析、(3) さらに HBV integration 過程を再現する in vitro HBV 感染培養系を構築することにより HBV integration が関わる肝発癌・進展機構の詳細解明を目的とし、さらに、ヒト iPS 細胞を用いた新たな応用研究分野を開発する知的・技術的基盤を確立することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) HBV 複製制御下における肝細胞癌の遺伝子変異および HBV integration の解析  
B 型慢性肝炎において核酸アナログ薬により HBV 増殖が制御されている症例および HBV 既感染例の癌部と非癌部、リンパ球から抽出した DNA を使用して、独自に作成した肝細胞癌の癌関連遺伝子パネルを次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。癌部の遺伝子変異の遺伝子変異を検出し、ウイルス制御下における発癌過程を検証した。また、HBs 抗原陽性例と HBV 既感染例において、癌部と肝臓非癌部の DNA と HBV・AAV のゲノム配列から作成したオリゴキャプチャライブラリとのハイブリダイゼーションによるライブラリ調整を行い、Illumina Miseq を使用し Paired-End 法 300 塩基読み取りにより塩基配列データを取得しヒトと HBV・AAV ゲノムの junction を含むデータを抽出した。

(2) ゲノム編集による HBV integration を有するヒト iPS 細胞の樹立と機能解析  
上記(1)により探索された宿主に影響を及ぼすと考えられる TERT promoter 領域、KMT2B 領域への HBx 遺伝子の HBV integration について、ヒト iPS 細胞に導入することで、さらなる発癌機構の詳細な機能解析をする。ヒト iPS 細胞に CRISPR/Cas system を用いて TERT promoter 領域、KMT2B の exon 領域に HBx 遺伝子を挿入した人工遺伝子を有するヒト iPS 細胞を樹立し、肝幹・前駆細胞あるいは肝細胞に誘導し、癌形質の獲得について細胞生物学的な解析を進めた。

(3) HBV integration 過程を再現するヒト iPS 細胞由来 HBV 感染培養系の構築と肝発癌・進展機構の詳細説明  
これまで申請者が構築したヒト iPS 細胞由来 HBV 感染培養系を用いて、感染初期の HBV integration の詳細を解析するとともに、ヒト iPS 細胞ゲノムに PiggyBac Transposon 系を用いてランダムにウイルス遺伝子断片を挿入する。形質転換を起こした iPS 細胞株に対して、肝発癌・進展機構について細胞生物学的な解析を行い、標的分子を探索する。

#### 4. 研究成果

(1) HBV 複製制御下における肝細胞癌の遺伝子変異および HBV integration の解析  
肝細胞癌の患者検体 143 例 (HBs 抗原陽性慢性肝炎/HBV 既往感染 HCV 陰性/HBV 既往感染 HCV 陽性=43/30/21 例と非 B 非 C49 例) の癌部と背景肝の DNA を用いて deep sequence を行い、14 遺伝子 192 か所の遺伝子変異を同定した。  
HBs 抗原陽性慢性肝炎群は TP53 変異が多く TERT promoter 変異が少なかった。一方 HBV 既往感染群は TERT promoter 変異が多く全体としては非 B 非 C 群に近い遺伝子変異プロファイルであったが HBV 既往 HCV 陰性群は TP53 変異が多く HBs 抗原陽性慢性肝炎群と類似していた。  
HBV integration は HBs 抗原陽性群の癌部では 42 例中 39 例 125 か所、非癌部は 32 例中 27 例 229 か所で検出された。一方、HBV 既往感染群の癌部は 51 例中 7 例、21 か所で HBV integration を認めた。このうち、HCV 陽性群では HBV integration は一例も認めなかった。  
非癌部では 50 例中 5 例 6 か所で HBV integration を認め、また AAV integration も 2 例 2 か所に認めた。

(2) ゲノム編集による HBV integration を有するヒト iPS 細胞の樹立と機能解析  
前項の検討で得られた HBx 遺伝子と TERT locus breakpoints を再現して genotype C HBx コンセンサス配列を用いた targeting vector を作成した。これを Crispr/Cas9 系を利用して、健康者由来ヒト iPS 細胞株の TERT promoter 領域へ HBx 配列の挿入変異を導入した。  
同様に、KMT2B locus breakpoints の再現として、健康者由来 iPS 細胞株より KMT2B 欠損株を作成し、肝幹・前駆細胞へ分化誘導を行った。  
TERT 領域への挿入変異では iPS 細胞から肝細胞系譜への分化誘導を行い、得られた細胞を用いた RNA sequence を行って形質の差異を比較した。標的分子の絞り込みを行って、今後の研究計画で解析をすすめる予定である。  
HBx を挿入した細胞株では TERT mRNA の発現量が増加する傾向を認めた。

KMT2B 領域への挿入変異では iPS 細胞から肝細胞系譜への分化誘導を行った。さらに幹細胞系譜に分化させる途中で、肝前駆細胞を樹立し (Yanagida et al, 2013)、継代培養が可能な細胞株を樹立した。対照としては、健康型細胞、及びヘテロ欠損細胞を作成し、肝細胞系譜での形質と肝前駆細胞レベルでの性質の双方に関して、比較検討を行った。  
その結果、HBV integration を再現した iPS 由来の肝前駆細胞では、増殖能が亢進する傾向を認めた。そこで得られた細胞において transcriptome 解析を行った。一方で、ヘテロ欠損株では増殖能が亢進する傾向を認めなかった。こちらでも、標的分子の絞り込みを行って、今後の研究計画で解析をすすめる予定である。

(3) HBV integration 過程を再現するヒト iPS 細胞由来 HBV 感染培養系の構築と肝発癌・進展機構の詳細説明

これまで申請者らが構築したヒト iPS 細胞由来 HBV 感染培養系を利用した (Kaneko et al, 2016)。我々の研究では、薬剤誘導性に NTCP の強制発現が可能な iPS 細胞を樹立している。この細胞においては、HBV の持続感染が可能であり 1-2 ヶ月間は維持培養が可能である。そこで、PiggyBac transposon を用いて NTCP 強制発現ヒト iPS 細胞に対して、genotype C の HBV ゲノム (HBx および HBV core promoter の配列) の組み込みを行った。今後さらに、ランダムに HBV integration を有するヒト iPS 細胞を解析して、その iPS 由来肝細胞を作成し、増殖性の変化について解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Kaneko S, Tsuchiya J, Sato A, Miyoshi M, Tsunoda T, Inoue-Shinomiyama E, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Tanabe M, Sugawara E, Takemoto A, Ojima H, Sakamoto M, Muraoka M, Takano S, Maekawa S, Enomoto E, Watanabe M.	4. 巻 49
2. 論文標題 Comprehensive genetic analysis of cholangiolocellular carcinoma with a coexistent hepatocellular carcinoma like area and metachronous hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1466 ~ 1474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13403	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 Sato A, Kakinuma S, Miyoshi M, Kamiya A, Tsunoda T, Kaneko S, Tsuchiya J, Shimizu T, Takeichi T, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Asahina Y, Watanabe M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Vasoactive Intestinal Peptide Derived From Liver Mesenchymal Cells Mediates Tight Junction Assembly in Mouse Intrahepatic Bile Ducts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 235 ~ 254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1459	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 Tsunoda T, Kakinuma S, Miyoshi M, Kamiya A, Kaneko S, Sato A, Tsuchiya J, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Sogo T, Komatsu H, Mukouchi R, Inui A, Fujisawa T, Nakauchi H, Asahina Y, Watanabe M.	4. 巻 71
2. 論文標題 Loss of fibrocystin promotes interleukin-8-dependent proliferation and CTGF production of biliary epithelium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 143 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2019.02.024	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 Nitta S, Asahina Y, Kato T, Tsuchiya J, Inoue-Shinomiya E, Sato A, Tsunoda T, Miyoshi M, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Hikita H, Takehara T, Watanabe M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Impact of novel NS5A resistance-associated substitutions of hepatitis C virus detected in treatment-experienced patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42114-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 -

1. 著者名 Nakagawa M, Nawa N, Takeichi E, Shimizu T, Tsuchiya J, Sato A, Miyoshi M, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Fujiwara T, Watanabe M, Tanaka Y, Asahina Y	4. 巻 55
2. 論文標題 Mac-2 binding protein glycosylation isomer as a novel predictive biomarker for patient survival after hepatitis C virus eradication by DAAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 990 ~ 999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01715-6	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 Nitta S, Takahashi K, Kawai-Kitahata F, Tsuchiya J, Sato A, Miyoshi M, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M, Asahina Y.	4. 巻 50
2. 論文標題 Time course alterations of virus sequences and immunoglobulin titers in a chronic hepatitis E patient	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 524 ~ 531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13480	査読の有無 無
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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 北畑富貴子、朝比奈靖浩、村川美也子、新田沙由梨、柿沼晴、角田知之、三好正人、四宮恵美、佐藤綾子、土屋淳、井津井康浩、中川美奈、東正新、田中真二、田邊稔、前川伸哉、榎本信幸、渡辺守
2. 発表標題 背景肝の線維化からみた肝細胞癌における癌関連遺伝子変異とviral integrationの検討
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北畑富貴子、朝比奈靖浩、金子俊、村川美也子、新田沙由梨、柿沼晴、三好正人、佐藤綾子、井津井康浩、中川美奈、東正新、田邊稔、菅原江美子、竹本暁、坂元亨宇、尾島英知、村岡優、前川伸哉、榎本信幸、渡辺守
2. 発表標題 細胆管細胞癌内の異なる表現型及び肝細胞癌における癌関連遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第55回日本肝癌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuhiro Asahina, Fukiko Kawai-Kitahata, Miyako Murakawa, Sayuri Nitta, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Seishin Azuma, Sei Kakinuma
2. 発表標題 Comprehensive analysis of cancer gene mutations and viral integration in hepatocellular carcinoma arising from non-fibrotic liver
3. 学会等名 The Liver Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukiko Kawai-Kitahata, Yasuhiro Asahina, Sei Kakinuma, Miyako Murakawa, Sayuri Nitta, Masato Miyoshi, Ayako Sato, Jun Tsuchiya, Taro Shimizu, Eiko Takeichi, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Shinji Tanaka, Minoru Tanabe, Shinya Maekawa, Nobuyuki Enomoto, Mamoru Watanabe.
2. 発表標題 Comprehensive analysis of cancer-related genes and AAV/Hepatitis B virus integration into genome on development of hepatocellular carcinoma in patients with prior Hepatitis B virus infection.
3. 学会等名 EASL The Digital International Liver Congress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究協力者	朝比奈 靖浩  (ASAHINA Yasuhiro)  (00422692)	東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・寄附講座教授    (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	柿沼 晴  (KAKINUMA Sei)  (30372444)	東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授    (12602)	

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