

機関番号：24303

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590791

研究課題名 (和文) HBV 組み込みが肝細胞のクローナルな増殖に果たす役割

研究課題名 (英文) Significance of HBV integration in clonal proliferation of hepatocytes

研究代表者

南 祐仁 (MINAMI MASAHIITO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：60326220

研究成果の概要 (和文)：

B 型肝炎ウイルスの DNA は、感染したヒト肝細胞の DNA の中に入り込みウイルス増殖が低下した後もヒトの DNA と共存して存在し続ける。本研究では、従来ランダムに起こるため、意義が少ないとされていた HBV 組み込みが、ある特定の領域に存在することが明らかになった。この領域には細胞増殖に関連した遺伝子が多くあり、HBV がヒトの遺伝子の活動を調節することによりウイルスの存続に有利な環境を作り、結果として肝発癌に関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Hepatitis B virus (HBV) DNA can be integrated into the host genome and co-exist after its replication become decreased. In this study we revealed that HBV integration does not occur randomly, but is preferentially located in the certain region of the host genome. In those regions, there are many human genes related to cell proliferation, suggesting that HBV integration plays some role in modulating cell cycle. This mechanism can be related to viral persistence in the host cells and resulting liver carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学 (肝臓学)

キーワード：B 型肝炎ウイルス, 肝発癌, 組み込み

1. 研究開始当初の背景

ウイルス遺伝子の宿主細胞への組み込みは、B 型肝炎ウイルス (HBV) を始め、レトロウイルス属やアデノウイルス、EB ウイルス、ヒトパピローマウイルスなど多くのウイルスで見られる現象である。ウイルス組み込みの意義は、従来、明らかではなかったが、近年、組み込まれたウイルス遺伝子が、宿主遺伝子の発現調節を修飾し、発癌や細胞のクロー

ナルな増殖に関与したと考えられる例が、さまざまな動物種で多数報告されてきている。ウイルスは自らの遺伝子を効率よく伝えていくために、癌抑制遺伝子やアポトーシスを阻害したり、細胞増殖を活性化させたりして、宿主細胞を長く存続させようとする機構を有しているが、ウイルスの組み込みも、こうした宿主細胞の維持・存続の一役を担っていることが示唆される。

HBV は肝癌の 90%以上でモノクローナルな組み込みが証明されるが、従来、その組み込み部位には一定の傾向はなく、ランダムに起こるとされていた。しかし、近年、PCR を応用した技術の進歩に伴い、解析症例が増加し、HBV のヒト遺伝子近傍への組み込みは稀な現象でなく、また、Ras シグナル調節、Ca シグナル調節、細胞周期、テロメアなどに関連した遺伝子の近傍に好発することが報告された。(Minami et al. Genomics 1995. Gozuacik et al. Oncogene 2001. Paterlini-Brechot et al. Oncogene 2003.) また、我々を含め、独立した複数の研究グループから肝癌細胞で hTERT (human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子の近傍に HBV が組み込まれ、hTERT の発現を亢進させ、細胞の不死化に関与していることが報告された。

(Horikawa et al. J Natl Cancer Inst 2001. Ferber et al. Oncogene 2003. Murakami, Minami et al. Gut 2005.)

こうした結果をふまえて、我々は、肝発癌に至る過程での HBV 組み込みに注目し、独自に開発した HBV-Alu PCR (Minami et al. Genomics 1995) を用いて、従来困難であった急性肝炎や慢性肝炎組織での HBV 組み込みを解析し、(i) 非癌組織においても HBV 組み込みが存在すること (Murakami, Minami et al. J Med Virol 2004), (ii) 慢性肝炎組織において、すでに HBV 組み込み細胞がオリゴクローナルに増殖し、Axin1 などの細胞増殖や癌抑制に関連した遺伝子の近傍に存在すること (Minami et al. Oncogene 2005) を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

(1) 慢性肝炎、肝硬変、担癌非硬変、肝癌組織における HBV 組み込み部位のデータベース化

さまざまな病期にある肝組織で HBV の組み込み部位を検索し、データベース化する。HBV における複数症例で共通の組み込み部位 (common integration sites) の同定により、肝細胞の維持・増殖に重要な領域の探索が可能であるが、さらに現在、retrovirus などで構築されつつある common integration sites のデータベース (Akagi et al. Nucleic Acids Res 2004) などとの比較により、ウイルス種を超えて重要な領域の同定も可能性がある。

(2) 染色体脆弱部位 (common fragile site ; CFS) への HBV 組み込みの証明

宿主への HBV 組み込みのデータベース解析により、組み込みが CFS に好発する可能性が指摘された。CFS は細胞増殖の際に転写、翻訳が活発であり、癌やウイルス組み込みの際の染色体の欠失や組み換えなどが起こり易く、また、その遺伝子変化に伴う細胞増殖の変化が起こる可能性のある部位である。HBV 組み込みが同部位にある頻度の高いことを証明

する。

3. 研究の方法

(1) 我々の開発した HBV-Alu PCR (Minami et al. Genomics 1995) により、慢性肝炎組織、肝癌組織、担癌非癌組織から HBV 組み込み部位を増幅し、そのクローニングと染色体上の位置を解析した。

(2) 染色体組み込み部位のヒト遺伝子に対し BAC プローブを設定した。健常者のリンパ球をアフィジコリン存在下で培養し、CFS に断裂を誘導し、BAC プローブがその断裂の近位部・遠位部のどちらに存在するかを、蛍光 in situ hybridization 法 (FISH 法) にて解析した。

4. 研究成果

5 例の慢性肝炎組織より HBV が宿主配列に組み込まれている部位を増幅し、プラスミドにクローニングした。慢性肝炎組織より約 100 クローンにおいて、HBV 組み込みとその近傍のヒトゲノム配列を同定しえた。これらをデータベースにて解析するとヒト染色体 3 番に統計学的に有意に高率に存在することがわかった。また、ヒト染色体上で細胞増殖の際に転写、翻訳が活発であり、癌やウイルス組み込みの際の染色体の欠失や組み換えなどの好発部位とされる CFS に存在すると推測されるものが 4 クローンあった。慢性肝炎組織から得られた組み込みが CFS にあるかどうかを証明し、さらに、HBV 組み込みが、CFS に好発することを癌においても確認するため、データベースに報告されている 16 の肝癌における HBV 組み込みを検索し、これらが CFS 上に存在するかどうかを同様に FISH で解析した。

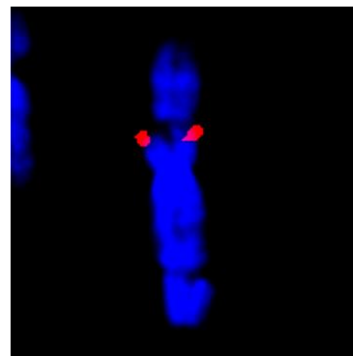


図. FISH 法による CFS の解析。プローブが染色体断裂部の近位、遠位の両方に検出されれば CFS 内にその配列が存在することが証明できる。

HBV 陽性肝癌においては、16 例中 5 例で CFS に HBV の組み込みが認められた。また、HBV 陽性慢性肝炎組織においては、20 例中 4 例で CFS に HBV 組み込みがあった。これは HBV 組み込みがランダムに起こると仮定した場合より有意に高頻度であり、HBV 組み込みが CFS

に好発することが証明された。

また、肝癌のみならず慢性肝炎の段階において、細胞の癌化に関連した遺伝子変異がすでに始まっていることを示唆する所見であった。

結論

(1) HBV 組み込みはランダムに起こるのではなく、染色体 3 番や染色体脆弱部位などの好発領域が存在する。

(2) HBV 組み込みは慢性肝炎の段階よりすでに存在し、肝発癌前の段階から、肝細胞の増殖を調節し、ウイルスの存続に優位な細胞環境を形成していることが示唆される。

(3) 染色体脆弱部位は従来より細胞増殖関連遺伝子の多く集まった領域とされており、この部位に組み込まれた HBV が細胞増殖の維持に重要な役割を果たしている可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 27 件)

- ① Tsuji K, Yasui K, Gen Y, Endo M, Dohi O, Zen K, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Taniwaki M, Tanaka S, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. PEG10 is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 査読有, 2010;198: 118-25.
- ② Minami M, Katayama T, Sendo R, Okanoue T, Yoshikawa T. Interferon and nucleoside analog combination therapy. *Clin J Gastroenterol* 査読有, 2010;3: 69-72.
- ③ Park H, Ishigami A, Shima T, Mizuno M, Maruyama N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. Hepatic senescence marker protein-30 is involved in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 査読有, 2010;45(4):426-34.
- ④ Yasui K, Harano Y, Mitsuyoshi H, Tsuji K, Endo M, Nakajima T, Minami M, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* 査読有, 2010;45(1):95-104.
- ⑤ Fujii H, Itoh Y, Ohnishi N, Sakamoto M, Ohkawara T, Sawa Y, Nishida K, Nishimura T, Yamaguchi K, Yasui K, Minami M, Okanoue T, Ohkawara Y, Yoshikawa T. Relapse of hepatitis C in a pegylated-interferon-alpha-2b plus ribavirin-treated sustained virological responder. *Hepatol Res* 査読有, 2010;40(6):654-60.
- ⑥ Park H, Hasegawa G, Shima T, Fukui M, Nakamura N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Kitawaki J, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. The fatty acid composition of plasma cholesteryl esters and estimated desaturase activities in patients with nonalcoholic fatty liver disease and the effect of long-term ezetimibe therapy on these levels. *Clin Chim Acta* 査読有, 2010; 11;411(21-22):1735-40.

- ⑦ Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanou T. Efficacy of long-term ezetimibe therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 査読有, 2011;46(1):101-7.
- ⑧ Yasui K, Sumida Y, Mori Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Kanemasa K, Matsubara H, Okanou T, Yoshikawa T. Nonalcoholic steatohepatitis and increased risk of chronic kidney disease. *Metabolism* 査読有, 2010;60(5):735-9.
- ⑨ Sumida Y, Yonei Y, Kanemasa K, Hara T, Inada Y, Sakai K, Imai S, Hibino S, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Yasui K, Minami M, Itoh Y, Naito Y, Yoshikawa T, Okanou T. Lower circulating levels of dehydroepiandrosterone, independent of insulin resistance, is an important determinant of severity of non-alcoholic steatohepatitis in Japanese patients. *Hepatol Res* 査読有, 2010;40(9):901-10.
- ⑩ Endo M, Yasui K, Nakajima T, Gen Y, Tsuji K, Dohi O, Zen K, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Taniwaki M, Tanaka S, Arii S, Okanou T, Yoshikawa T. Infrequent amplification of JUN in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 査読有, 2009;29: 4898-94.
- ⑪ Zen K, Yasui K, Nakajima T, Zen Y, Zen K, Gen Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Mitsufuji S, Tanaka S, Itoh Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Arii S, Okanou T, Yoshikawa T. ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer* 査読有, 2009;48(2):109-20.
- ⑫ Okanou T, Itoh Y, Hashimoto H, Yasui K, Minami M, Takehara T, Tanaka E, Onji M, Toyota J, Chayama K, Yoshioka K, Izumi N, Akuta N, Kumada H. Predictive values of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study. *J Gastroenterol* 査読有, 2009;44(9):952-63.
- ⑬ Miyagawa M, Minami M, Fujii K, Sendo R, Mori K, Shimizu D, Nakajima T, Yasui K, Itoh Y, Taniwaki M, Okanou T, Yoshikawa T. Molecular characterization of a variant virus that caused de novo hepatitis B without elevation of hepatitis B surface antigen after chemotherapy with rituximab. *J Med Virol* 査読有, 2008;80: 2069-78.
- ⑭ Inagaki Y, Yasui K, Endo M, Nakajima T, Zen K, Tsuji K, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arii S, Okanou T. CREB3L4, INTS3, and SNAPAP are targets for the 1q21 amplicon frequently detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 査読有, 2008;180(1):30-6.
- ⑮ Nakajima T, Yasui K, Zen K, Inagaki Y, Fujii H, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arii S, Inazawa J, Okanou T. Activation of B-Myb by E2F1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 査読有, 2008;38(9):886-95.
- ⑯ Gen Y, Yasui K, Zen K, Nakajima T, Tsuji K, Endo M, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Tanaka S, Taniwaki M, Arii S, Okanou T, Yoshikawa T. A novel amplification target, ARHGAP5, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 査読有, 2008;275(1):27-34.
- ⑰ Fujii H, Takagaki N, Yoh T, Morita A, Ohkawara T, Yamaguchi K, Minami M, Sawa Y, Okanou T, Ohkawara Y, Itoh Y. Non-prescription supplement-induced hepatitis with hyperferritinemia and mutation (H63D) in the HFE gene. *Hepatol Res* 査読有, 2008;38(3):319-23.
- ⑱ Mitsuyoshi H, Itoh Y, Sumida Y, Minami M, Yasui K, Nakashima T, Okanou T. Evidence of oxidative stress as a cofactor in the development of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 査読有, 2008;38(4):348-53.
- ⑲ Okanou T, Itoh Y, Minami M, Hashimoto H, Yasui K, Yotsuyanagi H, Takehara T, Kumada T, Tanaka E, Nishiguchi S, Izumi N, Sata M, Onji M, Yamada G, Okita K, Kumada H. Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum aminotransferase based on platelet counts. *Hepatol Res* 査読有, 2008;38(1):27-36.
- ⑳ Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo

M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. Hepatol Res 査読有, 2008;38(4):348-53.

〔学会発表〕(計 22 件)

- ① 千藤麗, 南 祐仁, 宮川昌巳, 藤井恒太, 安居幸一郎, 伊藤義人, 嘉数直樹, 岡上武, 吉川敏一. 染色体脆弱部位は、HBV 感染肝細胞における HBV DNA 組み込みの標的部位である. 第 45 回日本肝臓学会総会. ワークショップ 4; B 型肝炎の基礎と臨床. 2009 年 6 月 4 日, 神戸

〔図書〕(計 1 件)

- ① 山口寛二, 伊藤義人, 新美敏久, 光吉博則, 安居幸一郎, 南 祐仁, 岩井眞樹, 岡上 武, 吉川敏一. 中外医学社, 東京. 肝硬変の成因別実態と肝癌合併例の検討. 肝硬変の成因別実態 2008. 178-80, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 祐仁 (MINAMI MASAHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号: 60326220

(2) 研究協力者

宮川 昌巳 (MIYAGAWA MASAMI)
京都府立医科大学・大学院生

千藤 麗 (SENDO REI)
京都府立医科大学・大学院生

片山 貴之 (KATAYAMA TAKAYUKI)
京都府立医科大学・大学院生