

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08303

研究課題名(和文) 遺伝子改変iPS細胞を用いたHBVゲノムの組み込みによる発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文) The analysis of molecular mechanisms for HBV integration-induced hepatocarcinogenesis by using gene edited human iPS cells.

研究代表者

新田 沙由梨(Nitta, Sayuri)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20527056

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(HBV)感染では、ウイルスゲノムがヒトゲノムに組み込まれる integration が肝癌発生に関与していると考えられている。本研究では、ヒトiPS細胞のTERT promoter領域にHBVゲノムの一部を挿入した integration モデル細胞と、TERT領域にHBV integration を認める肝癌検体を用いて検討を行い、integrationによりTERTの発現が上昇すること、TERTとHBV両方の配列を含む融合転写産物の発現を認めることを示した。また細胞分裂や細胞周期、細胞接着やアポトーシスなどに関連する遺伝子発現の変動を認め、肝癌発生に関与してい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

肝癌の主な成因の一つであるB型肝炎ウイルス(HBV)感染ではウイルスゲノムの一部がホストゲノムへ挿入(integration)されることが知られており、発癌に関与していると考えられている。HBV integrationは肝癌の若年発生や予後不良、非肝硬変での発生に関与していることが示唆されている。本研究では、HBVのintegrationによって特徴的に発現する転写産物や発現に変化を認める遺伝子の一部を同定した。これはHBV integrationが関与する肝癌の発生メカニズムを明らかにするための知見となると考えられ、更なる研究の遂行により新たな肝癌治療開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：On hepatitis B virus (HBV) infection, the integration of the viral genome into the human genome maybe involved in the development of liver cancer. In this study, we established the integration model cells by inserting the HBV genome into the TERT promoter region of human iPS cells. By using these integration model cells, and tissue samples of hepatocellular carcinoma in which HBV integration was observed in the TERT region, we found that HBV integration contributed the enhanced expression of TERT and also found the expression of fusion transcripts containing both TERT and HBV sequences. In addition, changes in gene expression related to cell division, cell cycle, cell adhesion, apoptosis, etc. were observed. These results suggested their involvement in hepatocarcinogenesis.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：肝癌 HBV integration

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(HCC)は本邦における癌死亡者の上位に位置しており、その死亡者数は近年でも依然として毎年約3万人以上と多く、疾患克服への対策が求められている。HCCの成因の内訳をみると、近年ではウイルス性肝炎は減少傾向である一方、非アルコール性脂肪性肝炎が増加傾向にあり、その割合には変化を認める。しかしながら、依然としてウイルス性肝炎の割合が最も高い。中でもB型肝炎におけるウイルス排除は現状では困難であることから、B型肝炎ウイルス(HBV)感染による肝発癌は、当面大きくは減少しないと考えられる。

HBV関連肝癌の特徴として、肝硬変からの肝発癌の他、ウイルスDNAがホストゲノムに組み込まれる(integration)ことによる発癌が知られており、肝炎・肝線維化が進行していない若年の段階から発癌することが大きな問題である。ウイルスDNAのintegrationによる発癌は、他の成因で共通してみられる慢性炎症による発癌とは異なると考えられ、そのメカニズムの解明は必須である。

HCCの治療は、近年の分子標的薬の開発によりその治療効果が期待されているだけでなく、治療戦略にも変化が現れてきている。一方で、既報からもHCCの発生と進展には成因により異なるメカニズムが関わると考えられるが、HCCの治療は成因に関わらず一定の戦略で進められているのが現状である。様々な新規抗腫瘍薬が開発されていく中で、今後成因あるいは発癌機序に応じた治療戦略を立てることで、より効率的な治療効果が発揮できる可能性がある。そのためには成因に応じた肝発癌メカニズムの差異を詳細に解明する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、HBV感染関連肝細胞癌におけるHBV DNAのホスト側の挿入部位として最も頻度が高くみられるTERT promoter領域へのintegrationに主に焦点を当て、ヒトiPS細胞に遺伝子編集技術を用いてHBVゲノムをホストゲノムの標的遺伝子特異的に挿入することにより、HBV integrationモデルを構築し、integrationによる発癌機構の解明を目的とする。これらの研究により、HBV肝癌の病態解明のみならず、発癌メカニズム特異的な肝癌治療戦略の確立、および新規治療薬開発に寄与しうる学術的基盤の創出を目指す。

### 3. 研究の方法

(1)ヒトiPS細胞のTERT promoter領域に、ゲノム編集技術を用いてHBV DNA配列の一部を挿入したHBV integrationモデルiPS細胞を樹立した。HBV配列については、HBx領域と、HBxおよびHBx promoter/enhancerを含む配列を挿入した二種類を作成した。

(2)(1)で樹立したintegrationモデルiPS細胞を肝細胞系譜細胞(iPS-hep細胞)へ分化誘導した

(3)integrationモデル細胞におけるTERT、HBVおよび増殖関連遺伝子やTERT関連遺伝子等の発現についてRT-qPCRにより解析、タンパク質発現をwestern blottingにて解析した。iPS-hep細胞に分化誘導した状態において、非ゲノム編集細胞を対照としてintegrationモデル細胞における遺伝子発現を比較した。TERT、HBVの発現については未分化iPS状態を対照としてiPS-hepに分化誘導した時の遺伝子発現変化についても評価した。

(4)(2)についてRNA sequenceによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(5)TERT領域にHBVゲノムがintegrationしていることが判明している肝癌組織検体と同一症例の非癌肝組織をペアとして、RNA sequenceによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。

### 4. 研究成果

樹立したHBV integrationモデルiPS細胞は未分化iPS細胞マーカーであるOCT3/4やNANOGなどの遺伝子を発現することを確認した。また、肝細胞系譜細胞への分化誘導が可能であることを確認した。

RT-qPCRによる遺伝子発現解析では、integration細胞でHBV配列を含む転写産物の発現を認め、その発現はiPS-hep細胞への分化誘導によって亢進することが明らかとなった。また、iPS-hep細胞において、TERT遺伝子の発現はintegration細胞で非ゲノム編集細胞よりも高い発現を示した。さらにTERT、HBxの発現についてHBx領域のみを挿入したモデルに比し、HBVのpromoter/enhancer領域を含む配列を挿入したモデルとの間では高い発現を示した。このことはHBVのpromoter/enhancer配列の挿入が肝癌の病態に重要であることを示唆するものと思われる。

integration細胞のRNA sequence解析ではTERTの他、肝癌にかかわる既知の遺伝子および他癌との関連が報告されている複数の遺伝子がDEGsとして抽出された。また、TERTとHBV両方の配列を含む融合転写産物が少量ながら検出された。

一方、肝癌組織検体のRNA sequence解析では、非癌組織と比し、細胞周期や細胞分裂に関わる経路が亢進しており、また細胞接着やアポトーシスに関連する遺伝子の変動が示唆された。更に、

肝癌検体においても TERT と HBV 両方の配列を含む融合転写産物が発現していることが示された。これらの遺伝子発現変動や融合転写産物の発現が悪性形質獲得に関与している可能性があると考えられ、更なる研究の推進がメカニズム解明につながると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 新田 沙由梨、柿沼 晴、稲田賢人、持田 知洋、渡壁 慶也、志水 太郎、土屋 淳、三好 正人、金子俊、北畑 富貴子、村川 美也子、井津井 康浩、中川 美奈、朝比奈 靖浩
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いたHBV integrationモデルの樹立と悪性形質獲得に関わる分子機構の解析
3. 学会等名 第44回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田 沙由梨、柿沼 晴、持田 知洋、渡壁 慶也、志水 太郎、土屋 淳、三好 正人、北畑 富貴子、村川 美也子、井津井 康浩、中川 美奈、東 正新、朝比奈 靖浩
2. 発表標題 TERT領域へのHBVゲノム挿入が癌形質獲得に与える影響
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋 淳、柿沼 晴、朝比奈 靖浩
2. 発表標題 B型肝炎ウイルスのMLL4領域へのintegrationによる発癌メカニズムの解析
3. 学会等名 第26回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋淳、柿沼晴、朝比奈靖浩
2. 発表標題 ヒトiPS由来細胞を利用したB型肝炎ウイルスゲノム挿入による発癌プロセスの解析
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志水太郎、柿沼晴、朝比奈靖浩
2. 発表標題 網羅的遺伝子発現解析によるヒトiPS細胞由来肝細胞オルガノイドの形質解析
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新田沙由梨、柿沼晴、朝比奈靖浩
2. 発表標題 HBV genome integration肝細胞癌における遺伝子発現の特徴と発癌機序の検討
3. 学会等名 第57回肝臓学会総会
4. 発表年 2021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 and 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

1. 発表者名 村川美也子、朝比奈靖浩、中川美奈、北畑富貴子、志水太郎、土屋 淳、佐藤綾子、新田沙由梨、井津井康浩、東 正新、柿沼 晴
2. 発表標題 核酸アナログによるHBV制御後の発癌予測因子の検討
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会
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 分担者	朝比奈 靖浩  (Asahina Yasuhiro)  (00422692)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教授   (12602)	
研究 分担者	柿沼 晴  (Kakinuma Sei)  (30372444)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・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
---------	---------