

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790663

研究課題名（和文）B型肝炎ウイルスの肝癌特異的変異と相互作用するホスト因子の解明

研究課題名（英文）Interaction Human hepato-cell between Hepatocellular carcinoma specific HBV mutation

研究代表者

新海 登 (Shinkai Noboru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医

研究者番号：30543988

研究成果の概要（和文）：B型慢性肝炎患者の肝癌患者とHBx蛋白の94、130、131番のアミノ酸変異が関係している。HBxの野性株を発現するHBxトランスジェニックマウス(TGM)であるWild TGM、HBx蛋白の130、131番のアミノ酸変異したHBxを発現するTGMであるWM TGM、HBx蛋白の94、130、131番のアミノ酸が変異したHBxを発現するTGMであるMM TGMを作製した。Wild TGMにおいてHBxの発現に依存して肝癌を認めた。MM TGMはHBxの発現がwild TGMとWM TGMに比べて低いにもかかわらず肝癌を観察した。細胞増殖に関わる因子として、gene1(便宜上こう呼ぶ)とcyclin B1が3種のTGMにおいてB6Jマウスに比べてmRNAの発現が増大していた。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that HBx 94, HBx131 and HBx130 amino acid mutations associate with HCC patients infected with hepatitis B virus. We made wild 3 HBx expressing transgenic mouse (wild TG mouse (2 strain), WM TG mouse (2 strain) and MM TG mouse (3 strain)). Wild TG mouse was wild HBx expressing transgenic mouse. WM TG mouse was HBx with HBx131 and HBx130 amino acid mutations expressing transgenic mouse. MM TG mouse was HBx with HBx 94, HBx131 and HBx130 amino acid mutations expressing transgenic mouse. In wild TG mice, hepatocellular carcinogenesis is dependent on quantity of HBx expression. MM TG mice are relatively smaller expression of HBX than wild TG mouse and WM TG mouse, but HCC developed in MM TG mouse. Gene1 (for so it will be convenient to speak of it) and cyclin B1 mRNA were expressed more in 3 HBx expressing transgenic mouse than in B6j mouse. But there was not difference among 3 HBx expressing transgenic mice on these expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

キーワード：B型肝炎、ウイルス、細胞増殖、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

B型慢性肝炎は肝発癌の危険因子である。B型肝炎ウイルスの産生する蛋白であるHBX蛋白は肝発癌に関係するとの報告が多数あるがその機序については諸説あり、いまだ一定の見解が得られていない。我々は今までの検討においてB型慢性患者において肝癌患者群と非肝癌患者群の2群間においてHBX蛋白のアミノ酸の特異的部位が異なることを報告した。

2. 研究の目的

HBX 蛋白のアミノ酸変異が肝発癌に寄与するか否かを in vivo と in vitro にて証明したい。

3. 研究の方法

野生株の HBx 遺伝子トランスジェニックマウスをコントロールとして、肝発癌に特異的なアミノ酸変異をいれた HBx 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスと比較する。in vitro において HBX 蛋白の変異の有無によって発現変動する mRNA が細胞増殖に関わるものであったため、トランスジェニックマウスにてもその mRNA の発現が野生の HBx 遺伝子とアミノ酸変異を入れた HBx 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスとの系統間で差があるかを確認する。

4. 研究成果

以前の我々の検討により肝癌患者と非肝癌患者において感染している HBV の HBx 蛋白が肝癌患者においては 94 番目のアミノ酸がチロシンに、130 番目のアミノ酸がメチオニンに、131 番目のアミノ酸がイソロイシンに優位に変異していた。

そこで HBx 蛋白のこれらの変異による肝発癌に対する影響を調べるために以下の (1) ~ (3) のマウスを作製し、週齢 84 週前後で解剖した。

(1) HBV genotype C の野生株からの HBX 蛋白とそのプロモーターを導入したトランスジーンを導入したマウス (Wild TG マウス)。
2 系統 C57BL/6J-TgN(HBX/c/wt)01、C57BL/6J-TgN(HBX/c/wt)03(それぞれ WT01、WT03 とする)。

(2) (1) の HBX 蛋白を肝癌患者にみられた 130 番目のアミノ酸がメチオニンに、131 番目のアミノ酸をイソロイシンに変異させたトランスジーンを導入したマウス (WM TG マウス)。

2 系統 C57BL/6J-TgN(HBX/c/wm)01、C57BL/6J-TgN(HBX/c/wm)02 (それぞれ WM01、WM02 とする)。

(3) (1)のHBX蛋白を肝癌患者にみられた94番目のアミノ酸がチロシンに130番目のアミノ酸がメチオニンに131番目のアミノ酸がイソ

ロイシンに変異させたトランスジーンを導入したマウス (MM TGマウス)。

3系統 (それぞれMM02、MM03、MM02×03とする。)

(1)、(2)、(3)のそれぞれの系統におけるHBx/GAPDH mRNA発現比、腺腫、肝癌の出現数を表1に示す。

	例数	臓の数	臓/全臓数	連発平均	HBx mRNA/GAPDH mRNA	腺腫	癌
C57BL/6J-TgN(HBX/c/wt)01	25	19	54.2	845 ± 9.7	0.439 ± 0.056	2	0
C57BL/6J-TgN(HBX/c/wt)03	14	9	64.2	811 ± 8.2	0.252 ± 0.128	0	0
C57BL/6J-TgN(HBX/c/wm)01	16	8	50.0	814 ± 7.8	0.114 ± 0.173	0	1
C57BL/6J-TgN(HBX/c/wm)02	48	27	55.1	808 ± 4.6	0.333 ± 0.281	0	1
C57BL/6J-TgN(HBX/c/mm)02	23	26	49.1	821 ± 7.1	0.042 ± 0.006	0	2
C57BL/6J-TgN(HBX/c/mm)03	21	17	81.0	852 ± 9.0	0.030 ± 0.020	1	0
C57BL/6J-TgN(HBX/c/mm)02 × 03	26	16	44.4	782 ± 2.9	0.003 ± 0.001	0	1

表1 HBxトランスジェニックマウスの剖検結果

Wild TGマウス中ではHBxmRNAの発現量が高い系統であるWT01から腺腫が2例出現したが癌は認めなかった。WM TGマウスではHBxmRNAの発現量がwildと比べやや少ないにもかかわらず、肝癌が出現した。MM TGマウスではwildやWMの10分の1から100分の1のHBxの発現量であったにもかかわらず肝発癌がみられた。

(図1)



図1 MMTG マウスにおける肝癌肉眼標本

そのため、wild typeにくらべてアミノ酸変異をもつHBx 蛋白は病原性が高いと推測された。

HepG2 細胞に HBX の発現ベクター(野性株、上記の変異株をの HBx 蛋白の構造をもち、プロモーターは HBV のナチュラルプロモーター)をトランスフェクションしたところ、94 番のアミノ酸がチロシンに変異した (マウスでいう MM に相当)が野性株(マウスでは WT に相当)に比べて、Cdk1/cyclinB1 のインヒビターであるとの報告がある gene1(便宜上こう呼ぶ)の mRNA の発現が up していた。

そこでgene1とcyclinB1についてそれぞれのHBxトランスジェニックマウスにてmRNAの発現を確認してみた。(表2)

	L1 例数	DEDD 2%ΔΔCt)			CyclinB1 2%ΔΔCt)			Pola1 2%ΔΔCt)		
		Ave (all)	Ave (all-tumor)	Ave (tumor)	Ave (all)	Ave (all-tumor)	Ave (tumor)	Ave (all)	Ave (all-tumor)	Ave (tumor)
C57BL/6J-TgN(HBX)cm001	35	2.27	2.43	0.83	6.21	4.91	17.59	1.14	1.09	1.58
C57BL/6J-TgN(HBX)cm003	14	1.88			1.01			1.03		
C57BL/6J-TgN(HBX)cm01	16	3.02	3.09	1.97	5.27	1.87	59.75	0.74	0.73	0.77
C57BL/6J-TgN(HBX)cm02	50	1.64	1.65	0.86	5.88	2.53	175.08	1.49	1.44	4.08
C57BL/6J-TgN(HBX)cm02	55	2.15	2.18	1.32	3.87	2.82	31.60	1.84	1.59	2.82
C57BL/6J-TgN(HBX)cm03	22	1.61	1.61	1.66	10.58	8.03	110.58	1.00	0.93	2.49
C57BL/6J-TgN(HBX)cm02x03	17	1.53	1.54	0.95	2.28	2.13	7.73	1.48	1.48	1.43

表2 各HBxトランスジェニックマウスとDEDD, CyclinB1, PolaAの発現

※ B6Jマウスでの発現との比で表記

肝臓内のgene1のmRNAに関してGAPDHのmRNAで補正後HBx発現遺伝子を導入していないB6Jマウスとの比により検討した。トランスジェニックマウス全体において1.5~3倍 同じ週齢のHBx発現遺伝子を導入していないB6Jマウスより発現が上昇していた。HBxとgene1の発現の相関に関して検討してみたところ、HBxの発現がWT01とMM02に関していえばgene1とHBxの発現には正の相関が認められた。しかしながら他系統において相関は認めなかった。

つぎにcyclin B1について検討した。これに関してHBxトランスジェニックマウス全体において1.8~6倍 同じ週齢のHBx発現遺伝子を導入していないB6Jマウスより発現が上昇していた。

Leeらの報告ではHBx蛋白をテトラサイクリンで発現制御する肝がん細胞モデルにおいてはテトラサイクリン除去後(つまりHBxの発現を誘導する)12時間後にcyclin B1のmRNAが上昇

していた(Leeら The Journal of biological chemistry 2002)。今回のHBxトランスジェニックの生体内でも同様の結果であった。

腫瘍に関してはWT(腺腫)、WM01(肝癌)、WM02(肝癌)、MM02(肝癌)、MM03(腺腫)MM02×MM03(腺腫)のGAPDHに対するcyclinB1の発現比(cyclinB1 / GAPDH (-ΔΔCt))の平均はそれぞれ17.59、59.75、175.08、31.60、110.56、7.73となっており、腺腫や肝癌でcyclinB1の発現が上昇していた。cyclinB1の高発現の癌は予後が悪く、MM03に認めた腺腫に関してはWTに認めた腺腫に比べcyclinB1のmRNAの発現は高値であったため、将来的に悪性の転帰をたどる可能性が示唆された。

HBx 発現マウスにおいて gene1 と cyclin B1 の相反する両者の mRNA の高発現については他からのインタラクションを含めて検討を要する。HBx に関しては cyclinB1-CDK1 kinase の持続活性化により G2/M arrest が起きているという報告があり (Chen ら Oncology Reports 2009)、TG マウスの肝細胞でも細胞周期を確認する必要がある。つぎに HepG2 細胞に HBX の発現ベクター(野性株、上記の変異株をの HBx 蛋白の構造をもち、プロモーターは HBV のナチュラルプロモーター)をトランスフェクションしたところ、130番目のアミノ酸がメチオニンに131番目のアミノ酸がイソロイシンに変異した株(マウスではWM MM)においては野性株(マウスではWT)に比べてgene2(便宜上こう呼ぶ)のmRNAは減少していた。しかしながらgene2に関しては in vitroと異なり、HBxトランスジェニックマウスと同じ週齢のHBx発現遺伝子を導入していないB6Jマウスとの間に差は認めなかった。(表2)

130番目のアミノ酸がメチオニンに131番目のアミノ酸がイソロイシンに変異がホスト肝細胞に影響を与えるかどうかに関しては、KwunらのHepG2細胞を使った検討において、130番目のアミノ酸のメチオニンへの変異がp21の発現に影響を与えることが報告されている(KwunらNucleic Acids Research 2004)。P21は先述のcyclinB1を阻害することが知られており、130番や131番目のアミノ酸変異が細胞周期に影響を与える可能性が有るため、今後検討をしたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新海 登 (Shinkai Noboru)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床
研究医

研究者番号：30543988