

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590964

研究課題名(和文) B型肝炎の肝発癌におけるHBx遺伝子の役割の網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of HBx in the HBV-related hepatocarcinogenesis

研究代表者

四柳 宏 (Yotsuyanagi, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30251234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：まず肝癌細胞株(PLC/PRF/5)でのHBx遺伝子の組み込みをFISH法で調べたところ、複数の染色体に組み込みがあることが判明した。組み込みの網羅的解析のために次世代シーケンサーを用いて解析を行ったところ、11本の染色体上にHBVの組み込みがあることが判明した。このうち第5染色体上への組み込みはhTERTのプロモーター部位に認められた。さらに組み込み部位近傍でのメチル化の検討を行ったところ全般に低下していた。次いで肝細胞癌患者の切除検体を用いて同様の検討を行った。SLC6A13, FN1など複数の遺伝子にHBVの組み込みが認められた。

研究成果の概要(英文)：First we analyzed the integration of HBx gene into the chromosome of PLC/PRF/5 cells using fluorescence in situ hybridization, which disclosed the integration of HBx into plural chromosomes. For further analysis, we determined the integrated HBV sequences with the adjacent host genes using next generation sequencer, which disclosed that HBV was integrated into 11 chromosomes. On chromosome 5, HBx gene was integrated into the promoter region of hTERT. The methylation of CpG island in the HBV and adjacent host DNAs were low, which suggested that methylation may play some role in the HBV-associated hepatocarcinogenesis.

Next we analyzed HBV-HCC samples obtained on hepatectomy. HBV was integrated into multiple host DNA, including SLC6A13 and FN1.

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 組み込み X遺伝子

1. 研究開始当初の背景

本邦の肝細胞癌症例の約2割が HBs 抗原陽性である。非B非C型肝炎細胞癌及びC型肝炎細胞癌の発癌にもHBVは関与していることを示唆する可能性があり、我々もこれまで報告してきている。従ってB型肝炎細胞癌の発症機序を解明することは極めて重要なことである。

応募者はこれまでHBVによる肝発癌のメカニズムに関して様々な検討を行ってきた。X遺伝子とその転写調節領域と共にヒト遺伝子に組み込んだトランスジェニックマウスの75%に肝細胞癌が発生すること、その発癌メカニズムとして、X蛋白が過剰に産生されることにより、細胞回転を早めることが考えられることを報告してきた。また、X遺伝子の転写調節領域の下流にHCVコア遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスも高率に発癌に至ることも報告した。一方、国内外の他の研究者がアルブミンなど肝特異的な遺伝子の転写調節領域の下流にX遺伝子やHCVコア遺伝子を組み込んで発癌が起きなかった。従ってHBV関連肝細胞癌においては、X遺伝子の転写調節領域の果たす役割が肝発癌においては大きいものと考えられる。

トランスジェニックマウスに類似した“X遺伝子の転写調節領域の下流にX遺伝子が組み込まれた”状態があるかどうか検討する目的でXの転写調節領域の上流にプライマーを設定したAlu-PCRを行った。その結果、以下の3点が判明した。

(1) 腫瘍部、非腫瘍部の肝組織にHBx遺伝子の組み込みが認められた。

(2) PCR産物のクローニングによる検討の結果、腫瘍部ではHBx遺伝子の転写調節領域からHBx遺伝子の全長が組み込まれているクローンが多くとれてきた。一方、非腫瘍部では、HBx遺伝子の組み込みはあるものの、X遺伝子の全長が組み込まれたクローンの割合が少なかった。

(3) 組み込みの部位は一定ではないものの、様々な遺伝子のイントロン配列内に集中していた。

これらの事実は、以下のことが腫瘍部で選択的に起きている可能性を示唆する。

(1) 組み込まれたHBx-DNAの転写調節領域により、HBx-mRNAの産生が亢進する。

(2) 下流の宿主蛋白mRNAが過剰発現する。

(3) 組み込まれたHBx-DNAからHBx蛋白が肝産生され、他の遺伝子をトランスに活性化する可能性がある。

ことに(3)はトランスジェニックマウスで起こった現象とよく似ている。

2. 研究の目的

本研究では、我々が前述の予備実験で発見

した現象が普遍的なものであるかどうかについて症例を増やして検討する。その上でHBx遺伝子及び蛋白の過剰発現が実際のB型肝炎細胞癌で起こっているかどうか確認する。さらに、腫瘍部(HBx遺伝子の全長が組み込まれていることが多い)と非腫瘍部(HBx遺伝子の組み込みはあるものの、X遺伝子の全長が組み込まれたクローンの割合が少ない)ではX遺伝子及び蛋白の発現レベルが違っていると予想されるため、この点も検討する予定である。

3. 研究の方法

まず、培養細胞株を用いた検討を行い、どの部位に組み込みが起こっているかを明らかにする。その部位が転写調節部位であれば、下流の遺伝子の過剰発現が起きているかどうかの検討を行う。

次いで臨床サンプルを用いて同様の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた検討

肝癌細胞株であり、HBVの組み込みがある細胞株としてPRF/PLC/5がある。この細胞株への組み込み部位に関してはいくつかの報告があるものの、一定の見解はない。

組み込みの網羅的解析としてHBVの組み込みをfluorescence in situ hybridization (FISH)法を用いて調べた。市販のプロープでは蛍光シグナルが認められなかったため、HBV DNA全体をカバーするように10種類のプロープを作成してFISHを行った。その結果HBx領域の前端を含む2種類のプロープで主に蛍光が認められた。これら2種類のプロープによる蛍光は複数の染色体に認められた(図1)。即ちHBx領域前半を中心とした組み込みが複数の染色体上に認められることが判明した。

組み込まれた宿主DNAの解析を目的として、HBx領域に設定した複数のプライマー及び繰り返し配列としてAlu配列を有するプライマーを用いてAlu-PCRを行った。その結果第5染色体上のhTERTのプロモーター領域への組み込みが認められた(図2)。

これ以外の部位への組み込みの解析を行う目的で次世代シーケンサーを用いた検討を行うこととした。Genotype AからGenotype Jまでの代表的な配列及びPRF/PLC/5のゲノムの全配列をカバーするようにbaitを作成し、次世代シーケンスを行った。

得られたシーケンスは約92000リードであり、これらにはHBV配列を含む多数の配列が含まれていた。組み込まれたHBVはGenotype Aであった。

組み込まれた宿主遺伝子にはExonは含まれておらず、Intron 40%、Intergenic 40%、promoter 7%、divergent promoter 13%が含まれていた。prompter配列の中には

Alu-PCR で得られたものと同じ配列が認められた。

(2) 臨床サンプルを用いた検討

次いで臨床検体（4症例の腫瘍部と非腫瘍部）を用いた検討を行った。現在解析の進行中であるが、FN1 など複数の遺伝子に HBV の組み込みが認められている。

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 2件）

1. Hiraishi T, Watanabe Y, Oikawa R, Hara M, Kiyokawa H, Yoshida Y, Yamada N, Okuse C, Suzuki M, Yotsuyanagi H, Itoh F. A new detection method for integration of hepatitis B virus DNA in PLC/PRF/5 Cells. St. Marianna University Journal. 2012;3:63-72.
2. Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyoda M, Arai S, Yotsuyanagi H, Itoh F, Koike K.

〔学会発表〕（計 2件）

1. 平石哲也, 渡邊嘉行, 及川律子, 重福隆太, 大石嘉恭, 山田典栄, 高橋秀明, 奥瀬千晃, 四柳宏, 伊東文生. PLC/PRF/5 細胞株における B 型肝炎ウイルス DNA の組み込み形態. 日本消化器病学会総会. 2012 年, 東京都
2. 四柳宏, 渡邊嘉行, 山本博幸, 及川律子, 山田典栄, 森屋恭爾, 伊東文生, 小池和彦. B 型肝炎細胞癌における組み込みの意味. 日本肝臓学会総会. 2014 年, 東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

四柳 宏 (Yotsuyanagi, Hiroshi)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30251234

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

図1：FISH法によるHBVの染色体への組み込みの検出

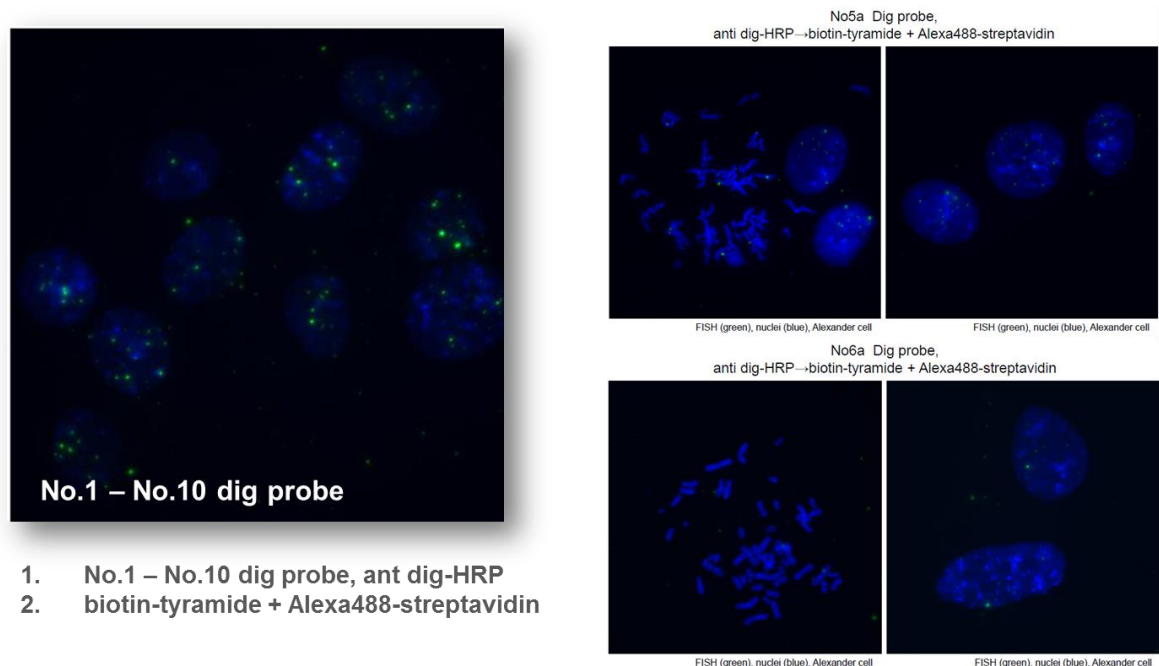


図2：Alu-PCR法を用いた第五染色体への組み込み部位の同定

