

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10168

研究課題名(和文) C型肝炎治癒後肝癌の革新的なエピゲノム・トランスクリプトーム解析と発癌機構の解明

研究課題名(英文) Comprehensive epigenome-transcriptome analysis of hepatocellular carcinoma after eradication of hepatitis C

研究代表者

杉町 圭史 (SUGIMACHI, KEISHI)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・肝胆膵外科医長

研究者番号：90452763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌患者の血漿中の細胞外小胞(エクソソーム)より再発特異的なマイクロRNA(miR)を同定した。その標的遺伝子としてHOXB8が再発に関わっていることを明らかにした。肝癌患者の骨髄細胞のmiR発現解析により単球およびリンパ球分画で再発に関与して有意に発現が変化するmiRが同定された。C型肝炎治癒後肝癌の網羅的メチル化解析でウイルス消失後も非癌部肝組織のメチル化異常が維持されていることを明らかにした。これらの知見より宿主細胞のエピゲノムによる機能変化が肝癌再発に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify epigenomic alteration for carcinogenesis and recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC). We employed microarray-based profiling of micro RNA (miR) expression from exosome in plasma of HCC patients. We found miRs which were associated with HCC recurrence. Decreased expression of miR-718 was associated with proliferation and recurrence of HCC by targeting HOXB8. Then, miR expression analysis of bone marrow cells in HCC patients was employed. We identified altered miR expression in macrophage and lymphocyte fractions involved in recurrence. The comprehensive methylation analysis of whole genome was done in HCC patients with or without hepatitis C. The analysis revealed that differentially methylated regions of noncancerous liver tissue was maintained even after eradication of virus. These findings indicated that epigenomic alteration of host cells are involved in recurrence of HCC.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 ウイルス学的著効 エピゲノム メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

### (1)肝細胞癌の予後と治療法

本邦において肝細胞癌(HCC)は死亡者数第3位、罹患率第4位を占めている。肝癌に対して切除、局所療法、塞栓療法、肝移植などの集学的な治療が発展してきたが、ほとんどの患者がウイルス性肝炎や肝硬変を合併していることもあり未だに治療後に高頻度に再発を来し、全症例の5年生存率は35.4%である。このような現況を踏まえるとHCCの治療成績の向上のためにはその腫瘍の分子的性質を解析し、HCCに特異的な新しいバイオマーカーの探求や分子標的治療の開発が急務である。

### (2)C型肝炎治療後の肝細胞癌の発生

抗C型肝炎ウイルス治療の飛躍的な発展によって、肝炎ウイルスが消失し肝炎が鎮静化する＝ウイルス学的著効(SVR)を示す症例が増えている。以前はインターフェロン治療によって約50%の患者でSVRとなったが、近年はウイルスプロテアーゼ薬の開発などによって約90%の患者でSVRを得られるようになった。今後はさらにインターフェロン注射なしの経口薬のみによる治療も可能になると言われている。抗ウイルス療法でSVRを達成すれば、肝線維化の進展や発癌が抑えられるが、治療が著効してSVRを達成した患者が、治療後何年もたってから肝癌を発症する、いわゆる「SVR発癌」が、近年問題になっている。我々は、SVR後に発生した肝癌は肝切除によって治療することで再発が少ないことを報告したが、しかし一方でウイルス消失後も発癌や多中心性再発が起こりうる事を報告した(Sugimachi K. et al. *Hepatology* 2013)。SVR後発癌の高危険群を分類する因子がないことから、発癌率が低率であるのにも関わらず現在はウイルス消失後も全員がHCCに対するスクリーニング検査を定期的に一生受ける必要がある。そのためSVR発癌を予測するバイオマーカーの同定は、真の発癌感受性因子を同定することで癌の早期発見など臨床的に有意義であるだけでなく、無駄な治療費を減らす点で医療経済的にも有用である。さらに、SVR後肝癌再発機序の解明は、最近増えている非ウイルス性の糖尿病・メタボリックシンドローム関連HCCの発癌機序に解明にも繋がる可能性がある。

### (3)肝細胞癌とマイクロRNA・エクソソーム

総数2000個のマイクロRNAは約2万5千以上におよぶ遺伝子群を多面的に制御している。リン脂質の二重脂質の膜で構成された細胞外小胞＝エクソソーム内に特定のマイクロRNAが選択的に存在し、細胞から分泌されて腫瘍細胞、腫瘍関連間質細胞あるいは免疫細胞の細胞間の情報交換などに重要な役割を果たすことがわかってきた(Valadi H et al. *Nat Cell Biol* 2007)。発癌における重要なエクソソーム

内に存在するマイクロRNAの同定は、癌の発生・進展を効率よく制御する「真の標的因子」となることが期待される。現在の臨床現場で肝癌の術後の再発や予後を予測できるマーカーとしては、臨床因子(年齢、肝炎ウイルスの有無、血液検査による肝機能など)、画像による腫瘍因子(腫瘍の大きさ、腫瘍の個数など)および従来から一般的に汎用されている血清の腫瘍マーカー(肝癌では血清AFP値、PIVKAII値)である。本研究で解析を行う血液中や骨髄中のマイクロRNAについては肝癌の進展・再発における機能やバイオマーカーとしての臨床的有用性については全く検討されておらず、本研究がその端緒となることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、血液中を循環するエクソソーム内マイクロRNA、宿主骨髄中のマイクロRNA解析により肝癌の悪化度に関わるエピゲノム異常を同定すること、さらにゲノム・エピゲノムの統合解析により肝癌、特にC型肝炎治療後肝癌発生の機序を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### 1) 肝癌患者の血液中循環エクソソーム内マイクロRNAの解析

肝癌に対して肝移植を行った6例と肝癌に対して肝切除を行った58症例を対象とした。全例手術後5年以上経過観察し、4例で肝癌の再発があり2例では再発がなかった。末梢血液より遠心にて血漿を抽出した。エクソソームは超遠心法にて抽出した。抽出したペレットにエクソソームが含まれていることを電子顕微鏡と、エクソソーム特異的タンパクTSG101のWestern Blottingで確認した。miRNeasy Mini Kit (Qiagen)を使用してエクソソーム内RNAを抽出精製した。3D-Gene Human miRNA Oligo chips (東レ)を使用してアレイ解析を行った。各遺伝子の定量的発現解析はLightCycler (Roche)を使用した。

### 2) 肝癌患者の骨髄中マイクロRNAの解析

肝癌に対して肝切除を行なった7症例を対象とした。肝切除手術前に骨髄を採取し、骨髄細胞をCD45、CD14、EpCAM (CD326)のマイクロビーズを用いて3つの細胞分画にソートした。miRNeasy Mini Kit (Qiagen)を使用して各細胞分画よりRNAを抽出精製した。抽出したRNAをCy3でラベリングし、3D-Gene Human miRNA Oligo chips (東レ)を使用してアレイ解析を行った。

### 3) C型肝炎治療後肝癌のエピゲノム解析

抗C型肝炎ウイルス治療により肝炎ウイルスが消失し肝炎が鎮静化した状態、すなわちウイルス学的著効(SVR)後に発生した肝癌症例を集積した。SVR後に発生し

た肝癌で再発した症例、SVR後に発生した肝癌で再発していない症例、HCV陽性の肝癌で再発した症例、HCV陽性の肝癌で再発していない症例の合計4グループ、計32症例を抽出した。さらに非肝炎の正常肝組織として胆管癌切除症例の非癌部肝組織、生体肝移植ドナーの正常肝組織を集積した。各症例の凍結組織よりそれぞれゲノムDNAと全RNAを抽出し精製した。これらの症例のDNAよりエピゲノムメチル化解析を行うため、ターゲットメチローム用の鋳型調整を行い、PBAT (post-bisulfite adaptor tagging)法を用いて全ゲノムバイサルファイトシーケンスを行った。バイサルファイト処理を施した全ゲノムDNAを次世代シーケンサーを用いて配列決定し、ゲノム上の全シトシンのメチル化状態(メチローム)を同定した。その結果より二次解析を行った。各症例を、癌部-非癌部、再発癌-非再発癌、活動性C型肝炎併存肝癌-C型肝炎治療肝癌の群に分けて、全ゲノムのメチル化状態の変化、相違を同定した。

#### 4. 研究成果

- 1) 肝癌再発に関わる血漿エクソソーム中マイクロRNAの同定  
肝癌患者の血漿を超遠心法にて精製し、電子顕微鏡で観察すると25-75 nm径の球形のエクソソームを抽出することができた。Western blotを行うとエクソソームマーカータンパクTSG 101が豊富に存在することが確認できた。肝癌における再発特異的miRを同定するために、肝癌術後に再発があった4症例と再発がなかった2症例からmiRNA microarray解析を行ったところ hsa-miR-718 と has-miR-1246 が再発の有無により発現差があることがわかった (fold change >1.5, and  $Q < 0.05$ )。エクソソーム内のmiR-718とmiR-1246発現をqRT-PCRにて定量しその臨床病理学的意義を解析した。エクソソーム内miR-718は腫瘍径が大きい症例や術後再発を来した症例で有意に発現が低下していた。miR-718発現レベルにより2群に分けて解析を行ったところ、miR-718低発現群は有意に組織学的低分化度が多く ( $p=0.026$ )、進行ステージ癌症例が多く ( $p=0.04$ )、また3cm以上の大腫瘍径が多い傾向があり ( $p=0.09$ )、腫瘍数も多い傾向であった ( $p=0.07$ )。サブグループ解析ではmiR-718低発現かつ腫瘍径3cm以上の15例は、その他の44例に比べて有意に術後無再発生存率が低いことが分かった ( $p=0.0002$  by log-rank test)。  
TargetScan オンラインデータベース (<http://www.targetscan.org>)にてmiR-718の標的遺伝子を探索したところ、RNF44, HOXB8, TBX1, GORAB, BAD, ADRBK1, OSR1, MPDU1, LRP8の9つの遺伝子が候補

としてあがった。我々はHOXB8遺伝子に注目して解析を行った。初発肝細胞癌に対する肝切除58症例においてHOXB8発現をqRT-PCRにて解析した。HOXB8高発現群は低発現群と比較して有意に術後生存率が低いことが示された ( $p = 0.048$ )。さらに多変量解析においてもHOXB8高発現は独立予後不良因子であることが示された。次に肝癌培養細胞を用いて機能解析を行った。肝癌培養細胞(Huh7、PLC/PRF/5)にpre-miR-718を導入させ、MTT

proliferation assayを行ったところ

miR-718導入により有意に細胞増殖が抑制された。miR-718とHOXB8 3' UTRを導入しルシフェラーゼアッセイを行ったところ、miR-718導入により有意にHOXB8の転写が抑制されることが示された ( $p < 0.05$ )。この結果より肝細胞癌においてmiR-718はHOXB8を標的遺伝子とし、そのHOXB8が高発現することで悪性化に寄与することが示唆された。本研究において我々はエクソソーム内のマイクロRNAが肝癌の進展・再発における機能やバイオマーカーとして有用であることを初めて明らかにできたため、今後の研究の端緒となることが期待される。従来のバイオマーカーと同じく、エクソソームマイクロRNAは血液中で安定して存在すること、qRT-PCRによって比較的簡便に定量される。またエクソソームマイクロRNAの特に有望な点は、癌の悪性化や転移に直接関与しているため、その生物学的悪性度を直接的に反映する可能性があることであると考えられる。血漿中のmiR-718は有用なバイオマーカーであることが示されたが、どの細胞・器官からmiR-718が分泌されるのかは本研究では明らかにならなかつ今後研究の継続が必要であると考えられる。

- 2) 肝癌再発に関わる骨髄中マイクロRNAの同定  
骨髄細胞を全骨髄細胞分画、リンパ球分画、マクロファージ分画に分けてマイクロRNA発現のマイクロアレイ解析を行ったところ各分画で有意に発現プロファイルが異なることが分かった。ウイルス肝炎やアルコール肝炎、脂肪肝炎が肝癌を引き起こすことから炎症は肝発癌に重要な役割を果たすと考えられている。多発肝癌患者では単発肝癌患者と比較してリンパ球分画では1つのマイクロRNA (hsa-654-5p)が発現上昇し、2つのマイクロRNA (hsa-miR-517a, 497)が発現低下していた。miR-517a、miR-497は細胞周期を抑制する癌抑制的なマイクロRNAであり、insulin-like growth factor 1 receptor, WEE1, HDGF, VEGF-A, Akt, IKK  $\beta$ などの遺伝子を標的としている。再発を来した肝癌患者では無再発肝癌患者と比較してマクロファージ分画では、2つの

マイクロ RNA (hsa-miR-1207-3p, 937) が発現上昇し、6 つのマイクロ RNA (hsa-miR-1277, 1279, 184, 563, 96, 302b) が発現低下していた。miR-184 の発現低下は CDC25A, c-myc の発現を亢進させ腫瘍の浸潤能を高めることが分かっている。肝癌に置いて miR-302b は AKT2 をターゲットとし、腫瘍抑制的に機能すると考えられている。マイクロ RNA のプロセッシングは癌細胞内や、骨髄の微小環境内で骨髄前駆細胞や内皮細胞やマクロファージ内で起こっている可能性がある。最近の研究では腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage; TAM) が腫瘍の微小環境と浸潤能獲得に重要な役割を果たすことがわかっている。マクロファージの機能は多様でありその機能の全容はまだ分かっていないが、我々の研究結果は TAM のマイクロ RNA 発現変化が腫瘍浸潤に一定の機能を果たすことを示唆した。

- 3) SVR 肝癌における網羅的エピゲノム解析  
今回の研究では SVR 肝癌特異的発癌生機序を解明するために、PBAT の手法を用いて全ゲノムのメチル化レベルを網羅的に解析し、バイオインフォマティクスの手法を用いて pathway 解析を行った。肝癌の各症例を、癌部-非癌部、再発癌-非再発癌、活動性 C 型肝炎併存肝癌-C 型肝炎治癒肝癌の群に分けて、全ゲノムのメチル化状態の変化、相違を同定した。まず同一患者の癌部非癌部で pairwise plot を行うと Probe 領域のメチル化レベルは明瞭に分離しており、癌部非癌部でグローバルメチル化状態が大きく異なっていることが分かった。各遺伝子の Probe 領域、CpG アイランド領域、Promoter 領域 (転写開始点より上流 2kbp)、Gene body 領域のメチル化レベルに基づくクラスタリングを行ったところ、再発の有無で階層化されることが分かった。次にメチル化の異なる領域 (DMR: Differentially Methylated Regions) を同定したところ、非癌肝組織のメチル化レベルは SVR 症例と C 型肝炎症例で極めて似通っており、(肝炎のない) 正常肝と大きく異なることから、SVR で C 型肝炎が一旦治癒しても発癌を引き起こすエピゲノム異常が残っていることが示唆された。今後は遺伝子発現の解析を行い、さらにゲノム・エピゲノムの統合解析を行っていくことでさらに新たな知見が得られると考えている。

##### 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 3 件)

1. Sugimachi K, Sakimura S, Tomokuni A, Uchi R, Hirata H, Komatsu H, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Masuda T, Morita K,

Shirabe K, Eguchi H, Maehara Y, Mori M, Mimori K. Identification of Recurrence-Related microRNAs from Bone Marrow in Hepatocellular Carcinoma Patients. J Clin Med. 2015;4(8):1600-11.

2. Matsumura T, Sugimachi K, Iinuma H, Takahashi Y, Kurashige J, Sawada G, Ueda M, Uchi R, Ueo H, Takano Y, Shinden Y, Eguchi H, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Ochiya T, Mimori K. Exosomal microRNA in serum is a novel biomarker of recurrence in human colorectal cancer. Br J Cancer. 2015;113(2):275-81.
3. Sugimachi K, Matsumura T, Hirata H, Uchi R, Ueda M, Ueo H, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Shirabe K, Ochiya T, Maehara Y, Mimori K. Identification of a bona-fide microRNA biomarker in serum exosomes that predicts hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. Br J Cancer. 2015;112(3):532-8.

[学会発表] (計 2 件)

1. 杉町圭史、井口友宏、森田勝、藤也寸志、三森 功士  
ワークショップ「診断技術 (画像、腫瘍マーカー、ゲノム解析など) のイノベーション」  
肝癌再発に関わる新たな血液・骨髄細胞中のバイオマーカーの開発  
第 54 回日本肝癌研究会、2018 年 6 月 28 日 (木) ~ 6 月 29 日 (金)、久留米市
2. 杉町圭史、崎村 正太郎、内 龍太郎、平田 秀成、小松 久晃、南原 翔、井口 友宏、新田 吉陽、江口 英利、増田 隆明、森田 和豊、竹中 賢治、前原 喜彦、森 正樹、三森 功士  
肝細胞癌における骨髄中マイクロ RNA の網羅的解析による宿主側再発危険因子の同定  
第 53 回日本癌治療学会学術集会、2015 年 10 月 29 日 (木) ~ 10 月 31 日 (土)、京都

[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

杉町 圭史 (Sugimachi Keishi)  
国立病院機構九州がんセンター  
肝胆膵外科・医長  
研究者番号：90452763

### (2) 研究分担者

鈴木 穰 (Suzuki Yutaka)  
東京大学・新領域創成科学研究科・教授  
研究者番号：40323646

宮野 悟 (Miyano Satoru)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：50128104

三森 功士 (Mimori Koshi)  
九州大学・大学病院・教授  
研究者番号：50322748

調 憲 (Shirabe Ken)  
群馬大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：70264025