

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09422

研究課題名(和文) 生体内Forward genetic screenによる肝癌進展制御機構の解明

研究課題名(英文) Discovery of HCC progression-related cancer genes through in vivo forward genetic screen

研究代表者

小玉 尚宏 (Takahiro, Kodama)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10623275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究により同定した癌のドライバー遺伝子候補に対するプール型CRISPRライブラリーを作成し、Pten欠損Kras活性化マウスの肝内に投与することで、肝発癌を促進させた。シーケンス解析の結果がん部においてSav1遺伝子の欠損変異が認められた。そこでSav1遺伝子のKOマウスを作成したところ、脂肪肝を発症するPten欠損マウスとの交配により著しく肝癌発症が促進した。非ウイルス性肝癌患者においてPten並びにSav1遺伝子の発現はがん部において非癌部に比し有意に減少し、発現低下例は有意にその予後が不良であった。以上より、肝癌におけるSav1遺伝子のがん抑制遺伝子としての役割を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により発癌機序に不明な点が多い非アルコール性脂肪性肝疾患由来の肝発癌の新規機序が明らかになった。非アルコール性脂肪性肝疾患患者人口は極めて多いが、その中から肝癌を発症する頻度は決して高くないため、効率の良いスクリーニングが重要である。本研究結果により、発癌機序の一端が明らかになることで、高リスク群の囲い込みに繋がる可能性がある。また、進行肝がんの治療選択肢は少なく、今回同定した新規遺伝子を標的とした治療法の開発に繋がる可能性があると考えられる。以上より、本研究結果は学術的に新規のがん抑制遺伝子を同定・検証したのみならず、社会的意義が極めて大きい結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We generated pooled CRISPR library targeting driver gene candidates identified by previous screening. We introduced the library into Pten-deficient and Kras-activated mice and accelerated their tumorigenesis. We sequenced developed tumor and found Indel mutation in Sav1 gene locus. Then, we generated sav1 knockout mice and crossed with Pten knockout mice that spontaneously develop steatohepatitis. These mice rapidly developed multiple liver tumors. Expression levels of SAV1 and PTEN were significantly downregulated in tumor tissues of non-viral HCC patients than their non-tumor tissues and patients with lower levels of those showed poorer prognosis. Taken together, we showed the novel tumor suppressive role of Sav1 gene in HCC.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝細胞癌 Hippo経路 遺伝子スクリーニング ノックアウトマウス CRISPR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- 肝癌は、世界でその死亡率が全癌種中第2位に位置し、日本においても死亡実数が毎年3万人を超え予後不良である。早期肝癌の多くは高分化型で乏血性であるのに対して、進展過程においてその一部から中分化や低分化型肝癌が出現し、より悪性度の高い多血性の進行肝癌として浸潤・転移を来す。進行肝癌の治療選択肢は非常に乏しく、現在ガイドラインで唯一推奨されている化学療法はソラフェニブのみであるが、治療効果は限定的であり、新たな治療薬の創出が喫緊の課題である。
- 近年、癌におけるゲノム変異の包括的なカタログを作成すべく、国際がんゲノムプロジェクトが数千に及ぶ癌ゲノムのシーケンズを行った。これにより、500例を超える肝癌のゲノム情報も明らかとなり、TERT 遺伝子のプロモーター領域の活性化や TP53, CTNNB1 の高頻度の変異などが、肝癌のドライバー遺伝子として同定された。同時に、10,000 を超える遺伝子においても低頻度な変異が認められ、肝癌には著しい腫瘍間不均一性が存在することが明らかとなった (Totoki Y, Nat Genet 2014)。このことは、肝癌のドライバー遺伝子が他にも多数存在することを示唆するが、これだけの検体数をもってしても、これら低頻度の遺伝子異常が実際に肝癌の発症・進展に寄与しているかを統計学に検討することは困難であった。申請者は、こういったヒト検体を用いた解析の限界を克服する手法として、これまでにトランスポゾン挿入変異スクリーニング法を用い、各種癌のドライバー遺伝子の同定を行った (Kodama T. PNAS 2016, Gastroenterology 2016, Mann K, Kodama T. Nat Biotech 2016, Rangel R, Kodama T PNAS 2016)。
- 申請者は、この方法により肝癌進展の制御機構を明らかにする為、非アルコール性脂肪肝炎から肝細胞癌を発症する肝細胞特異的 Pten 欠損マウスを用いて新たなスクリーニングを行った。このマウスではトランスポゾンの挿入変異により肝癌の発症が有意に促進された。そこで、250匹の担癌マウスから800の腫瘍を採取して組織学的解析を行い、分化度毎に各々80個の腫瘍を選択してトランスポゾン挿入頻度の高い遺伝子群を比較検討した。その結果、多数の分化度の異なる肝癌におけるドライバー遺伝子候補を同定した。しかしこれらの多くの遺伝子の意義は未だ明らかではない。

### 2. 研究の目的

- スクリーニングで同定された遺伝子群の肝癌発症・進展への関与について生体内で検証を行う。
- 検証しえた遺伝子群による肝癌発症・進展の制御機構を明らかにする。
- ヒト肝癌臨床検体を用いた解析から、検証しえた遺伝子群にの肝癌における臨床的意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas 導入による生体肝細胞内遺伝子編集技術を用いた肝癌進展ドライバー候補遺伝子の検証

50の候補遺伝子を標的とした Crispr/Cas ライブラリーを作成し、肝細胞特異的 Pten 欠損 Kras 活性化マウスの尾静脈から急速静注し (HTVi 法) 肝内にランダムに CRISPR を導入した。その後3ヶ月飼育し、発症した肝癌からゲノムを抽出し、各種候補遺伝子の gRNA 標的部位における Indel 頻度をターゲットシーケンスにより定量化することで、候補遺伝子の中から肝癌進展に寄与した遺伝子を同定する。

(2) KO マウスを用いた候補遺伝子の検討

1)により検証された遺伝子に関して肝特異的 KO マウスを作成し、その表現型を検討した。

(3) 細胞株を用いた発癌制御機構の検討

1)により検証された遺伝子に関して、不死化肝細胞を用いてその機能を抑制した際の発癌に与える影響を検討した。

(4) ヒト肝癌組織臨床検体を用いた検討

肝癌症例の癌部・非癌部検体を用いて、1)により検証された遺伝子に関して、qPCR による遺伝子発現レベルと予後との関係について検討した。

### 4. 研究成果

#### ( 1 ) CRISPR/Cas 導入による生体肝細胞内遺伝子編集技術を用いた肝癌進展ドライバー候補遺伝子の検証

肝細胞特異的かつタモキシフェン依存的に Kras 持続活性化並びに Pten が欠損するマウスを作成したところ、タモキシフェン投与約 3 ヶ月において脂肪肝から肝癌を発症することを確認した。スクリーニングにより同定された候補遺伝子を標的としたプール型 CRISPR/Cas ライブラリーを作成し肝発癌マウスモデルに対して HTVi 法により導入したところ、ライブラリー導入群において有意に発癌形成の促進を認めた。ライブラリー導入群において発症した癌と周囲の非癌肝からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてエクソームシーケンスを行った。その結果、癌部においてのみ CRISPR/Cas の標的部位に対する InDel 形成を複数の遺伝子で認めた。中でも、Sav1 遺伝子に対する高頻度の InDel 形成を認められ、Sav1 遺伝子の欠損が脂肪肝からの肝癌発症を促進していると考えられた。

#### ( 2 ) K0 マウスを用いた候補遺伝子の検討

肝特異的 Sav1 欠損マウスを作成し、脂肪肝炎から肝癌を発症するモデルマウスである肝特異的 Pten 欠損マウスと交配することで、肝特異的 Sav1/Pten 同時欠損マウスを作成し検討を行った。このマウスは 3 ヶ月例において全例肝癌の発症を認めた。

#### ( 3 ) 細胞株を用いた発癌制御機構の検討

不死化肝細胞において、Pten の shRNA 並びに Yap の cDNA を導入したところ、この細胞は増殖速度やスフィア形成能が有意に亢進した。また肝前駆細胞を用いてアログラフトモデルを作成したところ、Pten が抑制され Yap が活性化した肝前駆細胞からのみ腫瘍形成を認めた。以上のことから、Pten 欠損による PI3K 経路の活性化と Sav1 欠損による Hippo 経路の不活性化が、NASH の進展に加えて、肝前駆細胞からの肝癌発症を促進させるという新たな制御機構を明らかにした。

#### ( 4 ) ヒト肝癌組織臨床検体を用いた検討

TCGA に蓄積された肝細胞癌患者の中から非ウイルス性肝細胞癌患者を抽出し、RNA-seq データを検討したところ、Pten・Sav1 の発現は癌部で有意に発現が低下しており、両遺伝子の発現低下症例は有意に予後不良であった。

また、当院で肝切除を受けた患者の中で、NASH から肝癌を発症した患者を抽出し、切除肝組織を用いて免疫染色による検討を行ったところ、正常肝と比して SAV1 の蛋白発現は NASH 肝組織で有意に低下し、また NASH 肝癌組織で更に低下していた。

以上から SAV1 発現の低下が NASH の病態進展や肝癌発症に寄与していると考えられた

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kodama Takahiro, Yi Jing, Newberg Justin Y., Tien Jean C., Wu Hao, Finegold Milton J., Kodama Michiko, Wei Zhubo, Tamura Takeshi, Takehara Tetsuo, Johnson Randy L., Jenkins Nancy A., Copeland Neal G.	4. 巻 115
2. 論文標題 Molecular profiling of nonalcoholic fatty liver disease-associated hepatocellular carcinoma using SB transposon mutagenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E10417 ~ E10426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1808968115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Makino Yuki, Hikita Hayato, Kodama Takahiro, Shigekawa Minoru, Yamada Ryoko, Sakamori Ryotaro, Eguchi Hidetoshi, Morii Eiichi, Yokoi Hideki, Mukoyama Masashi, Hiroshi Suemizu, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 78
2. 論文標題 CTGF Mediates Tumor-Stroma Interactions between Hepatoma Cells and Hepatic Stellate Cells to Accelerate HCC Progression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4902 ~ 4914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-3844	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Yoshinobu, Hikita Hayato, Nozaki Yasutoshi, Kai Yugo, Makino Yuki, Nakabori Tasuku, Tanaka Satoshi, Yamada Ryoko, Shigekawa Minoru, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 26
2. 論文標題 DNase II activated by the mitochondrial apoptotic pathway regulates RIP1-dependent non-apoptotic hepatocyte death via the TLR9/IFN- signaling pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 470 ~ 486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-018-0131-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kodama Takahiro, Marian Teresa A., Lee Hubert, Kodama Michiko, Li Jian, Parmacek Michael S., Jenkins Nancy A., Copeland Neal G., Wei Zhubo	4. 巻 116
2. 論文標題 MRTFB suppresses colorectal cancer development through regulating SPDL1 and MCAM	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 23625 ~ 23635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1910413116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurahashi Tomohide, Yoshida Yuichi, Ogura Satoshi, Egawa Mayumi, Furuta Kunimaro, Hikita Hayato, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Kiso Shinichi, Kamada Yoshihiro, Wang I-Ching, Eguchi Hidetoshi, Morii Eiichi, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Kalinichenko Vladimir V., Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Forkhead Box M1 Transcription Factor Drives Liver Inflammation Linking to Hepatocarcinogenesis in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 425 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2019.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suemura Shigeki, Kodama Takahiro, Myojin Yuta, Yamada Ryoko, Shigekawa Minoru, Hikita Hayato, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 CRISPR Loss-of-Function Screen Identifies the Hippo Signaling Pathway as the Mediator of Regorafenib Efficacy in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1362 ~ 1362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11091362	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 T Kodama, J Yi, J.Y. Newberg, J.C. Tien, H Wu, M.J. Finegold, M Kodama, T Tamura, R.L. Johnson, N.A. Jenkins, T Takehara, N.G. Copeland
2. 発表標題 Whole-genome Sleeping Beauty mutagenesis screens identify the Hippo pathway as the driver of NAFLD-related hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthrough in Cancer Reserch (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Kodama, Jing Yi, Justin Y. Newberg, Hao Wu, Milton J. Finegold, Takeshi Tamura, Tetsuo Takehara, Randy L. Johnson, Nancy A. Jenkins, Neal G. Copeland
2. 発表標題 Whole-genome Sleeping Beauty mutagenesis screens identify the Hippo pathway as the driver of NAFLD-related hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 The Liver Meeting 2018 in AASLD (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小玉 尚宏, 明神 悠太, 疋田 隼人, 阪森 亮太郎, 竹原 徹郎
2. 発表標題 Forward genetic screens of genes determining the efficacy of molecular target therapy in hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小玉 尚宏, 疋田 隼人, 阪森 亮太郎, 巽 智秀, 竹原 徹郎
2. 発表標題 プール型全ゲノムCRISPR/Casライブラリーを用いた肝癌新規癌抑制遺伝子とソラフェニブ感受性因子探索
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小玉 尚宏, 末村 茂樹, 村井 大毅, 疋田 隼人, 阪森 亮太郎, 巽 智秀, 竹原 徹郎
2. 発表標題 肝がんにおける新規癌抑制遺伝子RNF125の同定と機能解析
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小玉 尚宏, 阪森 亮太郎, 竹原 徹郎
2. 発表標題 NASH肝発がんにおけるHippo経路の意義と治療標的としての有用性
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小玉 尚宏, 巽 智秀, 竹原 徹郎
2. 発表標題 トランスポゾンスクリーニングを用いたNASH由来肝癌ドライバー遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小玉尚宏、巽智秀、竹原徹郎
2. 発表標題 Hippo経路の破綻は脂肪性肝疾患からの肝癌発症のドライバーである
3. 学会等名 JDDW2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahiro Kodama, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Two-step in vivo forward genetic screens in mice discover and validate novel tumor suppressor genes in HCC
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小玉 尚宏, 巽 智秀, 竹原 徹郎
2. 発表標題 生体内forward genetic screenによる肝がんドライバー遺伝子の網羅的探索
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小玉 尚宏、疋田 隼人、竹原 徹郎
2. 発表標題 肝臓におけるHippo/PI3K経路の制御異常はNASH進展と肝癌発症を促進する
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小玉尚宏、明神悠太、山田涼子、疋田隼人、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎
2. 発表標題 In vivo oncogene library screen of predictive biomarkers for multi-kinase inhibitors in hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小玉尚宏、末村茂樹、疋田隼人、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎
2. 発表標題 肝細胞癌においてHippo経路はレゴラフェニブの治療効果を修飾する
3. 学会等名 第55回日本肝癌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Kodama, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 High-throughput discovery of liver cancer genes by forward genetic screens in mice
3. 学会等名 APPLE2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Takahiro Kodama, Shigeki Suemura, Yuta Myojin, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 CRISPR loss-of-function screen identifies the Hippo pathway as the potential efficacy biomarker of regorafenib in HCC
3. 学会等名 第78回日本癌学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Kodama, Shigeki Suemura, Yuta Myojin, Ryoko Yamada, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 CRISPR LOSS-OF-FUNCTION SCREEN IDENTIFIES THE HIPPO SIGNALLING PATHWAY AS THE MEDIATOR OF REGORAFENIB EFFICACY IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Kodama, Yuta Myojin, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 In vivo rapid genetic screen of efficacy biomarkers for multi-kinase inhibitors in Hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小玉尚宏、末村茂樹、疋田隼人、阪森亮太郎、巽智秀、竹原徹郎
2. 発表標題 プール型CRISPRライブラリースクリーニングによる肝がんレゴラフェニブ効果予測マーカーの探索
3. 学会等名 第21回日本肝がん分子標的治療研究会
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	巽 智秀  (Tatsumi Tomohide)  (20397699)	大阪大学・医学系研究科・講師   (14401)	
研究 分担者	疋田 隼人  (Hikita Hayato)  (20623044)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	