

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：87102
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：18K08722
研究課題名（和文）網羅的エピゲノム・トランスクリプトーム解析による肝炎治癒後肝発癌機序の解明

研究課題名（英文）Epigenome and transcriptome analysis of hepatocellular carcinoma after eradication of hepatitis C virus

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・肝胆膵外科部長

研究者番号：90452763
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はC型肝炎が治癒してもなお発生する肝臓に着目して、その発癌機序を解明することを目的とした。肝臓臨床検体の全ゲノムメチル化シーケンスによりSVR肝臓症例の全ゲノムのメチル化変化を網羅的に解析し、C型肝炎罹患によって起こった肝臓のメチル化異常は抗ウイルス治療によって臨床的にC型肝炎が治癒した後も保持され正常化していないという重要な知見を得た。さらに、SVR患者のエピゲノム変化によって起こる遺伝子発現異常、特に転写因子によって制御される遺伝子発現変動を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、C型肝炎が治癒した後もHCVによって引き起こされたメチル化異常が宿主によって保持されているという重要な知見を得ることができた。この結果はSVR肝臓発癌の分子機序の解明に寄与すると考えられる。本研究が臨床病理学あるいは生物学的なSVR肝臓発癌のリスク分類を構築することに発展すれば、肝臓の早期発見早期治療や新規分子標的治療の開発による臨床的な肝臓患者の予後改善に寄与することはもちろん、無駄な治療費を減らす点で医療経済医療行政への貢献も期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the carcinogenic mechanism of hepatocellular carcinoma (HCC) that still occur even after hepatitis C was cured. Comprehensive analysis of whole genome methylation status was performed using whole genome methylation sequence in HCC clinical samples. We obtained important finding that altered methylation status caused by hepatitis C infection retained and did not normalize even after HCV was cured by antiviral treatment. Furthermore, we were able to clarify gene expression alterations regulated by epigenome changes, especially gene expression changes controlled by transcription factors, in SVR patients.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝がん C型肝炎 エピゲノム ウイルス学的著効

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝癌(肝細胞癌,hepatocellular carcinoma(HCC))は本邦の悪性新生物の死亡者数第5位であり年間3万人以上が亡くなっており疾病対策の上で重要な疾患である。肝癌に対する肝切除手術をはじめとした集学的な治療によっても全症例の5年生存率は約30%である。この現況より肝癌の治療成績の向上のためにはその発癌機序を解明し特異性の高い新規バイオマーカーを探求し新規分子標的治療を開発することが求められている。C型肝炎ウイルス(HCV)感染による慢性肝炎・肝硬変は本邦の肝癌の成因の60%以上を占めるためC型肝炎治療は肝癌予防策として極めて重要である。2009年にはインターフェロン(IFN)治療によって約70%の患者で体内からHCVが消失する(ウイルス学的著効:sustained viral response(SVR))ようになり、2011年以降には直接作用性抗ウイルス薬(direct-acting antiviral agent(DAA))により約95%以上の患者でSVRが得られるようになった。抗HCV治療の飛躍的な発展によりHCV感染者の全例でウイルス排除を達成することも夢ではなくなっている。抗HCV療法でSVRを達成すれば結果として肝発癌が抑えられる。我々は肝癌切除後にSVRを得られれば肝癌再発率が下がり予後が良いが、一方でウイルス消失後も一定数の発癌(再発)が起こりうる事を報告した(Anticancer Res 2015)。抗HCV治療によりSVRを達成した患者に発生する肝癌、いわゆる「SVR肝癌」は臨床的に重要な課題であるが、さらには新規抗HCV治療によって別の新たな問題も出てきた。2016年に少数例の検討で「DAAの免疫抑制効果」によりDAA治療後に肝癌の再発率が高いことが報告され、IFNは抗ウイルス効果とともに免疫増強による発癌抑制効果があるため治療法による発癌抑制率が異なる可能性が示唆されている。このようにSVR肝癌は臨床的に重要な課題であるが、「なぜSVR後に肝癌が発生するのか?SVR後に肝癌が発生する症例と発生しない症例は何が違うのか?」ということは未だに全く明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)肝癌の癌部・非癌部のエピゲノム・トランスクリプトームの統合解析によりSVR肝癌発生の機序を明らかにすること、(2)血液中の遺伝子解析によりSVR肝癌発生を予測発見する新規バイオマーカーを同定することである。

3. 研究の方法

1) 対象症例

九州がんセンターで肝癌に対して肝切除を行った症例を対象とした。当研究施設の研究倫理審査委員会にて承認を得て研究を開始した。研究参加について文書による研究協力の同意を得た患者について研究を行った。2018年5月から2020年2月までに手術を行った40症例より、肝癌組織、非癌部肝組織を採取しDNA/RNAを抽出した。また術前および術後7日目に末梢血をサンプリングした。さらに術後3ヶ月毎に前向きに末梢血より血漿をサンプリングしている。

2) post-bisulfate adaptor-tagging(PBAT)法を用いた網羅的DNAメチル化シーケンシング

SVR肝癌6症例と対照群としてHCV肝癌8症例の腫瘍部および非腫瘍部、さらに正常肝コントロールとして大腸癌肝転移の非癌部の10症例よりゲノムDNAを抽出し全ゲノムのメチル化異常を解析した。バイサルファイトでDNAに処理を施したゲノムDNA全体を次世代シーケンサーを用いて配列決定し元々の配列と比較することにより、個々のシトシンについてそのメチル化状態を検出した。Methylation scoreをマッピングし、さらにdepthや染色体毎のメチル化レベルなどの基本統計量を組み込み、最終的にブラウザ表示をして可視化した。

3) mRNAシーケンシング(RNAseq)を用いた網羅的遺伝子発現・転写産物解析

SVR 肝癌 7 症例と対照群として HCV 肝癌 9 症例の腫瘍部および非腫瘍部より RNA を抽出した。逆転写した cDNA のアダプター付きライブラリ作製し、次世代シーケンサーでシーケンスした配列をリファレンスゲノムにアライメントし、トランスクリプト毎の発現解析を行った。正常肝細胞のトランスクリプトームデータは過去の報告を参照した(引用文献 1)。

4) 肝癌培養細胞におけるメチル化により発現制御される遺伝子の網羅的解析

2 種類の肝癌培養細胞(HuH7, PLC/PRF/5)をメチル化酵素阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza)処理の前後で抽出し RNA を精製した。cDNA ライブラリーをシーケンシングし、5-aza 処理(脱メチル化)により発現が変化する遺伝子を解析した。

5) SVR 肝癌のメチル化と遺伝子発現データの統合解析

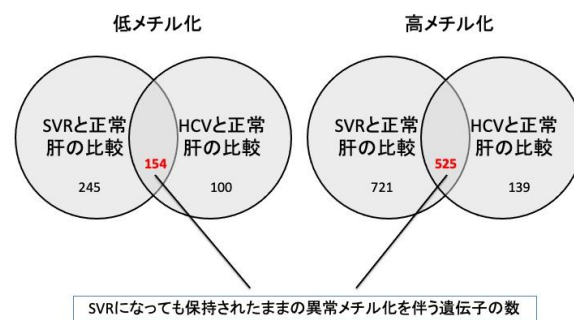
PBAT のデータより C 型肝炎治癒 SVR 肝癌、HCV 陽性肝癌、正常肝細胞の群間においてメチル化が有意に変動しているゲノム部位 = differentially methylated region(DMR)を同定した。同群間比較で RNAseq のデータより発現に変化が見られる遺伝子=differentially expressed gene(DEG)を同定した。遺伝子のメチル化と発現の相関解析においては、DMR から 5kb 以内にある遺伝子群をメチル化によって制御される遺伝子として紐付けした。また SVR 肝癌の発癌に関わるエピゲノム変化を同定するために特にエピゲノムによって制御される転写因子に着目して解析を行った。public database より 1639 個の転写因子とそれぞれの転写因子によって制御される標的遺伝子を抽出した(引用文献 2,3)。以上の手順で *in vivo*の臨床検体より同定した発現変動遺伝子のうち、*in vitro*の肝癌細胞株においても同様にメチル化と関連して発現が変化する物を抽出し、SVR 肝癌に特異的な遺伝子を同定した。

4. 研究成果

1) SVR と C 型肝炎に特徴的な異常メチル化の同定

SVR 肝癌および HCV 肝癌症例の非癌部肝における全ゲノムメチル化を非肝炎正常肝組織のメチル化と比較した(図 1)。SVR 患者の肝組織において 254 カ所の低メチル化領域、664 カ所の高メチル化領域がそれぞれ DMR として同定された。SVR 患者で見られた DMR のうち 154/254 カ所(61%)の低メチル化領域、525/664 カ所(79%)の高メチル化領域は慢性 C 型肝炎陽性患者にも共通して見られた。すなわち、抗ウイルス治療

図1. SVR肝癌とHCV肝癌のメチル化異常遺伝子の重複



によって臨床的に C 型肝炎が治癒した状態(SVR)でも肝の異常メチル化は正常化していないという極めて重要な知見が得られ、肝発癌につながっている可能性が考えられた。

2) SVR 肝癌に関わるメチル化に制御される遺伝子の同定

SVR 肝癌と HCV 陽性肝癌患者に共通して見られる異常メチル化領域が発癌に重要であると考えられ解析を進めた。それらの異常メチル化領域によって制御される遺伝子の発現変化を RNAseq によって同定し、メチル化変化(DMR)と遺伝子発現変化(DEG)が共通して異常が起こっている遺伝子を 45 個同定した。ウイルス肝炎によるエピゲノム変化によって発癌が起こるためには転写因子のメチル化変化が重要であるという仮説に基づき転写因子に着目したところ、45 遺伝子の中より 5 個の転写因子を同定した。

3) SVR 肝発癌に関わる転写因子標的遺伝子の肝癌細胞での発現変動

SVR 肝癌患者の臨床検体より同定した 5 個の転写因子が制御する遺伝子群より、肝癌培養細胞のメチル化変化によって発現変動が見られる遺伝子を同定した(unpublish data のため非提示)。これらの遺伝子はメチル化の異常によって制御され肝発癌に関わっている可能性が高いと考えられた。

【引用文献】

1. Suppli MP, Rigbolt KTG, Veidal SS, Heebøll S, Eriksen PL, Demant M, Bagger JI, Nielsen JC, Oró D, Thrane SW, Lund A, Strandberg C, König MJ, Vilsbøll T, Vrang N, Thomsen KL, Grønbæk H, Jelsing J, Hansen HH, Knop FK. Hepatic transcriptome signatures in patients with varying degrees of nonalcoholic fatty liver disease compared with healthy normal-weight individuals. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2019;316(4):G462-G472.
2. Han H, Cho JW, Lee S, Yun A, Kim H, Bae D, Yang S, Kim CY, Lee M, Kim E, Lee S, Kang B, Jeong D, Kim Y, Jeon HN, Jung H, Nam S, Chung M, Kim JH, Lee I. TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D380-D386.
3. Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, Chen X, Taipale J, Hughes TR, Weirauch MT. The Human Transcription Factors. *Cell*. 2018;172(4):650-665. Erratum in: *Cell*. 2018;175(2):598-599.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugimachi K, Sakimura S, Kuramitsu S, Hirata H, Niida	4. 巻 4
2. 論文標題 Serial mutational tracking in surgically resected locally advanced colorectal cancer with neoadjuvant chemotherapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Br J Cancer.	6. 最初と最後の頁 419-423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-018-0208-5.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉町圭史、井口友宏、香川秀樹、中司悠、中ノ子智徳、杉山雅彦、太田光彦、池部正彦、森田修、藤也寸志
2. 発表標題 化学療法が奏功し切除を行った腹膜播種を伴う切除不能膵癌の1例
3. 学会等名 第80回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2018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	井口 友宏 (Iguchi Tomohiro) (30598959)	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・肝胆膵外科医師 (87102)	
研究分担者	三森 功士 (Mimori Koshi) (50322748)	九州大学・大学病院・教授 (17102)	
研究分担者	吉住 朋晴 (Yoshizumi Tomoharu) (80363373)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

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
---------	---------