

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293172

研究課題名(和文) 肝発癌過程におけるゲノム/エピゲノム異常の相関の統合的解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations in hepatocellular carcinoma.

研究代表者

丸澤 宏之 (Marusawa, Hiroyuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80324630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト癌組織には多様なゲノム・エピゲノム異常の報告がなされているものの、その生成機序に関しては大部分が不明のままである。申請者らは、肝細胞を含むさまざまな上皮細胞に異所性に、炎症性サイトカイン刺激により遺伝子編集酵素AIDが発現誘導されること、その結果、発癌に関連したゲノム異常が生成・蓄積し、癌細胞の発生に重要な役割を果たしていること、を明らかにしてきた。本研究課題では、炎症刺激によりさまざまな癌抑制遺伝子の転写が亢進しAIDによる転写依存性の遺伝子変異生成が促進されること、ゲノム異常が生じた肝胆道系の組織幹/前駆細胞は肝細胞癌の発生起源となりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Liver cancers, including hepatocellular carcinoma (HCC) and intrahepatic cholangiocarcinoma, generally arise in liver chronically inflamed due to various diseases such as hepatitis virus infection and steatohepatitis. Chronic inflammation triggers the aberrant expression of a DNA mutator enzyme, activation-induced cytidine deaminase (AID), and contributes to tumorigenesis through the accumulation of genetic aberrations. To gain further insight into the inflammation-mediated genotoxic events required for carcinogenesis, we examined the role of chronic inflammation in the emergence of genetic aberrations in the liver with constitutive AID expression. We found that inflammation-mediated transcriptional upregulation of target genes, including putative tumor suppressor genes, enhances the opportunity for inflamed cells to acquire somatic mutations and contributes to the acceleration of tumorigenesis in the inflamed liver tissues.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝癌 遺伝子変異 AID

## 1. 研究開始当初の背景

さまざまなヒト癌の発生源地として、上皮組織の慢性炎症の持続が重要な役割を果たしていることが知られている。他方、癌細胞の発生には、遺伝子変異や欠失などのゲノム異常と、メチル化変化をはじめとするエピゲノム異常の両者が関与しているものと推定されている。しかしながら、臓器の炎症と、発癌の直接の要因となるゲノム/エピゲノム異常の生成を結びつける分子機構については不明である。

近年、DNA や RNA に変異を導入する活性を有する一群の分子 ( 遺伝子編集酵素 ) が相次いで同定されている。この遺伝子編集酵素 Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme ( APOBEC ) family に属する分子は、その塩基置換作用を介して、標的となる DNA や RNA に遺伝子変化を生成する作用を発揮することが知られている。Activation-induced cytidine deaminase ( AID ) はこれらの遺伝子編集酵素群の中で、ヒト自身の遺伝子(DNA)配列に変異を導入する活性を有することが示されている分子である。申請者らのこれまでの研究成果から、感染や炎症を契機に上皮系細胞に AID が発現誘導されること、その結果、ゲノム異常が生成・蓄積し、肝癌をはじめとする消化器系臓器の腫瘍発生に重要な役割を果たしていること、が明らかとなってきた。

一方、ヒト癌細胞には多彩なエピゲノム異常が認められ、特に炎症からの発癌過程においては、DNA メチル化変化に代表されるエピゲノム異常が多段階的に生じていることがわかってきている。しかしながら、炎症からの発癌過程においてエピゲノム異常が生じるメカニズムには不明な点が多く、特に、DNA の脱メチル化反応についてはその分子機構のほとんどが明らかとなっていないのが現状である。近年、AID が Ten-eleven translocation (TET)ファミリー分子とともに、能動的な脱メチル化反応を介したエピゲノム制御に中心的な役割を果たしていることが明らかとなっ

きた。すなわち、これまで不明であった DNA 脱メチル化の分子機構として、AID がメチル化シトシンを脱アミノ化しチミンに変換後、修復機構が作動して非メチル化シトシンが生じる、という経路が特定された。この事実は、炎症刺激により発現誘導された AID が、発癌過程においてゲノム異常とともにエピゲノム異常の生成にも関与している可能性を強く示唆している。さらに、AID と協調して脱メチル化制御に関与する TET ファミリー分子がさまざまな悪性腫瘍で発現低下していること、造血器腫瘍では TET2 の遺伝子変異が高頻度に認められることなどが相次いで報告されるようになり、脱メチル化御分子の発現異常がさまざまな腫瘍の発生に深く関与していることが示唆されるようになってきた。

## 2. 研究の目的

本邦における肝癌の大部分は、肝炎ウイルス感染による慢性肝疾患を背景に高率に発生することが知られている。そこで、申請者らのグループがこれまで確立してきた遺伝子編集酵素 AID によるゲノム異常誘導に関する研究成果をさらに発展させ、次世代シーケンサーを活用してゲノム/エピゲノム異常を包括的に解析することにより、肝発癌過程におけるゲノム異常とエピゲノム変化の相関を統合的に理解するとともに、その発生メカニズムを AID の作用を軸として探求することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

申請者らのこれまでの検討から、AID を全身に発現したトランスジェニック・マウス (AID-Tg マウス)は、発癌関連遺伝子への変異が多段階的に生成・蓄積することにより、悪性リンパ腫、肝癌、肺癌、胃癌など多様な上皮系腫瘍を発生することが明らかとなっ

ている。そこで、肝細胞に特異的に AID を持続発現させるため、肝細胞系統の分子マーカーのプロモーター依存性に AID が発現誘導される遺伝子改変マウスの作成を行う。肝細胞系マーカーとして、EpCAM, アルブミン (ALB) に着目し、それぞれのプロモーター配列下流に Cre を knock in したマウス (EpCAM-Cre, ALB-Cre マウス) を作成/準備する。これらのマウスと、Cre recombinase 作用下に AID を発現する AID コンディショナルトランスジェニックマウス (AID-cTg) を交配させることにより、EpCAM, ALB 発現細胞に AID を発現する EpCAM-AID マウス、ALB-AID マウス、をそれぞれ作成する。

AID と協調して脱メチル化反応を担っている TET ファミリーとしては、TET1, TET2, TET3 の 3 つの分子が同定されていることから、これらの TET ファミリー分子の発現を肝細胞特異的にノックアウトした TET1, TET2, TET3 コンディショナル KO マウスを作成する。まず、Cre 組換え酵素作用下にそれぞれの TET 分子が KO される TET1-, TET2-, TET3-floxed KO マウスと、EpCAM-Cre, ALB-Cre マウスを交配させる。最終的に得られた、EpCAM-TET KO マウス、ALB-TET KO マウスの表現型を解析するとともに、肝細胞に生じているメチル化変化とゲノム変化を包括的に評価する。

一方、本邦におけるヒト肝癌の大部分は、C 型肝炎ウイルス (HCV)、B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染による肝硬変や慢性肝炎を背景に発生することが知られている。また、近年、アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を背景にした肝癌の発生報告が増加傾向にある。そこで本研究では、HCV 感染、HBV 感染、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) による慢性肝障害を背景に発生した肝細胞癌症例の腫瘍部ならびに非腫瘍部の肝組織のゲノム変化と DNA メチル化変化との相関解析を進めていく。具体的には、各症例の肝癌腫瘍組織と非癌部で

ある背景肝組織のそれぞれから抽出した DNA サンプルを対象とし、約 60Mb の全エクソン配列を網羅したオリゴキャプチャーでエクソン領域を選択的に捕捉回収し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の決定を行う。引き続き、体細胞変異部位の同定とその生物学的意義についての評価を行う。

#### 4. 研究成果

まず、肝細胞に特異的に AID を持続発現させるため、肝細胞系統の分子マーカーのプロモーター依存性に AID が発現誘導される遺伝子改変マウスの作成を行った。肝細胞系マーカーとして、EpCAM, アルブミン (ALB) に着目し、それぞれのプロモーター配列下流に Cre を knock in したマウス (EpCAM-Cre, ALB-Cre マウス) を作成/準備した。これらのマウスと、Cre recombinase 作用下に AID を発現する AID コンディショナルトランスジェニックマウス (AID-cTg) を交配させることにより、EpCAM, ALB 発現細胞に AID を発現する EpCAM-AID マウス、ALB-AID マウス、をそれぞれ作成し表現型の解析を行った。また、これらのモデルマウスを用いて、チオアセトアミドを負荷することによる慢性肝炎モデル、肝発癌モデルを樹立し、次世代シーケンサーを用いて発生した腫瘍のゲノム・エピゲノム異常を網羅的に解析した。その結果、炎症刺激によりさまざまな癌抑制遺伝子の転写が亢進し、AID による転写依存性の遺伝子変異生成が促進されることが明らかになった。また、EpCAM-AID マウスの表現型解析からは、肝組織中の EpCAM 陽性を示す胆道系の前駆細胞を起源として肝癌が発生することが確認された。この、EpCAM 陽性細胞を発生起源とする肝癌の特徴としては、肝細胞癌とともに胆道系の腫瘍成分が生じることが明らかとなった。

ヒト臨床検体の解析からは、NASH/NAFLD を背景とした肝癌に特徴的な

ゲノム異常を特定することができた。すなわち、NASH/NAFLD 肝癌に寄与する発癌関連遺伝子を特定するために全エクソンシーケンス解析を行ったところ、11 検体で合計 1142 個の体細胞変異が確認された。遺伝子変異が起こる頻度は 1Mb あたり 1.86 変異程度であり、一般的な肝癌(1Mb あたり約 2.8 変異)よりも少ない傾向にあった。次に、既知の肝癌関連 14 遺伝子 (CTNNB1, TP53, ARID1A など) に、全エクソンシーケンスにおいて 2 例以上で共通して変異を認めた 12 遺伝子を加えた合計 26 遺伝子を対象とし、ターゲットシーケンス解析を行った。その結果、NAFLD 肝癌では、11 検体中 9 例で TERT プロモーター変異が認められたほか、CTNNB1, TP53 などの既知の肝癌関連遺伝子の変異が同定された。特に、TERT プロモーター変異は、HCV 肝癌全体の 60%、HBV 肝癌全体の 40% の症例で認められたのに対して、NAFLD 肝癌の 80%以上の症例で同定されたことから、NASH/NAFLD 肝癌ではウイルス性肝癌と比べて、TERT プロモーター変異がより高頻度に行っている可能性が示唆された。また、ターゲットシーケンス解析では、これまで肝癌ドライバー遺伝子として認識されていなかった FGA, SYNE1 などの遺伝子においても複数検体で変異が生じていることが明らかになった。また、NASH/NAFLD 肝癌を対象とした網羅的な染色体コピー数解析を行ったところ、NAFLD 肝癌では染色体 1q(=1 番染色体長腕), 8q 領域の増幅と染色体 1p(=1 番染色体短腕), 4q, 6q, 8p, 13q, 16p, 17p, 18q 領域の欠失が多いことが明らかになった。特に、8p 欠失がすべての検体で認められており、NASH/NAFLD 肝癌のきわめて特異的な遺伝子変化像であると考えられた。以上の解析から、NASH/NAFLD 肝癌における遺伝子異常としては TERT プロモーター変異と 8 番染色体短腕欠失が主な特徴であることが明らか

になった。

## 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)

Eso Y, Takai A, Matsumoto T, Inuzuka T, Horie T, Ono K, Uemoto S, Lee K, Edelmann W, Chiba T, Marusawa H. MSH2 dysregulation is triggered by proinflammatory cytokine stimulation and is associated with liver cancer development. *Cancer Research*. 査読有. 76.2016.4383-93.DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-2926.

Ki Kim S, Ueda Y, Hatano E, Kakiuchi N, Takeda H, Goto T, Shimizu T, Yoshida K, Ikura Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Uemoto S, Chiba T, Ogawa S, Marusawa H. TERT promoter mutations and chromosome 8p loss are characteristic of nonalcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 査読有.139.2016.2512-18.DOI:10.1002/ijc.30379.

[学会発表](計 6 件)

恵荘裕嗣、高井淳、丸澤宏之・慢性炎症からの肝癌発生の分子機構～DNA ミスマッチ修復遺伝子の発現異常～．第 102 回日本消化器病学会総会．京王プラザホテル．東京．2016/4/23

金秀基、吉田健一、垣内伸之、上田佳秀、南口早智子、海道利実、白石友一、宮野悟、羽賀博典、上本伸二、妹尾浩、小川誠司、丸澤宏之・肝癌の発生母地としての肝硬変組織に潜在するゲノム異常．第 75 回日本癌学会学術総会．パシフィコ横浜．神奈川．2016/10/7

松本知訓、高井淳、恵莊裕嗣、千葉勉、妹尾浩、丸澤宏之 . EpCAM 陽性肝幹/前駆細胞は肝細胞癌の起源となる . 第 75 回日本癌学会学術総会 . パシフィコ横浜 . 神奈川 . 2016/10/6

恵莊裕嗣、高井淳、千葉勉、妹尾浩、丸澤宏之 . 肝炎症発癌における DNA ミスマッチ修復遺伝子 MSH2 の発現低下と変異パターンの関連性 . 第 75 回日本癌学会学術総会 . パシフィコ横浜 . 神奈川 . 2016/10/6

Kim SK, Ogawa S, Marusawa H.

International Session(Symposium)1 :

Genomic of hepatocellular carcinoma:

Hepatitis virus infection and hepatocarcinogenesis

肝がんゲノム : 肝炎ウイルスと発がん :

Genomic approaches to uncover clonal structure and oncogenic potential of

liver cirrhosis . JDDW2016. (第 58 回日本

消化器病学会大会 . 第 20 回日本肝臓学会大会 .合同) 神戸コンベンションセンター . 兵庫 . 2016/11/3

恵莊裕嗣、高井淳、丸澤宏之 . 炎症による microRNA-21 発現誘導を介したゲノム不安定性と肝発癌 . JDDW2016. (第 58 回日本消化器病学会大会 .第 20 回日本肝臓学会大会 .合同) 神戸コンベンションセンター . 兵庫 . 2016/11/3

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

丸澤宏之 ( MARUSAWA , Hiroyuki )

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 80324630

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし

### (4)研究協力者

該当なし