

令和元年6月24日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09385

研究課題名(和文) 非癌部肝組織におけるDNAメチル化異常の網羅的解析による肝発癌予測法の開発

研究課題名(英文) DNA methylation level of 10 CpG sites on 8 specific genes in non-cancerous liver tissues is useful to predict multicentric recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical resection

研究代表者

鳥村 拓司 (Torimura, Takuji)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60197986

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)：肝細胞癌は根治させても、多中心性の再発を繰り返し進行していく。本研究は、非癌部肝組織のDNAメチル化異常を解析し臨床において肝細胞癌の多中心性再発の予測を可能にすることを旨とした研究である。肝細胞癌症例の非癌部肝組織からDNAを採取し術後5年以上無再発症例群：22例と術後2年以内に多中心性発生様の再発を来した症例群(早期再発群)26例の非癌部肝組織のDNAメチル化レベルに差を認めるCpGサイトを8遺伝子領域10箇所と同定した。これら10サイトのメチレーションレベルを用いた主成分分析により、無再発群と早期再発群を識別することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は肝細胞癌の多中心性再発予測を可能にすることを旨とした研究である。無再発群と早期再発群のDNAメチル化レベルの差を検定した結果両群間で差を認める部位を8遺伝子領域10箇所に同定した。これら10箇所のメチル化レベルを用いた分析により、無再発群と早期再発群の識別が可能であった。8遺伝子には転写因子、シグナル伝達分子、細胞増殖関連分子などが含まれていた。以上から、同定した非癌部肝組織のDNAメチル化領域のメチル化レベルは肝細胞癌の根治切除後の多中心性再発を予測する有用なマーカーになり得ること。さらにその領域に位置する遺伝子群は、多中心性再発の原因の遺伝子候補となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of multicentric recurrence after curative treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) is not clarified yet. The aim of this study is to clarify the participation of DNA methylation in multicentric recurrence of HCC and also evaluate the possibility of DNA methylation as a biomarker of multicentric recurrence. 26 HCC patients recurred multicentrically within 2 years after surgical resection (early recurrence group) and 22 HCC patients without recurrence more than 5 years (no recurrence group) were enrolled. Between 1st and 2nd sets, 10 common DNA methylation sites which showed significantly different methylation level ($p < 0.001$) were identified on 8 genes. 9 sites of 10 common DNA methylation sites showed hypomethylation level in early recurrence group. After curative resection of HCC, the DNA methylation level in non-cancerous liver tissues seems to be a biomarker of multicentric recurrence of HCC.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝細胞癌 多中心性再発 DNAメチル化異常 非癌部肝組織

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

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は慢性肝疾患を背景に発生する我が国を代表する悪性腫瘍の一つである。肝細胞癌は様々な治療にもかかわらず高率に肝内に再発を繰り返して進行していく。肝内での再発様式には肝内転移と全く異なる癌が新たに発生する多中心性発癌の2通りがある。肝内転移に関しては、我々は今日までに腫瘍肉眼型が原発性肝癌取扱い規約(日本肝癌研究会編)の肉眼分類における単純結節型は単純結節周囲増殖型や多結節癒合型に比べ肝内転移の頻度が乏しいこと、単純結節周囲増殖型や多結節癒合型は高率に脈管浸潤をきたし、それにより肝内転移を引き起こすことを明らかにしてきた。一方、多中心性発癌の機序に関しては、臨床面からも、ジェネティックおよびエピジェネティックな分野を含めた基礎的研究の領域からもほとんど明らかにされていない。多中心性発癌の機序を明らかにすることは、根治術後の再発予測が可能となるばかりか、多中心性の再発を予防する治療法の開発にもつながり、肝細胞癌患者の予後改善にも役立つことが予想される。近年、発癌にはDNAの障害の他に、エピジェネティックな異常の蓄積も重要であることが様々な癌種で明らかになってきた。エピジェネティックな異常はいろんな原因で引き起こされるが、慢性の炎症はエピジェネティックな異常を引き起こす最も重要な因子の一つと考えられている。さらに、エピジェネティックな異常は、癌の発生以前から組織中に誘発され、異常の蓄積量は発癌のリスクと相関することが明らかになった。これらの事実から、非癌部組織でのエピジェネティックな異常の蓄積程度を定量的に評価することで、発癌のリスク予測因子として利用できる可能性が高いことが推測される。

2. 研究の目的

非癌部肝組織のDNAメチル化異常を網羅的に解析し、肝細胞癌の多中心性の再発に関与するDNAメチル化異常を明らかにする。さらに、同定したDNAメチル化異常を有する症例が根治術後の多中心性再発をきたしやすいかをバリデーションすることで臨床でも利用できることを証明する。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝細胞癌組織および非癌部肝組織での遺伝子変異とDNAメチル化異常の検索 (トレーニングセット)

外科的切除にて採取したC型肝炎ウイルスに起因する肝細胞癌症例の非癌部肝組織と肝細胞癌組織からDNAを抽出して各々の組織における染色体の異常、変異(LOH, Gain)をSNP-CGH arrayにより解析する。末梢血から採取したDNAを正常ゲノムDNAとして比較する。染色体の異常、変異を解析したC型肝炎ウイルスに起因する肝細胞癌症例をトレーニングセットとして、その非癌部肝組織と肝細胞癌組織のDNAに対し、HumanMethylation450 BeadChip arrayを施行しメチル化異常を検出する。BeadChip arrayで検出されたDNAメチル化異常を非癌部肝組織群と肝細胞癌組織群とで比較し肝発癌に関連するメチル化異常をきたすDNA群を特定する。

BeadChip arrayで検出されたDNA群のメチル化異常をパイロシーケンス法で定量解析する。さらに、多中心性再発を2年以内にきたした群と3年以上多中心性再発を起こさない群間で肝発癌に関連するDNA群のメチル化異常に量的、質的に違いがあるかを検討する。

(2) 非アルコール性脂肪性肝炎からの発癌マウスの作製

コリン欠乏アミノ酸食を48週間投与しマウス肝硬変合併肝発癌モデルを作製し、継時的に肝組織を採取し凍結保存する。nSREBP-1cとcyclin D1のダブルトランスジェニックマウスを48週間飼育し肝発癌させると共に、継時的に肝組織を採取し凍結保存する。

(3) ヒト肝細胞癌組織および非癌部肝組織での遺伝子変異とDNAメチル化異常の検索 (バリデーションセット)

外科的切除で得られた別のC型肝炎ウイルスに起因する肝細胞癌症例を抽出する。

抽出した症例をバリデーションセットとして非癌部肝組織と肝細胞癌組織の DNA のメチル化異常を検出する。 検出された DNA メチル化異常の中から肝発癌に関連する DNA メチル化異常の定量解析を行い、多中心性再発を 2 年以内にきたした群と 3 年以上多中心性再発を起こしていない群間で比較し、量的、質的に違いがあるかを検討する。 このバリデーションセットから得られた結果と平成 28 年度に行ったトレーニングセットの結果とを対比する。 トレーニングセットの結果とバリデーションセットの結果に関連が見いだせない場合は、解析するメチル化異常をきたした DNA の種類を増やして再度解析する。

(4)非アルコール性脂肪性肝炎からの発癌マウスでの DNA メチル化異常の検索

作製した 2 種類の発癌マウスモデルから継時的に採取し保存しておいた非癌部肝組織と肝細胞癌組織の DNA メチル化異常を解析し、これらのモデルにおける肝発癌に寄与するメチル化異常を起こす DNA 群を特定する。 さらに、DNA 群のメチル化異常を定量解析する。

(5)ヒト B 型および C 型肝炎ウイルス陰性の肝細胞癌における DNA メチル化異常の検索

外科的切除にて採取された B 型および C 型肝炎ウイルス陰性の肝細胞癌症例の非癌部肝組織と肝細胞癌組織の DNA のメチル化異常を検出し、さらに定量解析する。

マウスモデルにおける肝発癌に関与する DNA 群のメチル化異常とヒト B 型および C 型肝炎ウイルス陰性の肝細胞癌症例の非癌部肝組織における DNA 群のメチル化異常を定量的に対比し、非アルコール性脂肪性肝炎やアルコール性肝硬変など B, C 型肝炎ウイルスに起因しない背景肝からの発癌に関与する DNA のメチル化異常を明らかにする。

(6)ヒト B 型および C 型肝炎ウイルス陰性の肝細胞癌における DNA メチル化異常を引き起こす因子の同定とバイオマーカーの検索

マウスモデルにおいて肝発癌に関与する DNA 群が発癌に至るまでに引き起こすメチル化異常の程度と相関する因子を肝機能、線維化や炎症マーカーなどから抽出する。

マウスモデルにおいて抽出された発癌に関与する DNA 群のメチル化異常の程度と相関する因子のうち、非アルコール性脂肪性肝炎やアルコール性肝硬変など B, C 型肝炎ウイルスに起因しない背景肝からの発癌に関与する DNA のメチル化異常と最も相関するバイオマーカーを特定する(Clin Cancer Res 16; 4588-4694, 2010)。

4 . 研究成果

外科的切除にて採取した C 型肝炎ウイルスに起因する肝細胞癌症例の非癌部肝組織と肝細胞癌組織から DNA を採取し各々の組織における染色体異常、変異を解析し、末梢血単核球の DNA を正常ゲノムとして比較した。 その結果、SNP-CGH array では、非癌部肝組織の染色体の異常は認められなかった。 次に非癌部肝組織 21 サンプルを切除後 2 年以内に再発した群 (早期再発群) と 5 年以上再発しなかった群 (無再発群) に分け、DNA のメチル化異常を BeadChip array で 360,343 の DNA のメチル化サイトを早期再発群と無再発群で評価した。 その結果、42 の DNA のメチル化サイトにおいて早期再発群と無再発群肝でメチル化のレベルに違いがあった。 さらに、Principal component analysis において、42 のメチル化サイトのうち上位 25 の部位において早期再発群と無再発群でメチル化レベルに有意な違いがみられた。 次に、2008 年から 2012 年で当院にて背景を C 型肝炎として発癌し、根治的肝切除術を施行した肝細胞癌 203 症例から術後 5 年以上無再発症例群 : 第 1 セット 9 例、第 2 セット 13 例と術後 2 年以内に多中心性発生様の再発を来した症例群 (早期再発群) : 第 1 セット 9 例、第 2 セット 17 例の非癌部肝組織から DNA を抽出後、Methylation 450-BeadChip を用いて、常染色体上に位置する約 47 万箇所の CpG メチル化サイトの DNA メチル化レベルを取得した。 一塩基多型に関連した CpG サイトならびにデータ取得率の悪いサイトを除いた計 401,282 箇所について、無再発群と早期再発群の DNA メチル化レベルの差を一般化線形モデル (GLM) により検定した。

その結果、二つの解析セットに共通して $p < .001$ を示したCpGサイトを8遺伝子領域10箇所に同定した。このうち9箇所は早期再発群において低メチレーションレベルを示していた。また、これら10サイトのメチレーションレベルを用いた主成分分析により、無再発群と早期再発群を識別することが可能であった。さらに、8遺伝子には転写因子、シグナル伝達分子、細胞増殖関連分子などが含まれていた。以上から、本研究で同定した非癌部肝組織のDNAメチル化領域のメチル化レベルは肝細胞癌の根治切除後の多中心性発生を予測する有用なマーカーになり得ること、さらにその領域に位置する遺伝子群は、多中心性発生の原因となる遺伝子候補となり得ることが示唆された。次に、C型肝炎ウイルスに起因する慢性障害肝を背景に発症した肝細胞癌組織の非癌部肝組織から採取したDNAを用いて、Methylation 450-BeadChipにてCpGメチル化サイトのDNAメチル化レベルを評価し、術後5年以上無再発症例群22例と術後2年以内に多中心性再発をきたした26例肝でのCpGメチル化サイトのDNAメチル化レベルを一般化線形モデル(GLM)により比較してDNAメチル化レベルに有意差($p < 0.001$)を認めたCpGサイト22か所を詳細に解析した。DNAメチル化レベルに有意差を認めた22か所のCpGサイトは、クロモソーム1,2,3,5,7,8,10,11,12,14,16,19,20に存在し、このうちConsistencyが認められた10か所のうち9か所は、早期再発群で低メチル化であり、これらの中で8個の遺伝子は、クロモソーム2のTRIM54、クロモソーム6のTENM2、クロモソーム10のAPBB1IP、クロモソーム14のSNX19、クロモソーム15のCLSTN13、クロモソーム17のOAS1、クロモソーム20のIRX5、クロモソーム22のSOX12であり、このうちTRIM54は細胞臭気や分化に関与、SNX19はインスリン分泌に関与、IRX5はTGF betaの作用抑制、SOX12は肝細胞癌の悪性化に関与しており、早期再発群で低メチル化である遺伝子8個のうち4個は発がんに関連した機能を有していた。一方、Consistencyが認められた10か所のうちわずかにクロモソーム10の1か所だけが早期再発群で高メチル化であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- . Nakano M, Tanaka M, Kuromatsu R, Nagamatsu H, Satani M, Niizeki T, Okamura S, Iwamoto H, Shimose S, Shirono T, Noda Y, Koga H, Torimura T. Alternative treatments in advanced hepatocellular carcinoma patients with progressive disease after sorafenib treatment: a prospective multicenter cohort study. *Oncotarget*. 7: 64400-64409, 2016
- . Nakamura T, Koga H, Iwamoto H, Tsutsumi V, Imamura Y, Naitou M, Masuda A, Ikezono Y, Abe M, Wada F, Sakaue T, Ueno T, Ii M, Alev C, Kawamoto A, Asahara T, Torimura T. Ex vivo expansion of circulating CD34+ cells enhances the regenerative effect on rat liver cirrhosis. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 3: 16025(page1-13), 2016
- . Kawaguchi T, Nakano D, Koga H, Torimura T. Effects of a DPP4 Inhibitor on Progression of NASH-related HCC and the p62/ Keap1/Nrf2-Pentose Phosphate Pathway in a Mouse Model. *Liver Cancer*. DOI;10.1159/000491763 Sep.4, 2018
- . Iwamoto H, Nomiya M, Niizeki T, Shimose S, Shirono T, Nakano M, Satani M, Okamura S, Noda Y, Kamachi N, Sakai M, Suzuki H, Kuromatsu R, Ogo E, Abe T, Tanaka M, Koga H, Torimura T. Dose and Location of Irradiation Determine Survival for Patients with Hepatocellular Carcinoma with Macrovascular Invasion in External Beam Radiation Therapy. *Oncology* 96:1-8, 2019

[学会発表](計6件)

- . Koga H, Imamura Y, Ikezono Y, Wada F, Nakamura T, Iwamoto H, Masuda A, Sakaue T, Yano H, Torimura T. Poster Session (09) Wnt, AKT, and Cell Survival Pathways. Regulation of Hes1 expression by the Wnt transcription factor T-cell factor-4. The 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR). New Orleans, USA. 2016/4
- . Iwamoto H, Torimura T, Koga H. English Oral Sessions: Invasion and Microenvironment. PlGF induced VEGFR1-dependent vascular remodeling determines opposing antitumor effects of Notch inhibitors. 第75回日本癌学会学術集会. 横浜市. 2016/10
- . Torimura T, Koga H, Nakamura T, Iwamoto H, Imamura Y, Ikezono Y, Sakaue T, Wada F, Masuda A, Tanaka T, Yano H, Ueno T, Yamamoto K. Poster Session (III): Clinical Hepatocellular Carcinoma. DNA methylation level of non-cancerous liver tissue has potential for being a biomarker of multicentric recurrence of hepatocellular carcinoma. The 67th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Boston, USA. 2016/11
- . Noda Y, Kawaguchi T, Nakano M, Koga H, Torimura T. . Poster: HCC Clinical. Factors Associated with the Prognosis of Patients with Non-Hepatitis B Virus-, Non-Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. APASL Single Topic Conference in Nagasaki "Prevention of HCC development". Nagasaki, Japan. 2017/4
- . Iwamoto H, Koga H, Torimura T. Inhibition of hypoxia inducible factor via upregulation of von Hippel-Lindau protein induces 'Angiogenic switch off' in a mouse hepatoma model. The 68th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Washington, DC. 2017/10
- . Torimura T, Iwamoto H, Masuda A, Abe M, Suzuki H, Nakamura T, Sakaue T, Tanaka T, Yamamoto K, Yano H and Koga H. DNA Methylation Level of 10 CpG Sites on 8 Specific Genes in Non-Cancerous Liver Tissues Is Useful to Predict Multicentric Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Surgical Resection. The 69th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2018/11

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 中村 徹

ローマ字氏名: (NAKAMURA, toru)

所属研究機関名: 久留米大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 30341332

研究分担者氏名: 矢野 博久

ローマ字氏名: (YANO, hirohisa)

所属研究機関名: 久留米大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40220206

研究分担者氏名: 岩本 英希

ローマ字氏名:(IWAMOTO, hideki)

所属研究機関名: 久留米大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 40529541

研究分担者氏名: 山本 健

ローマ字氏名:(YAMAMOTO, ken)

所属研究機関名: 久留米大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 60274528