

令和 2 年 4 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04158

研究課題名(和文) 肝硬変"再生結節"の細胞クローン動態と発癌機構の解明

研究課題名(英文) Role of regeneration nodule in cirrhotic liver on tumorigenesis

研究代表者

丸澤 宏之 (Marusawa, Hiroyuki)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80324630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝癌の大部分は、肝硬変を背景に発生することが知られている。肝硬変組織の構成単位である再生結節を解析対象単位とした次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行い、再生結節に潜在する塩基変化を検討した。本研究結果から、肝硬変組織の再生結節を構成している肝細胞は、モノクローナルな細胞集団として増殖活性を維持しながらゲノム異常を蓄積することが、肝癌細胞の発生基盤となっていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦でも頻度の高い癌のひとつである肝癌は肝硬変を背景に高率に発生することが知られている。この肝硬変は、肝臓の線維化と再生結節と呼ばれる肝細胞の構成単位により形成されているが、本研究により肝硬変の再生結節に遺伝子異常が蓄積することが、肝癌の発生母地となっていることがわかってきた。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma recurrently develops in cirrhotic liver containing a number of regenerative nodules (RNs). To uncover the molecular basis of tumorigenesis in liver cirrhosis, the genetic aberrations in RNs of cirrhotic tissues were determined using next-generation sequencing method. Our findings suggested that a variety of genetic aberrations accumulate in the RNs of cirrhotic liver before the development of clinically and histologically overt HCC, and these aberrations in RNs could provide the basis of tumorigenesis in patients with liver cirrhosis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝癌 肝硬変

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(肝癌)の大部分は、慢性肝疾患、特に肝硬変を背景に高率に発生することが知られている。多くのヒトの他の癌とは異なり、肝硬変を背景とした肝発癌は多中心性に発生(多発)することを特徴としているが、肝硬変が有するきわめて高い発癌ポテンシャルを説明する分子基盤については不明な点が多い。肝硬変の病理組織学的な特徴は、びまん性の線維化と再生結節の形成であり、肝硬変組織は再生結節をその構成単位として形作られている。すなわち、慢性炎症による肝再生と結合組織の新生が繰り返した結果、“再生結節”を構成単位として肝硬変組織像が形成されている。興味深いことに、これまでの報告からは、この肝硬変の再生結節はモノクローナルな増生肝細胞により構成されている可能性が示唆されている。

一方、癌細胞の発生には、遺伝子変異やコピー数変化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。次世代シーケンサーを用いた近年の大規模がんゲノム解析から、ヒトの肝細胞癌の発生には普遍的な責任遺伝子が存在せず、長期間に及ぶ慢性肝障害によりさまざまな遺伝子領域に多段階に惹起されたゲノム異常とエピゲノム異常の両者が協調的に働くことが、腫瘍細胞の出現につながっていることが明らかとなってきた。

以上より、肝硬変組織の再生結節を構成している肝細胞は、モノクローナルな細胞集団として増殖活性を維持しながらゲノム/エピゲノム異常を蓄積することが、肝細胞癌の発生基盤となっているという細胞系譜の存在が推定される。

## 2. 研究の目的

肝硬変組織を再生結節単位でとらえ、個々の再生結節に潜在・蓄積するゲノム/エピゲノム異常を統合的に理解することにより、肝細胞癌細胞の発生母地となりうる肝硬変再生結節単位における遺伝子変化の全体像を掌握するとともに、再生結節の生成機転を解明することにより、肝細胞癌発生のメカニズムを探求することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

肝細胞癌の発生母地となっている肝硬変組織から、ひとつひとつの再生結節の切り出しを顕鏡観察下で行う。個々の再生結節単位で DNA, RNA の抽出を行い遺伝子解析検体とする。再生結節の由来となる肝硬変は、C 型肝炎ウイルス感染例、B 型肝炎ウイルス感染例、アルコール性肝硬変、脂肪性肝炎(NAFLD/NASH)とさまざまな原因による病態を解析対象とする。

ゲノム解析は、次世代シーケンサーを用いた塩基配列の決定により行うことにより、個々の再生結節に潜在する体細胞変異の同定と、構成肝細胞の clonality 評価、ゲノム変化の生物学的意義についての評価を行う。塩基配列の決定は、ヒト発癌に関連する既知の癌関連遺伝子を選択的に deep sequencing を行う方法と、全エクソンの変異を包括的に同定する方法の2種類を実施する。

遺伝子発現プロファイル解析は、再生結節単位から抽出した RNA を対象とし、total transcriptome 解析を、次世代シーケンサーを用いて実施する。得られた結果を、肝障害のない正常な肝組織の検討から得られた発現プロファイル解析結果と比較することにより、個々の再生結節で生じた遺伝子発現変化の全体像をとらえる。

以上の手法で、異なる病因により形成された肝硬変の再生結節についての検討を進めることにより、再生結節を構成する肝細胞系譜の生理機能や細胞増殖に関連する遺伝子変異などのゲノム変化と遺伝子発現プロファイルの特徴を、肝炎ウイルス感染や NAFLD といった病因ごとに検証する。また、肝細胞癌を発生した肝硬変と発癌のない肝硬変の再生結節を比較することにより、発癌ポテンシャルの差が遺伝子変異レベルなどで規定されているかどうかの検証を行う。加えて、同一肝硬変組織においても、肝内の領域ごとの再生結節細胞の機能マッピングを行うことにより、解剖学的に異なる肝領域ごとの再生結節構成細胞に生物学的な特性の差異があるかどうかの評価を進める。

再生結節の出現機転についての検証としては、レポーターマウスに肝硬変病態を誘導し、肝組織に形成された再生結節を構成する肝細胞の蛍光標識を経時的に観察することにより、ひとつひとつの再生結節の細胞系譜、ならびにそれぞれの再生結節の clonarity を評価する。

#### 4 . 研究成果

肝切除の際に摘出された肝硬変の全肝組織を活用し、C 型肝炎ウイルス感染、B 型肝炎ウイルス感染、脂肪性肝炎、アルコール、という異なった病因による肝硬変組織から、計 205 再生結節の単離を行った。加えて、同じ肝硬変組織で肝細胞癌が併存していた症例については、腫瘍組織検体も採取しゲノム解析を行った。個々の再生結節は、平均径 3.5mm(1.0-5.0mm) であり、病理組織学的に異型上皮を含む結節は解析対象にはないことを確認した。

次に、ひとつひとつの再生結節から核酸を抽出し、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た塩基配列の決定することにより、再生結節に潜在するゲノム異常を特定した。初回の対象検体をして全エクソン解析を行った 10 個の肝硬変 再生結節のうち 9 結節から、計 108 カ所のエクソン領域の遺伝子変異が検出された。この変異は特異的 primer sets を使った deep sequencing による validation 解析においても再現されるものであり、同一症例の末梢血リンパ球からは検出されなかったことから、個々の再生結節に蓄積された体細胞変異と考えられた。各再生結節中のエクソン領域の体細胞変異数は平均 12 カ所であり、同一肝硬変組織に発生した肝癌組織と比較すると、約 1/10 程度の変異数であることがわかった。再生結節で検出されたエクソン変異の 70% 以上はタンパク質合成に影響を与えない silent 変異であったことから、これらの変異により細胞機能には変化が生じていないものと推測された。興味深いことに塩基変異のパターン解析からは、再生結節に生じている塩基変化は C>T, T>C, C>A の順に高頻度であり、これは肝細胞癌の塩基変化 signature ときわめて類似していることが確認された。

次に再生結節に潜在する塩基変化のアレル頻度の詳細な解析を行ったところ、複数の再生結節における体細胞変異のアレル頻度は 20-30% 以上となっていることがわかった。再生結節中に含まれる HNF4a 陽性の肝細胞系譜の細胞密度との対比から、肝硬変組織の再生結節は個々に起源となる細胞に由来したクローナルな肝細胞系譜の集団により構成されてい

ることが推定された。

次に、肝発癌における肝硬変再生結節の果たす役割を検証する目的で、各再生結節から抽出した核酸サンプルを用いて、既知の代表的な 30 肝癌関連遺伝子を対象とした targeted deep sequencing 解析を行った。205 サンプル中 47 サンプル(22.9%)の肝硬変の再生結節組織では、TP53, ARID1A を含む合計 51 個の肝発癌関連遺伝子に、細胞機能変化を生じる non-silent 変異が検出された。各変異アリル頻度は 1.3%-9.1%にまでおよび、肝癌関連遺伝子の変異をもつクローナルな細胞集団が再生結節内で増生していることが示唆された。検出された変異遺伝子を対象に pathway 解析を行ったところ、クロマチンリモデリングや  $\beta$  カテニン経路、酸化ストレス経路、PI3K-mTOR 経路など、さまざまな発癌関連シグナル伝達経路の異常が潜在していることが明らかとなった。また、全サンプルの中で変異を有する肝硬変の再生結節が占める割合は、担癌/非担癌症例で 25.8%/18.5 であり、肝硬変の再生結節組織における肝癌関連遺伝子の変異の潜在頻度は、担癌の有無によって有意差を認めなかった。興味深いことに、肝癌で最も頻度の高いゲノム異常である TERT プロモーター変異は、いずれの再生結節からも検出されなかった。肝硬変の再生結節では TERT の活性化が生じていないことを確認するために TERT 発現レベルを肝細胞癌組織と real-time RT-PCR 法により比較検討を行ったが、肝細胞癌組織では有意に TERT 発現の亢進が生じていたのに対して、解析したすべての再生結節においては TERT 発現の上昇は認めなかった。

モデルマウス実験としては、肝前駆細胞マーカーのプロモーター制御下にレポーターを発現誘導する遺伝子改変マウスを樹立し、再生結節の細胞系譜の検討を進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kim SK, Takeda H, Takai A, Matsumoto T, Kakiuchi N, Yokoyama A, Yoshida K, Kaido T, Uemoto S, Minamiguchi S, Haga H, Shiraishi Y, Miyano S, Seno H, Ogawa S, Marusawa H.	4. 巻 54
2. 論文標題 Comprehensive analysis of genetic aberrations linked to tumorigenesis in regenerative nodules of liver cirrhosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 628 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01555-z.	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 Matsumoto Tomonori, Takai Atsushi, Eso Yuji, Kinoshita Kazuo, Manabe Toshiaki, Seno Hiroshi, Chiba Tsutomu, Marusawa Hiroyuki	4. 巻 77
2. 論文標題 Proliferating EpCAM-Positive Ductal Cells in the Inflamed Liver Give Rise to Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6131 ~ 6143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-1800	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Soo Ki Kim, Haruhiko Takeda, Hiroyuki Marusawa.
2. 発表標題 Oncogenic Potential of Cirrhotic Liver Tissues Determined by Deep-Sequencing Analyses.
3. 学会等名 APASL 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金 秀基, 竹田治彦, 丸澤宏之
2. 発表標題 肝がんのゲノム情報に基づく成因別治療選択の可能性
3. 学会等名 第54回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本知訓、高井淳、恵莊裕嗣、木下和生、千葉勉、妹尾浩、丸澤宏之
2. 発表標題 起源細胞の違いに基づいた肝癌の腫瘍特性の同定
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017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