

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15932

研究課題名(和文) ウイルス制御下における肝発癌・進展機構の解明と新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Research for hepatocarcinogenesis and new therapeutic targets in hepatocellular carcinoma with or without HBV/HCV suppression

研究代表者

北畑 富貴子(河合)(KAWAI-KITAHATA, Fukiko)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：00755580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本検討では、肝細胞癌臨床検体を用いることによりC型慢性肝炎からのHCC発症においてSVRの有無による遺伝子変異の差は明らかでないこと、B型慢性肝炎からのHCC発症においてHBV DNAが制御されている群ではTERT promoter変異からの発癌を認めないことを同定し、HBV既往感染からのHCC発症のうちHBV integrationを有する症例ではHBV持続感染と同様の発癌機序が考えられ、etiologyやウイルスの制御状態により発癌に関わるメカニズムが異なる可能性が示唆された。以上の結果はウイルス制御下における肝発癌機構の解明に有用な知見と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年課題となっているHCV排除後やHBV制御下において肝癌を発症した症例に関して癌関連遺伝子変異やウイルスDNAのヒトゲノムへの挿入を調べた。病因やウイルス制御状態により発癌過程が異なる可能性を示しその発癌機構の一端を解明したことにより、発癌予測や治療方針など臨床的な知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：We investigated cancer-related genes and viral integration using next generation sequencing in HCC tissues.

In HBs antigen positive HCC, HBV suppression by NUCs may reduce TERT promoter mutation, but not HBV integration. In contrast, HCV eradication has a small influence on gene mutational status in HCV-related HCC. About 10% of NBNC HCC with prior HBV infection had HBV integration and these were developed from normal liver at a younger age. These results above are important and contribute to clarify the mechanisms of the genomic features including HBV integration and the underlying pathway responsible for hepatocarcinogenesis among different etiology and status of viral suppression.

研究分野：肝臓

キーワード：肝細胞癌 遺伝子変異

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

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は世界の癌死の第3位に挙げられる予後不良の癌で、主要な危険因子はB型肝炎ウイルス(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)による肝炎、アルコール性肝障害や非アルコール性脂肪性肝炎である。これらのウイルス持続感染や代謝ストレスにより宿主側に遺伝子異常が蓄積し、様々な癌の病態を決定していると考えられている。

近年、画期的新薬によりほぼ全例でHCV排除が可能となってきたが、HCV排除後には依然発癌リスクが存在し、HCV持続感染により蓄積する背景肝におけるゲノム変異やエピゲノム修飾が及ぼすHCV排除後の肝発癌機構は不明である。一方B型肝炎においてもHBV増殖の制御は可能となったが、核内のcccDNA及び宿主ゲノムに挿入されたHBVの直接排除は起こらず、現行のHBV制御下における発癌抑制効果は限定的であり、B型肝炎の死亡者数は減少していない。

最近、肝細胞癌においても網羅的遺伝子解析が行われ、p53/Rb細胞周期系(TP53, CDKN2A)、Wntシグナル系(CTNNB1, Axin1)、PI3K/Rasシグナル系(PTEN, PIK3CA, TSC1, KRAS, NRAS)、クロマチン修飾関連遺伝子(ARID2, ARID1A, ARID1B)、酸化ストレス応答遺伝子(NFE2L2)等の変異が高頻度であることが報告された(Huang J et al, Guichard C et al, & Fujimoto A et al, Nat Genet, 2012)。しかし、ウイルス制御下の発癌機序及び臨床病態と密接に関連する遺伝子異常プロファイルの詳細は不明である。一方、メラノーマにおいてテロメア伸長に関わるTERT遺伝子プロモーターの2か所の塩基変異(-124G>Aと-146G>A)が高頻度であることが報告され(Horn S et al & Huang FW et al, Science, 2013)、これらの変異は転写因子ETS/TCFの結合部位を発生させることでTERTの発現量を上昇させると考えられている。しかし、肝細胞癌におけるTERT遺伝子プロモーター変異が発癌に関わる機序の詳細は不明である。

申請者は、肝細胞癌手術例104例の肝癌検体の癌関連遺伝子変異について次世代シーケンサーを用いて網羅的な解析を行い、癌部ではTERTプロモーター、TP53、CTNNB1の変異が高頻度であることを明らかとし、臨床病態学的背景との関連を解明した(Kawai-kitahata et al. Hepatology 2014, J Gastroenterol 2015)。即ち、TERTプロモーター変異は高齢、HCV感染、非HBV感染、TP53変異はHBV感染、非HCV感染と、CTNNB1変異は非HBV感染と有意に関連があり、さらにTERTプロモーター変異は有意に無再発生存期間、生存期間が短いことを明らかとし、これらの遺伝子プロファイリングは肝細胞癌の病態や治療効果を予測し個別化医療を展開する上で有用であることを示した。

一方、上述のように肝細胞癌全体では最も高頻度に認められることが判明したTERTプロモーター変異はHBV陽性肝癌では低頻度であったため、HBV陽性肝癌では非HBV陽性肝癌とは異なる発癌メカニズムの存在が示唆された。そこで申請者はHBs抗原陽性27例の癌部におけるHBV integrationについて癌部DNAとHBVのゲノム配列から作成したオリゴキャプチャライブラリとのハイブリダイゼーションによるライブラリ調整から次世代シーケンサーを用いヒトとHBVゲノムのjunctionを含むデータを抽出する方法を確立し、HBs抗原陽性肝癌においてHBV integrationと癌ゲノム変異の詳細を明らかとした。即ち、HBV integrationは27例中25例(92.6%)78か所で検出され、HBV側ではHBx遺伝子の挿入が34例(44%)と高頻度で、ヒト側ではTERT領域への挿入を9例で認め最も高頻度であった。さらにTERTプロモーターのhotspot変異とTERT領域へのintegrationは相互排他的であり、HBV integration数が多いほど若年で肝細胞癌を発症したことを明らかとした(Kawai-kitahata et al. J Gastroenterol 2015)。この様にこれまで申請者はHBV integrationと遺伝子変異、および臨床背景因子との関連について研究を重ね成果を挙げてきたが、核酸アナログ薬によるHBV制御下でも肝発癌は十分に抑制されず、わが国に2,000万人存在すると推定されているHBV既感染者、及び潜在的HBV感染者におけるHBV integrationおよび癌ゲノム変異と発癌機構の詳細は不明である。

2. 研究の目的

(1) 肝炎ウイルス制御下における肝発癌・進展に関わるゲノムプロファイルおよび肝発癌に關与するHBV integrationの網羅的解析、(2)これらHBV integrationをゲノム編集により導入したiPS細胞の樹立、(3)さらにHBx蛋白と宿主ゲノム異常との相互関係を解析することで、ウイルス制御下における肝発癌・進展機構の解明へ向けた知的・学術基盤を形成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肝炎ウイルス制御下における肝発癌・進展に関わるゲノムプロファイルおよびHBV integrationの網羅的解析

C型慢性肝炎においてインターフェロンまたは直接作用型抗HCV薬によりSVRが得られた症例、B型慢性肝炎において核酸アナログ薬によりHBV増殖が制御されている症例、HBV既感染例の癌部と非癌部、リンパ球から抽出したDNAを使用して、独自に作成した肝細胞癌の癌関連遺伝子パネルを次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。癌部の遺伝子変異の遺伝子変異を検出し、肝炎ウイルス未治療群と比較することでウイルス制御下における発癌過程を検証した。

(2)ゲノム編集によるHBV integrationを有するヒトiPS細胞の樹立

ほとんどの肝癌細胞株ではTERTプロモーター領域に既に変異が入っているため、TERTプロモーター変異あるいは近傍へのHBx挿入による変化を細胞生物学的に解析することは困難であ

り、TERT プロモーター領域への HBx 遺伝子の integration が発癌プロセスにどのレベルで寄与できるのか、その病的意義付けには不明瞭な点が残されている。そこで、健常者から既に樹立済みのヒト iPS 細胞株を利用し、これに Crispr/Cas9 系を利用して TERT プロモーター領域へ genotype C HBx コンセンサス配列の組み込みを行った。

(3)HBV 陽性肝細胞癌の病態に関連する遺伝子変異と HBx 蛋白の機能解析

野生型の TERT プロモーター配列に臨床検体で認められた 2 種類の hot spot 変異(C228T, C250T)を導入したレポータープラスミドを作成し、HepG2 細胞および 293T 細胞へ遺伝子導入し、レポーターアッセイを行った。また、これらのプラスミド(野生型, C228T, C250T)と HBx 蛋白を発現するプラスミドを HepG2 細胞および 293T 細胞へ遺伝子導入し、HBx 蛋白がそれぞれの TERT プロモーター活性に与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1)肝炎ウイルス制御下における肝発癌・進展に関わるゲノムプロファイルおよび HBV integration の網羅的解析

肝細胞癌に対して手術を行った 201 例を対象とした。その内訳は HCV/HBV/NBNC=79/44/78 例、HCV SVR あり/なし 30/49 例、HBs 抗原陽性のうち核酸アナログ製剤 (nucleotide/nucleoside analogues: NUCs) 内服あり/なし 22/22 例であった。また NBNC 肝癌は HBs 抗原陰性かつ HBc 抗体陽性または HBs 抗体陽性の HBV 既往感染 28 例とそれ以外の 50 例に層別した。癌部と背景肝において癌関連 54 遺伝子 2910 箇所の Hotspot に対して deep sequence、TERT promoter 領域の hotspot は direct sequence を行った。HBs 抗原陽性 44 例及び HBV 感染既往 50 例の HBV 及び AAV integration を Illumina Miseq を用いて解析した。結果は、HCV 陽性肝癌 78 例は TERT promoter; 83.1%, CTNNB1; 31.5%, TP53; 25.0%と TP53 変異は少ないが ($P=0.002$) TERT promoter 変異が多く ($P=0.003$)、AXIN1; 5 例, RB1; 1 例と WNT signaling pathway の遺伝子変異や ARID1A 2 例, ARID2 1 例とクロマチン修飾に関わる遺伝子変異を認めたが SVR の有無による遺伝子変異の頻度の差は認めなかった。HBV 持続感染肝癌 41 例は TP53; 56.8%, TERT promoter; 27.3%, CTNNB1; 18.2%で遺伝子変異を認め HBV integration は HBs 抗原陽性 43 例中 40 例(93%)126 か所で検出されヒト側では TERT 16 例、MLL4 3 例、MYO7A 2 例であった。NUCs 内服の有無で TERT 領域も含め HBV integration の頻度に差はなかったが TERT promoter 変異は NUCs 内服群で内服していない群と比較して低下しており (18% versus 38%, $p=0.14$) HBV DNA 検出感度未満の症例で有意に少なかった (0% versus 38%, $p=0.006$)。一方 NBNC 肝癌 78 例は TERT promoter; 62.8%, CTNNB1; 28.2%, TP53; 29.5%, AXIN1; 3 例で遺伝子変異を認めた。そのうち HBV 既往感染 28 例の遺伝子変異は TERT promoter ;72.4%, CTNNB1; 34.5%, TP53; 44.8%, AXIN1; 2 例で認めた。HBV integration は 50 例中 6 例(12%)22 か所検出され、6 例とも HCV 抗体陰性、若年で発症し 6 例中 4 例(67%)は正常肝からの発癌であり、AAV integration は検出されなかった。これらの結果から HCV 排除の有無で遺伝子変異による発癌機序の違いは明らかではなかった。HBV 持続感染において NUCs 内服や HBV DNA 低値が TERT promoter 変異を低下させる可能性が示唆された。また HBV 既往感染は全体として HCV や HBV 持続感染と遺伝子変異プロファイルの両者の特性を持っていたが一部 HBV integration を有する症例では HBV 持続感染と同様の発癌機序が考えられ若年で正常肝からの発癌が多かった。

(2)ゲノム編集による HBV integration を有するヒト iPS 細胞の樹立

(1)の HBV integration 解析で得られた TERT promoter 領域への HBx 挿入例の実際のゲノム配列をもとに TERT promoter と HBx それぞれの junction を決定した。genotype C HBx コンセンサス配列を用いてこの junction 領域について DNA 合成を行い、TERT promoter 領域へのアームおよびガイド RNA を設計した後に Crispr/Cas9 系を利用して TERT プロモーター領域へ HBx 配列の組み込みを導入中である。組み込みの際に用いた薬剤耐性遺伝子は Cre/loxP 系によって樹立後に排除する。

(3)HBV 陽性肝細胞癌の病態に関連する遺伝子変異と HBx 蛋白の機能解析

HBx 蛋白と TERT promoter 変異が TERT promoter 活性に与える影響について調べた。まず、TERT promoter 変異が promoter 活性に与える影響を調べるため、野生型の TERT プロモーター配列に臨床検体で認められた 2 種類の変異(C228T, C250T)を導入したレポータープラスミドを作成し、HepG2 細胞および 293T 細胞へ遺伝子導入し、レポーターアッセイを行ったところ、2 種の cell line で TERT promoter 活性は変異型で上昇した。これらのプラスミド(野生型, C228T, C250T)と HBx 蛋白を発現するプラスミドを HepG2 細胞および 293T 細胞へ遺伝子導入し、HBx がそれぞれの TERT プロモーター活性に与える影響を解析した。その結果、HBx 発現により、TERT mRNA, 蛋白発現ともに上昇することを確認した。次に、TERT promoter に結合する転写因子として Sp1, c-myc, ETS2 が知られており、この 3 つの転写因子が TERT promoter 活性に与える影響を調べたところ、Sp-1, c-myc で TERT promoter 活性は上昇し、HBx 共発現によってさらに上昇を認めた。以上の結果から HBx は TERT promoter 活性上昇に関与することが考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Miyoshi M, Kakinuma S, Kamiya A, Tsunoda T, Tsuchiya J, Sato A, Kaneko S, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Nakauchi H, Asahina Y,

- Watanabe M. LIM homeobox 2 promotes interaction between human iPS-derived hepatic progenitors and iPS-derived hepatic stellate-like cells. *Sci Rep.* 2019 Feb 14;9(1):2072. doi: 10.1038/s41598-018-37430-9. (PMID: 30765795) 査読有
2. Inoue-Shinomiya E, Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Tsuchiya J, Sato A, Tsunoda T, Miyoshi M, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Murata K, Mizokami M, Watanabe M. Association of serum interferon- 3 levels with hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients treated with direct-acting antiviral agents. *Hepato Res.* 2019 May;49(5):500-511. doi: 10.1111/hepr.13307. Epub 2019 Feb 7. (PMID: 30623518) 査読有
 3. Nagata H, Nakagawa M, Asahina Y, Sato A, Asano Y, Tsunoda T, Miyoshi M, Kaneko S, Otani S, Kawai-Kitahata F, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Nouchi T, Sakai H, Tomita M, Watanabe M. Effect of interferon-based and -free therapy on early occurrence and recurrence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2017.11; 67 (5): 933-939. (PMID: 28627363) 査読有
 4. Murakawa M, Asahina Y, Nagata H, Nakagawa M, Kakinuma S, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Otani S, Kaneko S, Miyoshi M, Tsunoda T, Asano Y, Sato A, Itsui Y, Azuma S, Nouchi T, Furumoto Y, Asano T, Chuganji Y, Tohda S, Watanabe M. ITPA gene variation and ribavirin-induced anemia in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated with sofosbuvir plus ribavirin. *Hepatology Research.* 2017.10; 47 (11): 1212-1218. (PMID: 28128521) 査読有
 5. Murakawa M, Asahina Y, Kawai-Kitahata F, Nakagawa M, Nitta S, Otani S, Nagata H, Kaneko S, Asano Y, Tsunoda T, Miyoshi M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Iijima Y, Tsuchiya Y, Izumi N, Tohda S, Watanabe M. Hepatic IFNL4 expression is associated with non-response to interferon-based therapy through the regulation of basal interferon-stimulated gene expression in chronic hepatitis C patients. *J. Med. Virol.* 2017 Jul;89(7):1241-1247 (PMID: 28036111) 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1. 北畑 富貴子, 朝比奈 靖浩, 渡辺 守. 【シンポジウム 5-2: 次世代シーケンサーを用いたウイルスゲノム・マイクロバイオーム・エクソゾーム解析による肝疾患研究】F0 の背景肝から発症した肝細胞癌における癌関連遺伝子変異と viral integration の検討. 第 42 回日本肝臓学会東部会 2018.12.07 ザ・プリンスパークタワー東京 (東京都品川区)
2. 北畑 富貴子. 【ワークショップ 11】癌関連遺伝子変異とウイルスのヒトゲノムへの挿入から検討する肝炎ウイルス制御下肝細胞癌の病態. 第 54 回日本肝臓学会 2018.06.15 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)
3. 北畑 富貴子, 朝比奈 靖浩, 渡辺 守. 【シンポジウム 1: 臨床検体を用いたトランスレーショナルリサーチ】肝癌の臨床検体を用いた癌関連遺伝子プロファイルと病態の解析. 第 104 回 日本消化器病学会総会 2018.04.19 京王プラザホテル (東京都新宿区)
4. Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Kakinuma S, Murakawa M, Nitta S, Nagata H, Kaneko S, Inoue E, Miyoshi M, Tsunoda T, Sato A, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Tanaka S, Tanabe M, Maekawa S, Enomoto N and Watanabe M. Difference of gene mutational profile among viral- and non-viral HCC with or without prior HBV infection: Results of comprehensive deep sequencing analyses of cancer genes and HBV/A AV integration. *EASL, The International Liver Congress 2018* 2018.04.14 Paris (France)
5. 北畑 富貴子, 朝比奈 靖浩, 田中 信二, 村川 美也子, 新田 沙由梨, 柿沼 晴, 永田 紘子, 金子 俊, 浅野 侑, 角田知之, 三好 正人, 井上 恵美, 佐藤 綾子, 井津井 康浩, 中川 美奈, 東 正新, 田邊 稔, 前川 伸哉, 榎本 信幸, 渡辺 守. 【シンポジウム 1 肝炎ウイルス制御後の肝癌の特性と治療: エビデンスとコンセンサス】肝炎ウイルス制御下および B 型肝炎ウイルス既往感染における肝細胞癌遺伝子変異の検討. 第 53 回日本肝臓学会 2017.07.06 京王プラザホテル (東京都新宿区)
6. 北畑 富貴子, 朝比奈 靖浩, 渡辺 守. 【ワークショップ 2: ウイルス性肝炎の病態解析と新規治療】B 型肝炎ウイルス制御下における肝細胞癌遺伝子変異の検討. 第 53 回日本肝臓学会総会 2017.06.08 広島国際会議場 (広島県広島市)
7. Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Kakinuma S, Murakawa M, Niita S, Nagata H, Kaneko S, Otani S, Miyoshi M, Tsunoda T, Sato A, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Tanaka S, Tanabe M, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M. Genetic differences in hepatocellular carcinoma among chronic persistent hepatitis B virus infection with or without viral suppression and prior hepatitis B virus infection. *EASL The International Liver Congress 2017* 2017.04.20 (Amsterdam)

〔図書〕(計1件)

1. 北畑 富貴子, 朝比奈 靖浩. 【内科医が知っておくべき肝癌治療最前線】肝癌ゲノム解析の進歩 精密医療への展開を目指して. *消化器・肝臓内科.* 2017.07; 2 (1): 120-124. (医

中誌 ID: 2017392946)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：田中 真二

ローマ字氏名：TANAKA, Shinji

研究分担者氏名：田邊 稔

ローマ字氏名：TANABE, Minoru

研究協力者氏名：朝比奈 靖浩

ローマ字氏名：ASAHINA, Yasuhiro

研究協力者氏名：柿沼 晴

ローマ字氏名：KAKINUMA, Sei

研究協力者氏名：金子 俊

ローマ字氏名：KANEKO, Shun

研究協力者氏名：紙谷 聡英

ローマ字氏名：KAMIYA, Akihide

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。