

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15938

研究課題名(和文)慢性炎症からの肝発癌過程における塩基除去修復異常の解析

研究課題名(英文) Analysis of base excision repair abnormality in chronic inflammation-mediated hepatocarcinogenesis

研究代表者

恵荘 裕嗣 (ES0, Yuji)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：60760585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌は慢性肝炎～肝硬変を背景に発生することが知られているが、炎症からの肝発癌メカニズムは未だ十分明らかではない。本研究では、炎症により肝細胞に惹起されるDNA修復異常が肝発癌に果たす役割・機序を明らかにすることを目的とした。まず肝培養細胞に対して各種炎症性サイトカイン刺激を行いDNA修復関連遺伝子の発現変化を解析したところ、塩基除去修復に重要なUNGの遺伝子発現が低下していた。さらに、ヒト慢性肝炎および肝硬変の臨床検体においても同様にUNGの遺伝子発現が有意に低下していた。また、UNG mRNAの発現制御には炎症に伴うmicroRNA-18aの発現亢進が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌は臨床的に慢性肝炎～肝硬変を背景に発生することは広く知られているが、その発癌機序については未だ十分明らかではなかった。我々は以前、炎症によるDNA編集酵素の異所性発現による変異の導入・蓄積が肝発癌に寄与していることを明らかにしたが、本研究ではさらに、炎症により惹起されるDNA修復システムの異常により、遺伝子変異が蓄積されやすい状況になっている可能性が示唆された。本研究結果は、慢性肝炎からの肝発癌のみならず、他臓器における炎症発癌メカニズムのさらなる解明および治療戦略研究に繋がる可能性があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma is known to occur in the background of chronic hepatitis and cirrhosis. However, the mechanism of inflammation-mediated hepatocarcinogenesis is still not clear enough. In this study, we aimed to clarify the role and mechanism of DNA repair abnormalities induced by chronic hepatitis in hepatocarcinogenesis. First, we stimulated hepatocytes with various inflammatory cytokines, and analyzed for changes in the expression of DNA repair-related genes. As a result, the expression level of UNG mRNA, which is important for base excision repair, was significantly decreased. Furthermore, UNG mRNA expression was significantly reduced in the clinical samples of chronic hepatitis and liver cirrhosis. In addition, it has been suggested that inflammation-induced upregulation of microRNA-18a may be involved in the regulation of UNG mRNA expression.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 DNA修復 microRNA

1. 研究開始当初の背景

私たちはこれまで、肝炎ウイルス感染を背景とした慢性肝炎、肝硬変からの肝発癌過程に生じるゲノム異常に着目し、DNA 編集酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID)が炎症刺激により肝細胞に異所性に発現することにより、遺伝子変異が生成・蓄積されることを明らかにしてきた(Kou et al. *Int J Cancer* 2007)。また、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析により、肝炎ウイルス感染を背景とした肝硬変症例では肝癌組織のみならず、腫瘍の発生母地となった非癌部の肝硬変組織にも多様な遺伝子変異が潜在的に蓄積していることを明らかにしてきた(Ikeda et al. *Gastroenterology* 2014)。しかしながら、慢性肝炎～肝硬変～肝癌という一連の過程において、遺伝子異常が生成・蓄積される分子メカニズムについては未だ十分に解明されていない。近年の大規模ゲノム解析の結果から、癌の種類や発生臓器によってそれぞれ特有の遺伝子変異パターンを呈していることが明らかとなっており、ヒト肝癌では、C>T/G>A および T>C/A>G の2つの塩基変化パターンが多くを占めていることが知られている(Totoki et al. *Nature Genetics* 2011)。私たちはこの特徴的な遺伝子変異パターンとDNA修復機構の機能異常によりもたらされる遺伝子変化との関連性に着目した。その結果、肝培養細胞に対する炎症性サイトカイン刺激により、DNAミスマッチ修復遺伝子の一つであるMSH2の発現が有意に低下すること、慢性肝炎の臨床検体ではMSH2の発現が低下していること、MSH2を肝細胞特異的に欠損させたマウスモデルでは肝癌が発生すること、さらに肝細胞特異的にAIDを発現させるとともにMSH2を欠損させたマウスには、ヒト肝癌の遺伝子変異パターンに類似した腫瘍が発生することを明らかにし、慢性肝炎からの肝発癌過程においてDNAミスマッチ修復機構の異常が寄与している可能性を初めて報告した(Eso et al. *Cancer Research* 2016)。一方、DNA修復にはDNAミスマッチ修復機構に加えて、もう一つの主要なDNA修復機構である塩基除去修復が重要な役割を果たしている。塩基除去修復は主にシトシン(C)が脱アミノ化によりウラシル(U)に変異した部分を修復し、Uracil-DNA glycosylase(UNG)がその中心的な役割を果たしている。この塩基除去修復の異常はさまざまな遺伝子変異を惹起することが示されており、ヒト大腸癌でも塩基除去修復異常が報告されている(Farrington et al. *Am J Hum Genet* 2005)。さらに、AIDによる遺伝子変異誘導がUNGやMSH2により修復されないと、高頻度にC>T/G>Aの変異パターンが生じることがB細胞の免疫グロブリン遺伝子の変異解析から示されている(Liu et al. *Nature* 2008)。したがって、ヒト肝癌ではC>T/G>Aの変異が高頻度に認められているという事象から、炎症からの肝発癌過程において、ミスマッチ修復異常とともにUNG機能異常が関与している可能性が十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト肝癌で高頻度に認められる遺伝子変異パターンから、DNA修復メカニズムのうち塩基除去修復の異常が肝発癌に関与している可能性に着目し、炎症反応により肝細胞に惹起されるUracil-DNA glycosylase(UNG)の発現制御異常が肝癌の発生に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

肝培養細胞における炎症性サイトカイン刺激によって惹起される塩基除去修復関連酵素の発現制御異常およびその分子機構を明らかにする。さらにヒト慢性肝炎および肝硬変の臨床検体を用いて、慢性肝炎における塩基除去修復関連酵素の発現変化を検証するとともに、その発現変化メカニズムを解明する。

4. 研究成果

まず肝培養細胞に対して炎症性サイトカイン刺激を行い、経時的に細胞を採取して RNA を抽出し、各時相における error-prone DNA polymerase 関連遺伝子群の発現変化の有無を qPCR を用いて解析した。その結果、主要な DNA 修復機構のひとつである塩基除去修復システムにおいて重要な役割をもつ Uracil-DNA glycosylase(UNG)の発現が、炎症性サイトカイン刺激により低下していることがわかった。次に、肝炎ウイルス感染に起因する、肝細胞癌症例の外科的切除標本の非腫瘍部(慢性肝炎もしくは肝硬変組織)、および肝移植ドナーの正常肝組織を用いて検証を行った。各肝組織サンプルから RNA を抽出し、同様に、各種 error-prone DNA polymerase 関連遺伝子の発現変化の有無を qPCR を用いて解析したところ、やはり UNG の遺伝子発現レベルが、慢性肝炎および肝硬変組織において、正常肝組織と比較して有意に低下していることが明らかとなった。

次に、microRNA データベースを用いた *in silico* 解析により、慢性炎症における UNG mRNA の発現制御に関与している可能性のある microRNA を検索したところ、miR-18a、miR-18b、miR-4735-3p の 3 種が候補に挙げられた。各候補 microRNA 発現について検討したところ、そのうち miR-18a の発現が肝培養細胞に対する炎症性サイトカイン刺激、およびヒト慢性肝炎および肝硬変臨床検体において上昇しており、UNG mRNA の発現制御を介して肝発癌に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

1. Yuji Eso, Satoshi Yoshiji, Yuzo Kodama, Hiroshi Seno. Skull metastasis from cholangiolocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease* 49: 1057, 2017.
2. Yuji Eso, Atsushi Takai, Soichi Arasawa, Yoshihide Ueda, and Hiroshi Seno. Granulomatous hepatitis due to disseminated bacillus Calmette-Guérin disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 32: 1538, 2017.
3. Yuji Eso, Masako Mishima, Akihisa Fukuda. An Unusual Cause of Hepatic Dysfunction. *Gastroenterology* 153: 906-907, 2017.
4. Tomonori Matsumoto, Atsushi Takai, Yuji Eso, Kazuo Kinoshita, Toshiaki Manabe, Hiroshi Seno, Tsutomu Chiba, Hiroyuki Marusawa. Epcam-marked proliferating ductal cells drive hepatocellular carcinoma in the injured liver. *Cancer Research* 77: 6131-6143, 2017.
5. Yuji Eso, Norimitsu Uza, Hiroko Yamagishi, Kazuaki Imada, Yuto Kimura, Toshihiko Masui, Yuzo Kodama, Hiroshi Seno. Utility of KRAS mutational analysis in the preoperative diagnosis of synchronous pancreatic cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Medicine(Baltimore)* 96: e9217, 2017.
6. Yuji Eso, Satoshi Yoshiji, Yuto Nakakubo, Minoru Matsuura, Hiroshi Seno. Acute Anorectal Thrombophlebitis Caused by a Protein C Deficiency. *Internal Medicine* 57: 209-212, 2018.
7. Yuji Eso, Masahiro Yoshioka, Hiroshi Seno. Lanthanum phosphate deposition in the gastroduodenal mucosa: An unusual cause of epigastric discomfort. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 33: 1165, 2018.
8. Yuji Eso, Hiroyuki Marusawa. Novel approaches for molecular targeted therapy against hepatocellular carcinoma. *Hepatology Research* 48: 597-607, 2018.
9. Yuji Eso, Norimitsu Uza, Kotaro Shirakawa, Kenji Sawada, Kentaro Katsuragi, Minoru Matsuura, Hiroshi Seno. Choledochoduodenal fistula during chemotherapy with brentuximab vedotin for methotrexate-associated lymphoproliferative disorder. *Internal Medicine* 57: 2203-2207, 2018.

10. Yuji Eso, Atsushi Takai, Kojiro Taura, Ken Takahashi, Yoshihide Ueda, Hiroyuki Marusawa, Hiroshi Seno. Association of Mac-2-binding protein glycosylation isomer level with nutritional status in chronic liver disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 33: 1649-1658, 2018.
11. Yuji Eso, Akihiro Furuta, Atsushi Takai, Ken Takahashi, Yoshihide Ueda, Hiroyuki Marusawa, Hiroshi Seno. Ultrasound-guided microfoam sclerotherapy with polidocanol for symptomatic giant hepatic cyst- Initial experience. *Hepatology Research* 48: 1055-1063, 2018.
12. Satoshi Yoshiji, Ken Takahashi, Kenji Sawada, Masako Mishima, Yuji Eso, Masahiro Morita, Atsushi Takai, Hiroyuki Marusawa, Yoshihide Ueda, Tsuneyo Mimori, Hiroshi Seno. Accelerated Progression of Hepatocellular Carcinoma during Immunosuppressive Therapy with Abatacept for Rheumatoid Arthritis. *Internal Medicine* 58: 67-71, 2019.
13. Yuji Eso, Tadayuki Kou, Hiroki Nagai, Young Hak Kim, Masashi Kanai, Shigemi Matsumoto, Masako Mishima, Soichi Arasawa, Eriko Iguchi, Fumiyasu Nakamura, Haruhiko Takeda, Atsushi Takai, Ken Takahashi, Yoshihide Ueda, Manabu Muto, Hiroshi Seno. Utility of ultrasound-guided liver tumor biopsy for next generation sequencing-based clinical sequencing. *Hepatology Research* 2019, in press.
14. Yuji Eso, Atsushi Takai, Ken Takahashi, Yoshihide Ueda, Kojiro Taura, Hiroyuki Marusawa, Hiroshi Seno. Combination of Mac-2 Binding Protein Glycosylation Isomer and Up-To-Seven Criteria as a Useful Predictor for Child-Pugh Grade Deterioration after Transarterial Chemoembolization for Hepatocellular Carcinoma. *Cancers* 11: 405, 2019.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 肝腫瘍生検におけるソナゾイド造影の積極的併用は診断精度の向上に寄与する
 恵荘裕嗣、竹田治彦、松本知訓、李宗南、船越真木子、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
 日本超音波医学会第90回学術総会 一般演題(口演) 宇都宮(栃木県総合文化センター) 2017.5.27
2. 肝生検におけるソナゾイド造影の積極的併用は診断精度の向上に寄与する
 恵荘裕嗣、荒澤壮一、中村文保、竹田治彦、松本知訓、李宗南、犬塚義、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
 第53回日本肝臓学会総会 一般演題(口演) 広島(広島国際会議場) 2017.6.8
3. Sonazoid-Enhanced Ultrasonography Guidance Improves the Quality of Pathological Diagnosis in the Biopsy of Focal Hepatic Lesions
 Yuji Eso, Atsushi Takai, Yoshihide Ueda, Hiroyuki Marusawa, Hiroshi Seno
 WFUMB 2017 (The 16th World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology Congress in 2017) Taipei (Taipei International Convention Center), Taiwan 2017.10.14
4. KRAS 変異解析が術前診断に貢献した同時性膀胱癌肝内胆管癌の一例
 恵荘裕嗣、増井俊彦、妹尾浩
 第42回日本肝臓学会西部会 一般演題(口演) 福岡(ヒルトン福岡シーホーク) 2017.11.30
5. 巨大肝嚢胞に対するポリドカノールフォームを用いた泡状硬化療法
 恵荘裕嗣、古田昭寛、澤田賢治、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
 第42回日本肝臓学会西部会 一般演題(口演) 福岡(ヒルトン福岡シーホーク) 2017.11.30

6. 慢性肝疾患における肝線維化マーカーM2BPGiと各種栄養関連マーカーの相関性
恵荘裕嗣、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
第 21 回日本病態栄養学会年次学術集会 一般演題(口演) 京都(国立京都国際会館) 2018.1.12
7. 糖鎖マーカーMac-2-binding protein glycosylation isomer(M2BPGi)による慢性肝疾患患者の低栄養リスク評価
恵荘裕嗣、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
第 115 回日本内科学会総会・講演会 一般演題(ポスター) 京都(京都市勧業館みやこめっせ) 2018.4.15
8. 慢性肝疾患における肝線維化マーカーM2BPGiと各種栄養関連マーカーの相関性
恵荘裕嗣、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
第 104 回日本消化器病学会総会 パネルディスカッション「肝線維化・診断・治療の基礎と臨床」東京(京王プラザホテル) 2018.4.19
9. Next-generation sequencing-based clinical sequencing of hepatic tumors by sonazoid-enhanced ultrasound-guided biopsy
Yuji Eso, Atsushi Takai, Ken Takahashi, Yoshihide Ueda, Hiroyuki Marusawa, Hiroshi Seno
APASL (The Asian Pacific Association for the Study of the Liver) Single Topic Conference 2018 Yokohama (PACIFICO Yokohama), Japan 2018.5.11
10. Next-generation sequencing-based clinical sequencing of hepatic tumors by sonazoid-enhanced ultrasound-guided biopsy
Yuji Eso, Atsushi Takai, Ken Takahashi, Yoshihide Ueda, Hiroyuki Marusawa, Hiroshi Seno
AFSUMB 2018 (The 13th Congress of the Asian Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology) Seoul (COEX), Korea 2018.5.23
11. 肝腫瘍生検による癌関連遺伝子変異解析における Sonazoid 造影の役割
恵荘裕嗣、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
日本超音波医学会第 91 回学術総会 シンポジウム 消化器 6「肝臓 診断 肝腫瘍の悪性度診断-B モード・エラスト・Sonazoid 造影」神戸(神戸国際会議場) 2018.6.10
12. 巨大肝嚢胞に対するポリドカノールを用いた泡状硬化療法(foam sclerotherapy)
恵荘裕嗣、古田昭寛、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
第 54 回日本肝臓学会総会 一般演題(口演) 大阪(大阪国際会議場) 2018.6.14
13. 肝線維化マーカーM2BPGiの従来マーカーとの比較および慢性肝疾患患者の低栄養リスク評価への応用
恵荘裕嗣、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
第 54 回日本肝臓学会総会 ワークショップ 12「肝疾患診療に導入された新規技術の臨床的評価」大阪(大阪国際会議場) 2018.6.15
14. 慢性肝疾患・肝細胞癌患者の低栄養リスクマネジメントにおける M2BPGi 測定の有用性
恵荘裕嗣、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩
第 109 回日本消化器病学会近畿支部例会 ワークショップ 1「慢性肝疾患に対するマネジメント」大阪(大阪国際交流センター) 2018.9.29
15. 巨大肝・脾嚢胞に対するポリドカノールを用いた泡状硬化療法(foam sclerotherapy)
恵荘裕嗣、古田昭寛、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩

JDDW2018(第 60 回日本消化器病学会大会) 一般演題 神戸(神戸コンベンションセンター) 2018.11.1

16. 肝腫瘍生検によるクリニカルシーケンス検査(Oncoprime)の現況と Sonazoid 造影の役割

恵荘裕嗣、高井淳、高橋健、上田佳秀、丸澤宏之、妹尾浩

JDDW2018(第 22 回日本肝臓学会大会) 一般演題 神戸(神戸コンベンションセンター) 2018.11.1

17. 肝線維化マーカーM2BPGi による肝細胞癌治療後の肝予備能悪化リスク予測

恵荘裕嗣、高井淳、高橋健、上田佳秀、妹尾浩

第 22 回日本病態栄養学会年次学術集会 YIA(若手研究賞)セッション 横浜(パシフィコ横浜) 2019.1.11

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

いずれも該当なし

※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。