

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07900

研究課題名（和文）肝がんの分化多様性におけるエピゲノム制御システムの意義の解明

研究課題名（英文）Analysis of epigenetic regulation in the diversity of hepatocellular carcinoma

研究代表者

南 達也（Minami, Tatsuya）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60459401

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：がんの tumor heterogeneity は治療反応性の不均一性の原因であり、分子機序解明は重要である。肝がんにも胆管がん様成分が混在し悪性度が増加する場合があるが、その発生機序は未解明である。肝がんゲノムリシークエンスにより、肝がんの一部に IDH 変異が同定されたが、この変異は代謝やエピジェネティクスなどに影響し、細胞分化異常にも寄与する。本研究は IDH 変異が肝がんの胆道系を含めた分化の不均一性形成に及ぼす影響を検証する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では肝がんの発生や進展における分化異常に対する IDH 変異の影響について、遺伝子改変マウスおよび肝がん幹細胞の解析、さらには臨床検体を用いた検討を行い、臨床的マーカーとしての可能性も検証する。IDH 変異が肝がん幹細胞のレベルにおける分化制御に及ぼす影響を解析できる点で学術的意義が高い。さらに IDH 遺伝子変異については、すでに変異特異的な阻害化合物の開発もなされていることも併せ、将来的には特異的分子標的治療および診断法の開発に直結する創造性も有している。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms of tumor heterogeneity remain to be elucidated. Hepatocellular carcinoma sometimes represent mixed subtype including cholangiocarcinoma tissues. This research project aims to address the significance of IDH mutation in the development of heterogeneity in liver cancers.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝癌

## 1. 研究開始当初の背景

IDH1/2 はイソクエン酸を還元し  $\alpha$ -ケトグルタル酸 ( $\alpha$ -KG) を産生する代謝酵素である。細胞内には 100 種類もの様々な  $\alpha$ -KG 依存性脱水素酵素が存在し、DNA やヒストンの脱メチル化酵素 (TET、JMJ family)、低酸素因子 HIF1 $\alpha$  の分解酵素 (EGLN) など含まれる。IDH 遺伝子に変異が起こると、 $\alpha$ -KG から新たに 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) が産生され、2-HG により前述の酵素群の活性が阻害される。その結果、細胞内エネルギー代謝のみならず、エピジェネティック遺伝子発現制御や血管新生などにも影響が及ぶ。

IDH 遺伝子変異はグリオーマや急性骨髄性白血病 (AML) などで driver mutation として注目されているが、その病態における意義はがん種ごとに異なる。グリオーマでは IDH1 変異を有する群は予後が良好で、その変異は WHO grade I, II に多くみられ TP53 変異や 1p/19q 欠失より早期に出現する (Am J Pathol. 2009;174(4):1149-53、J Clin Oncol. 2009;27(25):4150-4)。一方白血病では予後を悪化させ、MDS でも、病期が進行するほど IDH 変異の割合が上昇する (Haematologica. 2010;95(10):1668-74)。

一般に哺乳類正常発生での多岐にわたる細胞系譜への分化は Genetic ではなく Epigenetic な遺伝子発現機序で決定される。多様な Epigenetic 修飾による遺伝子発現の変化は、がん細胞においても分化状態などに影響し、その生物学的特性を変化させうる。慢性障害肝におけるがん化が肝細胞の脱分化を伴うことは、胎児性タンパクである AFP が肝がんの腫瘍マーカーであり、慢性障害肝でも上昇していることから明らかである。最近では肝細胞がんの組織の中に、胆管細胞系譜の性質をもつがん細胞が混在している、さらには経過中に胆管細胞のマーカーが二次的に出現し、同時にがんの悪性度が増加するなどの臨床上の知見が得られている。しかしながら、いわゆる脱分化、分化転換といわれる現象と寄与する分子機構に関しては不明な点が多い。最近の肝がんゲノムリシークエンスデータにより、混合型肝がんの一部において IDH 変異が同定された (Cell Rep. 2017;18(11):2780-2794)。IDH 変異は細胞分化にも影響しうるということが報告されており、いわゆる混合型肝がんのような特異的な分化異常に寄与する可能性も考えられる。実際に肝前駆細胞に IDH1 変異を強制発現させると、HNF-4 $\alpha$  発現が低下し、肝細胞への分化が抑制、胆管系への分化が促進される。さらに KRAS 変異と合併すると肝内胆管がんを発生する (Nature. 2014;513(7516):110-4)。これらのデータは IDH1 変異と混合型肝がん発生のついでに我々の仮説を支持していた。

## 2. 研究の目的

本研究では、白血病、グリオーマ、胆管がんのみならず、一部の肝がんでは認められることが報告された IDH1/2 遺伝子変異が、肝腫瘍の表現型にどのように影響するのかについて解析する。さらには IDH 変異特異的な代謝産物である血中 2-HG を生体マーカーととらえ、臨床現場での検出系が提示しうる病態予測・治療効果判定の有用性について検討する。

## 3. 研究の方法

IDH 変異がエピゲノムを介した分化転換を誘導し、いわゆる混合型肝がんなどの発症に関与するという仮説を検証すべく、遺伝子改変マウスモデルを用いて検討する。

今回用いる CAG-*Lox Stop Lox-IDH1* transgenic mice および *PIK3CATg* マウスはいずれも申請者

の所属する研究室で独自に樹立され、後者は脂肪肝からの肝腫瘍自然発生モデルとして報告した ( J Hepatol. 2011;55(6):1400-8. )。さらにはそのモデルにおける肝がん幹細胞分画も同定し報告している ( Oncogene. 2017 Jul 10. doi: 10.1038/onc.2017.222. )。さらに血中 2-HG の検出を通して、肝がんの悪性度の変化の前兆や進行を予測する診断的マーカーとなりうるかについても検討する。

#### 4 . 研究成果

脂肪肝からの肝腫瘍発生モデル Alb-*PI3K*<sup>g</sup> マウスは肝での PI3K シグナル恒常的活性化により若齢期から著明な脂肪肝を呈し、約 9 ヶ月の経過で自然発生的に肝腫瘍を形成する ( Kudo.et.al. J Hepatol. 2011;55(6):1400-8 )。研究分担者の中塚は、このマウスの肝腫瘍発生において CD44 陽性肝細胞が KDM3A ヒストン脱メチル化酵素依存的に AP-1 シグナルによって誘導され、腫瘍形成能を有する細胞集団であることを明らかにした ( Oncogene. 2017 Jul 10. doi: 10.1038/onc.2017.222. )。

今回、野生型 IDH1(WT)および変異型 IDH1(R132C)を肝特異的に発現誘導が可能な遺伝子改変マウス ( CAG-*Lox Stop Lox- IDH1* transgenic mice ) をそれぞれ作製し、Albumin プロモーター制御下 Cre マウスと交配し、肝芽細胞系譜で各々の IDH を発現させた。

野生型 IDH1(WT)および変異型 IDH1(R132C)発現マウス血清中 2-HG の質量分析を行い、変異型でのみ 2-HG が検出された。マウスの肝臓における表現型を現在解析中である。

一方で肝内胆管に野生型 IDH1(WT)および変異型 IDH1(R132C)を発現させたところ、変異型 IDH1(R132C)が明らかに細胞の増殖を促進させることを見出した。その背景として解糖系の調節因子である PFK の発現上昇を通して、解糖系の亢進が誘導されることを見出しており、現在肝細胞における変異 IDH1 の意義についても解析中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Sapena Victor, Enea Marco, Torres Ferran, Tateishi Ryosuke, Minami Tatsuya, Sangiovanni Angelo, Forns Xavier, Toyoda Hidenori, Brillanti Stefano, Conti Fabio, Degasperis Elisabetta, Yu Ming-Lung, Nagata Hiroko, Nakagawa Mina, Asahina Yasuhiro, Masetti Chiara, Reig Maria, et.al.	4. 巻 Mar 19
2. 論文標題 Hepatocellular carcinoma recurrence after direct-acting antiviral therapy: an individual patient data meta-analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 323663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/gutjnl-2020-323663	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 Nakatsuka Takuma, Nakagawa Hayato, Hayata Yuki, Wake Taijiro, Yamada Tomoharu, Nishibatake Kinoshita Mizuki, Nakagomi Ryo, Sato Masaya, Minami Tatsuya, Uchino Koji, Enooku Kenichiro, Kudo Yotaro, Tanaka Yasuo, Kishikawa Takahiro, Otsuka Motoyuki, Tateishi Ryosuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 Mar 12
2. 論文標題 Post-treatment cell-free DNA as a predictive biomarker in molecular-targeted therapy of hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 01773-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-021-01773-4	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 Fukumoto Tsuyoshi, Minami Tatsuya, Tateishi Ryosuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Chronological change in alpha fetoprotein levels in hepatocellular carcinoma after eradication of hepatitis C virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Liver International	6. 最初と最後の頁 2305 ~ 2306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/liv.14544	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 Enooku Kenichiro, Tsutsumi Takeya, Okushin Kazuya, Fujinaga Hidetaka, Nakagomi Ryo, Minami Tatsuya, Nakagawa Hayato, Asaoka Yoshinari, Tateishi Ryosuke, Moriya Kyoji, Yotsuyanagi Hiroshi, Koike Kazuhiko et. al.	4. 巻 55
2. 論文標題 Hepatic FATP5 expression is associated with histological progression and loss of hepatic fat in NAFLD patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 227 ~ 243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-019-01633-2	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0件

〔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
研究分担者	立石 敬介  (Tateishi Keisuke)  (20396948)	東京大学・医学部附属病院・講師   (12601)	
研究分担者	中塚 拓馬  (Nakatsuka Takuma)  (50772042)	東京大学・医学部附属病院・助教   (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------