

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08443

研究課題名（和文）全ゲノム解析とオルガノイド培養を用いた多段階肝発癌分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of the mechanism of multi-step hepatocarcinogenesis via whole genome sequence and organoid culture technology

研究代表者

高井 淳 (Takai, Atsushi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80760587

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：結節内結節型肝細胞癌を対象とした全ゲノム解析により、ヒト肝癌で最も高頻度に同定されるTERT遺伝子に関連する異常はすべてtrunk aberrationとして認められるのに対し、unique aberrationとしてはPTENやTP53などの癌関連遺伝子における異常が多数認められ、症例によって異なっていることが明らかとなった。本研究の結果より、TERT遺伝子に関する異常は肝癌のinitiationに關与するイベントであるが、肝癌の多血化・悪性化には多様な分子経路の異常が関わっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、肝発癌の初期にはTERT遺伝子異常が必須である一方で、肝癌の進行期には多様な遺伝子異常や分子経路の異常が關与することが分かった。本研究により、多段階発癌の分子生物学的メカニズムの一端が解明された。本研究成果を基盤として、TERTを標的とした分子標的治療や、症例によって異なる遺伝子異常をターゲットとしたオーダーメイドの分子標的治療の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In the current study, we demonstrated the genetic landscape of multistep carcinogenesis in NIN-HCCs through comprehensive genetic analysis with multiregional WGS. We found that well-differentiated HCC already bears various genetic aberrations including point mutations, not only point mutations but also STVs and hypermethylation of the TERT promoter region occurred as the trunk events in HCC, indicating that cellular immortalization by TERT aberration could be the key driver event in the initiation step of hepatocarcinogenesis. In addition, in the progression phase of hepatocarcinogenesis, a particular tumor cell among the immortalized cellular population newly acquires several genetic aberrations involved in some oncogenic pathways and evolves from slow growing tumor cells to rapid-growing malignant cells, resulting in the formation of an inner aggressive HCC nodule.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、C型肝炎やB型肝炎、脂肪性肝炎などの慢性肝炎組織を母地に好発することが知られている。申請者らは、慢性炎症刺激によって発現する遺伝子編集酵素の activation-induced cytidine deaminase (AID)による変異導入活性が肝発癌に寄与することを報告してきた(Takai et al. *Oncogene* 2009)。また、C型肝硬変を背景に生じた肝細胞癌症例では、肝癌組織のみならず、非癌部肝組織においてもすでに遺伝子変異の蓄積が認められることを明らかにした(Ikeda et al. *Gastroenterology* 2014)。このように、持続的な炎症刺激により遺伝子変化が生成・蓄積することが肝発癌に関与することが分かっている。

一方、近年のシーケンス技術の進歩に伴い、種々の悪性腫瘍におけるゲノム異常の全体像が徐々に明らかとなってきた。最近の次世代シーケンサーを用いた解析により、クロマチンリモデリングに関与する *ARID1A* や *ARID2* の変異や、細胞寿命に関わる *TERT* 遺伝子のプロモーター領域の異常などが新たに明らかとなってきた(Fujimoto et al. *Nat Genet* 2016)。しかしながら、このような網羅的なゲノム解析が進むにつれ、肝細胞癌で見られる遺伝子異常は極めて多様であることが分かかってきており、現段階では肝発癌・進展の各段階においてドライバーとなるゲノム異常は不明なままである。

肝細胞癌のゲノム異常が多彩である理由は、肝細胞癌が持続的な慢性炎症刺激により徐々に遺伝子異常を獲得し、多段階発癌過程を経て発生するためと考えられている。近年、'Trunk-Branch hypothesis' と呼ばれるがんゲノムの進化過程が注目されており、ゲノム変化は、癌の発生早期から認められ、ほぼすべての細胞が有している 'trunk mutation' と、癌が進展する過程で個々の細胞集団が獲得する 'branch mutation' に大きく分類される。肝細胞癌の場合、全ゲノム解析の結果より、*TERT* プロモーター異常が70%程度に認められるため、trunk mutation の候補と考えられているが、肝発癌のどの段階で獲得されたかは明らかになっていない。また、乏血性の高分化肝細胞癌は経過中に脱分化して多血性腫瘍となるが、その原因となるゲノム変化については全く分かっていない。

本研究で対象とする結節内結節型肝細胞癌は、乏血性の高分化肝細胞癌の一部が脱分化を起こして新たな多血性結節を形成した、境界明瞭な異なる分化度の領域が同一腫瘍内に併存する病変である。この腫瘍の起源は同一の細胞であると考えられており、肝細胞癌の多段階発癌過程を表している病態とされている。結節内結節型肝細胞癌の乏血性腫瘍部と多血性腫瘍部におけるゲノムを比較解析することにより、早期高分化肝細胞癌の発生に重要なゲノム変化、および早期肝癌が脱分化・多血化するのに中心的な役割を果たすゲノム変化を同定し、多段階肝発癌過程における分子機序を解明することが可能である。乏血性・多血性の各腫瘍部から採取したサンプルをオルガノイド培養することにより、各クローンに特徴的な分子生物学的形質を明らかにすることで、将来的に肝癌の新規治療法の開発につなげられる可能性がある。上記の点を明らかにすべく、本研究課題の提案に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、高分化肝細胞癌の一部が脱分化して新たな多血性結節を形成した「結節内結節型肝細胞癌」に着目し、全ゲノム解析を用いて、肝細胞癌の多段階発癌過程の分子機序を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

#### 1)臨床検体のサンプリング

外科的切除前の造影 CT もしくは造影 MRI 検査にて明瞭な NIN-HCC の形態を呈し、かつ肉眼的・病理組織学的にも画像所見と同様に併存する病変の境界を確認しえた、NIN-HCC 5 症例(C 型肝炎 3 例、B 型肝炎 1 例、その他 1 例)を対象とした。乏血結節部(OUT)および多血結節部(IN)よりそれぞれ 1 サンプル以上を採取し、コントロールとして各症例のリンパ球もしくは非癌部肝組織を採取した。また、Case 5 では別病変として認められた高分化肝細胞癌と、非癌部肝組織の再生結節を 1 か所ずつ採取した。Case 4 のサンプリングを代表例として図 1 に示す。

#### 2)全ゲノム解析

採取した合計 23 サンプルより DNA を抽出し、HiSeq X を用いて全ゲノム解析を施行し、ゲノム変異および構造異常について解析を行った。

### 4. 研究成果

全ゲノム解析にて、平均すると IN では 7735.6 個 (2.7 個/Mb)、OUT では 7464.3 個 (2.6 個/Mb)の体細胞変異が認められ、両者の数には有意な差がなかった。非癌部肝組織におけるゲノム変異は非常に少なかったが、再生結節では多くの変異が認められた。ただ、遺伝子をコードする領域では、IN では 77 個、OUT でも 66.9 個の変異が認められたのに対し、再生結節ではほとんど変異が認められなかった。

#### 1)系統樹解析

各症例における IN, OUT およびコントロールとしてのリンパ球(L)および非癌部肝組織(NT)におけるゲノム変異をもとに、進化系統樹を作成すると、いずれの症例でも、IN および OUT に共通する trunk mutation が既知の癌関連遺伝子に認められたほか、多血性の IN に特異的に認められる変異も同定された。例えば、trunk mutation としては、Case 1 と 2 では SYNE1、Case 3 では MALAT1、Case 4 では *TP53* に変異が認められたほか、*TERT* プロモーター変異は Case 2 と 3 で認められた。一方、IN 特異的な変異としては、Case 1 では *ARID1A* と *CTNMB1* に、Case 4 では *PTEN* に変異が認められた。

#### 2)染色体構造解析

平均すると、IN では 19.8 個の構造異常が、OUT では 27.5 個の構造異常が認められた。興味深いことに、IN と OUT に共通して、Case 2 では chr1q に、Case 4 では chr2q に、それぞれ 12 個、44 個の構造異常の集中が認められており、chromothripsis が trunk の段階で生じているものと考えられた。また、全症例の IN および OUT のサンプルでは、76 種類の肝癌関連遺伝子のうち、8 種類の遺伝子領域の近傍で構造異常の breakpoint が検出された。例えば、Case 5 では、trunk event として、IN と OUT の両者で *TERT* の開始コドンの近傍と *RAP11* 遺伝子のエンハンサーの融合が認められた。

#### 3)Trunk event としての *TERT* 異常

前述の通り、Case 2 と Case 3 では *TERT* プロモーター変異が Trunk event として認められており、Case 5 では *TERT* プロモーターにおける転座が認められていた。興味深いことに、Case 4 では IN と OUT とともに、B 型肝炎ウイルスゲノムの integration が *TERT* プロモーター領域において認められていた。Case 1 では *TERT* 遺伝子のゲノム異常は認められなかつ

たが、プロモーター領域における高度のメチル化が認められた。TERT プロモーターのメチル化は TERT の高発現に強く関与していると報告されており、実際 Case 1 を含めてすべての症例で IN および OUT における TERT 発現の上昇が認められていた。

#### 4) 多段階肝発癌過程で獲得されるゲノム異常の全体像

全症例において、IN と OUT に共通する TERT の異常が認められており、肝発癌の初期段階では TERT のゲノム異常もしくはエピゲノム異常による発現上昇が重要であることが示唆された。一方、乏血性から多血性に変化する過程で獲得されるゲノム異常は、Case 1 では ARID1A や CTNMB1 の変異、Case 4 では PTEN の変異(trunk の異常として片アレルが欠失)など、さまざまであった。

これまでの研究から、肝細胞癌には多彩なゲノム異常が認められ、中でも TERT プロモーター変異が最も高頻度であり、発癌に際して重要である可能性が示唆されてきたが、ゲノム異常獲得の順序や多段階肝発癌過程における役割についてははっきりと分かっていなかった。本研究では、NIN-HCC 症例の切除検体を対象にマルチサンプリングを行い、全ゲノムシーケンスを行うことによって、肝癌の進化過程で獲得されるゲノム異常の landscape を明らかにした。いずれの症例においても、IN と OUT に共通する trunk のイベントとして、TERT の異常が同定された。その種類としては、従来報告されてきたプロモーター変異のみならず、他の遺伝子との転座や B 型肝炎ウイルスゲノムの組み込みのほか、プロモーター領域の特定の部位のメチル化が認められており、いずれの症例においても TERT は癌部において高発現していた。これらの結果より、TERT 異常による細胞の不死化が起こることが、肝発癌の初期段階で重要である可能性が示唆される。

一方で、多血性の IN と乏血性の OUT ではゲノム変異の数および構造異常の数の上では有意な差を認めなかった。Case 5 の再生結節では癌部とほぼ同等のゲノム変異が認められる一方で、癌関連遺伝子には変異が同定されなかったことも合わせると、ゲノム異常の数と肝発癌およびその進展は必ずしも相関せず、異常の入る遺伝子の種類が重要であるものと考えられる。実際今回の研究では、多血性の IN に特異的な異常として、PTEN の変異や CTNMB1 の変異が同定されている。しかしながら、多血化にあたって各症例に共通した異常は認められず、肝癌の進展の際に獲得されるゲノム異常は症例によって異なるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Takeda Haruhiko, Takai Atsushi, Kumagai Ken, Iguchi Eriko, Arasawa Soichi, Eso Yuji, Shimizu Takahiro, Ueda Yoshihide, Taura Kojiro, Uemoto Shinji, Kita Ryuichi, Haga Hironori, Marusawa Hiroyuki, Fujimoto Akihiro, Seno Hiroshi	4. 巻 252
2. 論文標題 Multiregional whole genome sequencing of hepatocellular carcinoma with nodule in nodule appearance reveals stepwise cancer evolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 398 ~ 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5533	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹田治彦、高井淳、妹尾浩
2. 発表標題 全ゲノムシーケンスを用いた多段階肝発癌過程の包括的解析
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹田治彦、高井淳、妹尾浩
2. 発表標題 全ゲノムシーケンス解析を用いた結節内結節型肝癌の病理像とゲノム異常の比較解析
3. 学会等名 JDDW2019
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------