

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590774

研究課題名(和文)

肝癌発生過程における発癌関連遺伝子への変異生成の分子機序の解析

研究課題名(英文)

Mechanisms of genetic alterations during the process of liver cancer development.

研究代表者

丸澤 宏之(MARUSAWA HIROYUKI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80324630

研究成果の概要(和文)：慢性肝炎・肝硬変からの肝発癌過程において、炎症反応により、遺伝子編集酵素 AID がヒト肝細胞に誘導される。その結果、AID の有するゲノム異常誘導活性を介して肝細胞のさまざまな遺伝子のゲノム配列に塩基変化とともに染色体レベルで DNA コピー数の変化が発生することが明らかとなった。慢性炎症により肝細胞に発現誘導された AID によるゲノム異常が、HCV 感染からの肝癌の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tumorigenesis is a multistep process in which the accumulation of genetic alterations drives the transformation of normal cells into malignant derivatives. Activation-induced cytidine deaminase (AID) contributes to immune system diversity by inducing somatic hypermutations and class-switch recombinations of human immunoglobulin genes. The mutagenic activity of AID, however, can also induce genetic changes including somatic mutations and submicroscopic chromosomal deletions in various gene loci in hepatocytes and gastric epithelial cells and may lead to the development of cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成 21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 22 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：AID、肝癌、遺伝子変異、APOBEC2、炎症

1. 研究開始当初の背景

ヒトの発癌過程において、細胞増殖やアポトーシス制御などに関連したさまざまな遺伝子にゲノム異常が生成・蓄積することが知られているが、その発生機序の大部分は不明のままである。例えば、遺伝性非ポリポーシス大腸癌を始めとする一部の消化器癌では、DNA 修復遺伝子の異常が遺伝子変異生成の要因として注目されているが、大部分のヒト消化器癌、特に肝細胞

癌や胃癌ではこのような DNA 修復遺伝子の異常はほとんど認められていない。したがって、これらの悪性腫瘍の発生過程では、DNA 修復系の異常以外の要因が、ゲノム異常の生成に寄与している可能性がある。

近年、DNA や RNA に変異を導入する活性を有する一群の分子(遺伝子編集酵素)が相次いで同定された。この遺伝子編集酵素 Apolipoprotein B100 mRNA Editing Enzyme (APOBEC) family に属する分子は、

cytidine deaminase 活性を介して標的となる DNA や RNA に遺伝子変異を生成する作用を発揮すると想定されている。大部分の APOBEC family 分子は、ヒトの RNA 配列や外来性のウィルス遺伝子に変異を導入する活性をもつが、その中で Activation-induced cytidine deaminase (AID) は唯一、ヒト自身の遺伝子(DNA)配列に変異を導入する活性を有することが示されている。生理的条件下では、AID は活性化 B 細胞においてのみ発現しており、免疫グロブリン遺伝子の DNA 配列上に塩基変化を導入する活性を介して、免疫グロブリンのクラススイッチ組換えと体細胞突然変異に必須の役割を果たしていることが示されている。しかしながら、ヒトの悪性リンパ腫やリンパ系白血病では AID の発現増強が高頻度に認められることが報告され、AID によるゲノム異常の生成がヒトリンパ系悪性腫瘍の発生・進展に深く関与していると想定されるようになってきた。さらに興味深いことに、AID トランスジェニック・マウスは、全身の組織での AID の持続的発現により、リンパ系腫瘍とともに肺腫瘍(腺腫・癌)、肝癌、胃癌など上皮系腫瘍が発生することが判明した。これらの知見から、DNA 変異活性を有する AID が、リンパ系悪性腫瘍のみならず、様々な上皮系腫瘍の発生過程における遺伝子変異の生成・蓄積に重要な役割を果たしている可能性が示唆されるようになった。

申請者らは、大部分のヒト肝癌・胃癌は慢性炎症を背景として発生すること、AID がヒト自身の DNA に遺伝子変異を導入する活性を有すること、AID のトランスジェニック・マウスではリンパ系腫瘍のみならず肝癌や胃癌などの消化器癌が発生することに着目し、DNA 変異活性を有する AID が、炎症からの消化器癌の発生過程における遺伝子変異生成に関与している可能性についての検討を開始した。ヒト臨床検体を用いた検討からは、生理的条件下では AID はヒト正常上皮組織ではほとんど発現しておらず、リンパ組織の胚中心に存在する B 細胞においてのみ、その発現を認めることが確認された。これに対して、肝炎や胃炎など慢性炎症を伴ったヒト肝細胞・胃上皮細胞では、ヒト肝癌・胃癌の癌細胞と同様に、内在性 AID タンパクが過剰発現していることが明らかとなった。培養細胞を用いた *in vitro* の解析からは、炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 の刺激により、転写因子 NF- κ B 依存性に、肝細胞や胃上皮細胞で AID が発現誘導されること、この AID の過剰発現により *p53* や *c-myc* をはじめとする種々の発癌関連遺伝子に変異が生成・蓄積することが明らかとなった。

以上の申請者らの成績から、ヒト肝癌・胃癌の発癌過程において、感染症や炎症性サイトカイン刺激により肝細胞や胃上皮細胞に異所性に AID が発現誘導されること、その結果、遺伝子変異が生成・蓄積し腫瘍発生に重要な役割を果たしていること、が明らかとなった。

2. 研究の目的

申請者らのこれまでの研究により、炎症性サイトカイン刺激により肝細胞や胃上皮細胞に異所性に遺伝子編集酵素 AID が発現誘導されること、その結果、遺伝子変異が生成・蓄積し、肝癌や胃癌の発生に重要な役割を果たしていること、が明らかになった。しかしながら、発癌過程において AID の変異導入の標的となる遺伝子は不明である。申請者らのこれまでの検討から、AID には各臓器や細胞に特異的な標的遺伝子が存在し、それが臓器特異的な発癌機序の成立に関与している可能性が推定されている。そこで、本研究は、肝癌の発生過程における AID による遺伝子変異の標的分子を特定することにより、肝発癌に重要な役割を果たす発癌関連遺伝子領域を同定するとともに、炎症からの肝癌発生過程における遺伝子編集酵素の役割を明らかにすることにより、ヒト肝癌発生の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) AID 発現により上皮細胞中に生成・蓄積するゲノム異常の経時的・網羅的解析と、肝癌発生過程における遺伝子編集酵素の役割の解明 ;

AID の過剰発現の結果、マウスに発生した悪性リンパ腫細胞と肝癌では腫瘍細胞中にみられる遺伝子変異パターンが大きく異なっている。これは、各臓器や細胞に特異的な AID の標的遺伝子が存在し、それが臓器特異的な発癌機序の成立に関与している可能性を示唆するものである。そこで、肝癌・胃癌の発生過程における、AID によるゲノム異常の標的分子を同定することにより、各臓器の発癌に中心的な役割を果たしている発癌関連遺伝子の探求を行った。まず、AID 発現により肝細胞・胃上皮細胞にもたらされるゲノム変化像を網羅的に解析する目的で、AID トランスジェニック・マウスの肝細胞と胃上皮細胞を胎生期から経時的に分離し DNA の抽出を行った。引き続き、これらの DNA サンプルを鋳型として、発癌に深く関与しているとされる代表的な癌関連遺伝子 (*p-53*, β -カテニン, *k-ras*, *c-myc*, *PTEEN*, *APC* など) のクローニングと塩基配列の決定を網羅的に行うとともに、ゲノム全体を網羅する一塩

基多型検出用マイクロアレイを用いた comparative genomic hybridization (CGH) 解析を用いて遺伝子コピー数の変化を探索することにより、各臓器において AID の恒常的な活性化の結果生じたゲノム異常の全体像をとらえるとともに、AID による臓器特異的な標的遺伝子の探索を行った。

また、申請者らはこれまで、ヒト肝細胞系培養細胞 (HepG2, Huh7, Hep3B) に AID を発現させる系として、レトロウイルスベクターを用いた AID 発現系を構築してきた。しかしながら、これらの肝癌由来の培養細胞株と異なり、ヒト肝組織から樹立した初代肝培養細胞にはレトロウイルスベクターの感染効率がきわめて悪かった。そこで、ヒト初代肝培養細胞への AID の発現導入を実現するため、AID を発現するレンチウイルスベクターの作成を行い、この AID 発現レンチウイルスを初代ヒト肝培養細胞に導入した。引き続き、AID 活性化後の細胞から DNA を経時的に抽出し、これらの DNA サンプルを鋳型として、各種癌遺伝子・癌抑制遺伝子をクローニングし、塩基配列を同定、遺伝子変異生成の有無の解析を行った。肝細胞と同様に、胃上皮培養細胞にも AID を発現するレンチウイルスベクターを感染導入し、AID 活性化後のゲノムサンプルを抽出した。これらの細胞を用いて AID を発現させた結果生じたゲノム異常の全体像を明らかにするとともに、AID による標的遺伝子の選別機構を解明する目的で、トランスジェニック・マウスの各組織と同様に CGH 解析を行った。以上の検討を進めることにより、AID 発現の結果、ヒト初代肝培養細胞、胃上皮細胞で生じたゲノム異常の全体像の解明を進めた。

(2) 肝細胞特異的に AID を発現する遺伝子改変マウスの作成とその表現型の解析 ;

申請者らのこれまでの検討から、AID を全身に発現したトランスジェニック・マウスは、リンパ系腫瘍とともに、肝癌、肺癌、胃癌など多様な上皮系腫瘍を発生することが明らかとなっている。しかしながら、大部分の AID トランスジェニック・マウスは生後約 30-50 週で悪性リンパ腫を発生し、リンパ腫の疾患進行の速さから早い段階でのマウスの死亡が多く見られる。このため、AID 発現の肝発癌における役割の解明には、マウスモデルにて、肝癌の発症率を向上させる必要がある。そこで、肝臓特異的に AID を過剰発現するマウスモデルとして、① AID を発現するレンチウイルスベクターをマウスの尾静脈より静注し、肝臓で AID を過剰発現する系、② 胎生期の肝組織に高い発現を認める Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) に着目し、

TNAP を発現する細胞に特異的に AID を発現する TNAP-AID マウスの系、という 2 つの解析系を構築した。これらのマウスの表現型の解析を行うとともに、マウスの生存率の検討、肝癌発生の有無の検討を肉眼的・病理組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) AID 発現により上皮細胞中に生成・蓄積するゲノム異常の経時的・網羅的解析と、肝癌発生過程における遺伝子編集酵素の役割の解明 ;

まず、AID を発現するレンチウイルスベクターの作成を行った。AID 遺伝子の cDNA (597Bp) をクローニングし、Puromycin 耐性遺伝子の組み込まれたレンチウイルス発現ベクターに組み込み、その後、パッケージングベクターと共に 293 細胞に導入し、組換えウイルス粒子としての AID 発現レンチウイルスを作成した。次に、ヒト肝組織から樹立した初代ヒト肝培養細胞にレンチウイルスベクターを感染させ、発現マーカー分子 (GFP) を用いて至適な発現条件を選定した。次に、AID 発現レンチウイルスを初代ヒト肝培養細胞に導入し、AID 活性化後の細胞由来の DNA を用いて CGH アレイ解析を行った。具体的には、AID 活性化後の細胞から抽出した DNA サンプルを制限酵素処理し、末端にアダプターをライゲーションさせ、このアダプター配列を認識するプライマーを用いて DNA フラグメントの増幅を行った。増幅した DNA を再びフラグメント化し標識した後に、約 50 万セットの一塩基置換検出可能な Genome Mapping Array にハイブリダイズさせ、高分解能アレイスキャンでデータ解析を行い、遺伝子アノテーションデータベースを用いた網羅的な遺伝子コピー数変化の解析系を樹立した。次に、AID 発現レンチウイルスを用いてヒト肝組織から樹立した初代ヒト肝培養細胞に AID を 3-4 週間持続発現させたところ、AID 発現後の肝細胞から抽出したゲノムには、ほぼすべての染色体領域にわたって散在性に、多様な遺伝子コピー数異常が生じており、その大部分は一定の染色体領域の欠失として生じていることが CGH アレイ解析より明らかとなった。さらに、この染色体領域の欠失のうち一部の特定の領域については、再現性をもって AID 発現により時間依存性に欠失領域が広がっていく現象が確認された。次に、CGH microarray 法で検出された染色体レベルでの欠失領域に含まれる遺伝子群をゲノムデータベースから同定し、それぞれの遺伝子に特異的なプローブを作成し、real-time RT-PCR 法により染色体異常出現領域における遺伝子発現量の定量評価を

行った。興味深いことに、AID 発現により欠失の生じた染色体領域には細胞増殖や細胞死など生体の恒常性維持・制御に関連するさまざまな遺伝子が含まれており、これらの遺伝子発現が AID による染色体欠失の結果、大きく変化してくることが明らかとなった。同様の所見は、ヒト胃培養細胞でも確認され、上皮細胞における AID の持続発現の結果、突然変異のみならず遺伝子コピー数の異常が染色体レベルでも惹起されることがわかった。注目すべき点として、ヒト胃上皮由来の AGS 細胞に AID を持続発現させた結果、CGH 解析において再現性をもって欠失を認める遺伝子領域には、癌抑制遺伝子である *CDKN2A*, *CDKN2B* locus が含まれていることがわかった。そこで、*CDKN2A*, *CDKN2B* 遺伝子に特異的なプローブを用い、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法にて解析を行ったところ、AID を過剰発現する細胞においては、AID を発現しないコントロール細胞に比し有意に *CDKN2A*, *CDKN2B* 遺伝子領域の欠失が誘導されることが明らかとなった。また、AID Tg マウス胃上皮における Real-time genomic PCR 解析からは、野生型マウスに比し有意に *Cdkn2a*, *Cdkn2b* 遺伝子領域の DNA コピー数が減少していることがわかった。さらに、*H. pylori* を長期間感染させた野生型マウスの胃上皮では、非感染野生型マウスに比し有意に *Cdkn2a*, *Cdkn2b* 遺伝子領域の DNA コピー数減少していることが Real-time genomic PCR 解析により明らかとなった。一方、AID knockout マウスに *H. pylori* を長期感染させても DNA コピー数減少を認めず、*H. pylori* 感染により誘導された *Cdkn2a*, *Cdkn2b* 遺伝子領域の DNA コピー数減少は AID 依存性であることが明らかとなった。さらに、AID Tg マウス胃上皮における遺伝子変異解析では、胃癌部・非癌部のいずれにおいても、野生型マウスに比し有意に *Cdkn2a*, *Cdkn2b* 遺伝子変異の蓄積を認めた。*H. pylori* 感染を伴ったヒト臨床検体 (慢性胃炎・胃癌) を用いた検討からは、胃癌症例の約 1/3 において、非癌部に比し癌部の *CDKN2A*, *CDKN2B* 遺伝子 DNA コピー数減少を認めた。また、癌部で *CDKN2A*, *CDKN2B* 遺伝子 DNA コピー数減少を認めた症例においては、これらの遺伝子の mRNA 転写量も減少していることが確認された。以上の結果から、炎症ならびに感染を契機に胃上皮細胞に異常発現した AID は、発癌に関連した遺伝子領域 (*CDKN2A*, *CDKN2B*) に遺伝子変異とともに遺伝子領域の欠失をも引き起こし、発癌過程において重要な役割を果たしているという可能性が示唆された。

(2) 肝細胞特異的に AID を発現する遺伝子改変マウスの作成とその表現型の解析 ;

肝臓特異的に AID を過剰発現するマウスモデルとして、(1) AID を発現するレンチウイルスベクターをマウスの尾静脈より静注し、肝臓で AID を過剰発現する系、(2) 胎生期の肝組織に高い発現を認める TNAP 発現細胞に特異的に AID を発現する TNAP-AID マウスの系、の構築を試みた。まず、ウイルスベクターをマウスの尾静脈から急速静注する系を用いた検討を行った。しかしながら、GFP 発現ウイルスベクターを用いたコントロール解析からは、投与されたウイルスベクター由来の GFP タンパク質の発現が肝組織内で主に肝細胞系ではなく胆管上皮に限定して認めることがわかった。このため、肝細胞特異的な AID の持続発現を達成するための方策としては不適と判断し、TNAP 発現細胞に特異的に AID を発現する TNAP-AID マウスの作成とその解析を進めた。TNAP は stem cell marker としても報告があるように、胎生期のマウスのさまざまな臓器にその発現を認めることが確認されたが、中でも特に肝細胞に高発現していることが野生型マウスの肝細胞から抽出した RNA サンプルを用いた Real-time-RT PCR 解析によりわかった。この TNAP-AID マウスの表現型を平均約 72 週齢で検討したところ、高率に肝癌を発生していることがわかった。TNAP-AID マウスに発生した肝癌は、ヒト肝癌の腫瘍マーカーである AFP を強く発現しており、病理組織学的検討からもきわめてヒト肝癌に類似した組織像を呈していることが明らかとなった。興味深いことに、TNAP-AID マウスの肝組織中には非発癌領域においても効率に癌抑制遺伝子 TP53 に変異が生成・蓄積していることが判明した。以上の結果から、肝細胞に特異的に AID を持続発現した結果、TP53 をはじめとするさまざまな発癌関連遺伝子に体細胞変異が蓄積することが、肝癌の発生につながったものと推定された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T: Excessive activity of APOBEC2 contributes to liver and lung tumorigenesis. *Int J Cancer* 2011 (in press). 査読有
2. Matsumoto Y, Marusawa H, Kinoshita K, Niwa Y, Sakai Y, Chiba T: Upregulation of activation-induced cytidine deaminase causes genetic aberrations

- at the CDKN2b-CDKN2a in gastric cancer. *Gastroenterology* 139: 1984-94: 2010. 査読有
3. Marusawa H, Chiba T: Helicobacter pylori-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Curr Opin Immunol* 22: 442-7: 2010. 査読有
 4. Takai A, Toyoshima T, Uemura M, Kitawaki Y, Marusawa H, Hiai H, Yamada S, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T, Kinoshita K: A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene* 28: 469-478: 2009. 査読有
 5. Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R, Chiba T: Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 125: 2029-2035: 2009. 査読有
 6. Chiba T, Marusawa H: A novel mechanism for inflammation-associated carcinogenesis; an important role of activation-induced cytidine deaminase (AID) in mutation induction. *J Mol Med* 87:1023-1027: 2009. 査読有
 7. Morisawa T, Marusawa H, Ueda Y, Iwai A, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T: Organ-specific profiles of genetic changes in cancers caused by activation-induced cytidine deaminase expression. *Int J Cancer* 123: 2735-2740: 2008. 査読有
 8. Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, Fujii S, Fujimori T, Kinoshita K, Honjo T, Chiba T: Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology* 135: 889-898: 2008. 査読有
 9. Fujiwara M, Marusawa H, Wang HQ, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, Kataoka A, Nukina N, Takahashi R, Chiba T: Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 27: 6002-6011: 2008. 査読有
 10. Marusawa H: Aberrant AID expression and human cancer development. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1399-1402: 2008. 査読有
 11. Komori J, Marusawa H, Machimoto T, Endo Y, Kinoshita K, Kou T, Haga H, Ikai I, Uemoto S, Chiba T: Activation-induced cytidine deaminase links bile duct inflammation to human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 47: 888-896: 2008. 査読有
- [学会発表] (計3件)
1. 丸澤宏之、千葉勉. 炎症発癌におけるゲノム不安定性誘導機序の解析とその標的治療. 第37回日本臨床免疫学会総会. 東京ステーションコンファレンス. 東京. 2009/11/14. シンポジウム.
 2. 丸澤宏之. 消化器癌の発生過程において炎症が遺伝子異常の生成に果たす役割. 第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 JDDW2009. 国立京都国際会館. 京都. 2009/10/15. シンポジウム.
 3. 高井淳、丸澤宏之、千葉勉. 肝幹/前駆細胞への遺伝子異常蓄積からの肝発癌機序. 第51回日本消化器病学会大会・第13回日本肝臓学会大会 JDDW2009. 国立京都国際会館. 京都. 2009/10/15. ワークショップ.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
丸澤 宏之 (MARUSAWA HIROYUKI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 80324630
 - (2) 研究分担者
該当なし
 - (3) 連携研究者
該当なし