

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22899

研究課題名（和文）B型肝炎ウイルスの非活動性キャリアにおける肝発癌機序の解析

研究課題名（英文）Analyses for mechanisms of hepatocarcinogenesis in non-fibrotic liver infected with hepatitis B virus

研究代表者

荒澤 壮一（Arasawa, Soichi）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90887366

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：肝癌は数十年に及ぶ肝炎の帰結として肝硬変に至り、肝細胞が遺伝子変異を蓄積することで発生するが、B型肝炎ウイルス（HBV）による肝癌では肝炎に乏しい若年者もしばしば発癌し、通常と異なる発癌機序の存在が想定される。本研究ではHBV陽性の肝硬変なき肝癌9症例と肝硬変に伴う肝癌10症例を比較し、その遺伝的特徴を検討した。

肝硬変に伴う肝癌では既報通り癌関連遺伝子に多数の遺伝子変異の蓄積が認められたが、肝硬変なき肝癌では遺伝子変異が少なく、TP53遺伝子など癌抑制遺伝子を含む染色体の部分欠失が高頻度に認められた。このことからHBV陽性の肝硬変なき肝癌では染色体欠失が発癌に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

癌は遺伝子またはその担体である染色体の異常を誘因として発生する疾患であり、近年では異常遺伝子を標的とした治療が行われたり、遺伝子異常や染色体異常に応じて治療効果を予測し、治療内容を選択できるようになったりしている。

本研究ではB型肝炎ウイルスキャリアでしばしば問題となる若年・非肝硬変症例からの発癌における遺伝子や染色体の異常を明らかにすることにより、従来の肝癌とは異なる治療標的の発見やより適切な治療戦略の決定に示唆を与え、以て将来的な肝癌診療の向上に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In general, hepatocellular carcinoma (HCC) develops in cirrhotic liver as a result of accumulation of mutations in cancer-associated genes. However, HCC also develops in non-cirrhotic liver in hepatitis B virus (HBV) infected patients, suggesting the existence of unknown mechanisms of carcinogenesis different from mutation accumulation. To clarify the genetic landscape of HBV-related HCC in non-cirrhotic liver, we performed targeted deep sequencing of cancer-associated genes and chromosomal copy number analysis for 9 HCCs derived from non-cirrhotic patients and 10 HCCs from cirrhotic patients. Target deep sequencing revealed low frequency of genetic mutations in cancer-associated genes, whereas copy number analysis revealed higher frequency of copy number loss of chromosomal regions containing tumour suppressor genes in non-cirrhotic patients compared to those in cirrhotic patients. The results indicate that chromosomal loss contributes to HCC development in non-cirrhotic liver.

研究分野：医学

キーワード：肝癌 肝細胞癌 B型肝炎ウイルス 遺伝子異常 染色体異常 染色体コピー数異常 B型慢性肝炎 肝硬変

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

消化器癌においてはヘリコバクター・ピロリ感染症からの胃発癌、慢性肝炎からの肝発癌、炎症性腸疾患からの大腸発癌が知られており、慢性炎症に起因する発癌機序の研究は進んでいる。肝癌においても慢性肝炎から肝硬変に至る過程で TERT、TP53、CTNNB1、ARID1A といった種々の癌関連遺伝子に変異が蓄積し、肝炎の発症から数十年を経て発生することが多国際がんゲノムコンソーシアムやがんゲノムアトラスのプロジェクトにおける全ゲノム解析、全エクソーム解析から判明している（Totoki Y et al. Nat Genet, 2014. Fujimoto A et al. Nat Genet, 2016）。また特徴的な染色体コピー数異常についても報告されている（Guichard C et al. Nat Genet, 2012）。B 型肝炎ウイルス（HBV）インテグレーションに関してキャプチャプローブと次世代シーケンシングとを用いた解析により TERT、MLL4、PXDNL、SNTG1 の 4 遺伝子において高頻度にウイルス核酸の挿入が認められることが報告されている（Yang L et al. J Cancer, 2018.）。

しかし既存の研究では肝線維化の進行に応じた解析は充分なされておらず、対象症例のほとんどは肝硬変を背景として発癌した症例である。一方 HBV 感染を背景とする肝癌は、肝硬変に至っていない非活動性キャリアからも比較的高頻度に発生することが知られており、肝臓における慢性炎症の遷延によるゲノム異常の蓄積とは異なる肝発癌機序の存在が示唆される。HBV の非活動性キャリアにおける肝癌のゲノム異常や遺伝子発現プロファイルの特徴は未だ解明されておらず、炎症に起因しない肝発癌機序は不明である。このような肝硬変を背景としない肝癌におけるゲノム異常の特徴や遺伝子発現異常を呈する遺伝子群を明らかにすれば慢性炎症を介しない発癌機序を明らかにでき、ひいては肝癌の新たな治療標的の発見に繋がることが期待できると考え本研究の立案に至った。

2．研究の目的

本研究は、B 型肝炎ウイルス（HBV）の非活動性キャリアにおける非硬変肝を発生母地とする肝細胞癌の発生機序に関わるゲノムの異常や遺伝子発現異常の特徴を明らかにすることを目的とする。

3．研究の方法

(1) 症例の集積

京都大学医学部附属病院において肝切除術を受けた HBV 陽性の肝細胞癌症例のうち、その他の肝疾患（C 型慢性肝炎、アルコール性肝障害、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性胆管炎、原発性硬化性胆管炎、非アルコール性脂肪肝炎）の合併がなく、本人よりインフォームドコンセントの得られた症例を対象とする。背景肝組織の病理組織診断において肝線維化進展度が新犬山分類における F0 または F1 の症例を集積し、これを F0-1 群とする。また対照群として肝硬変を背景とする肝細胞癌症例とし、背景肝組織の肝線維化進展度が F4 の症例を集積し、これを F4 群とする。

(2) DNA・RNA の抽出

各症例、外科的に摘出された肝癌組織と背景肝組織を凍結保存する。各組織より QIAGEN® DNeasy Blood & Tissue Kit を用いてゲノム DNA を、QIAGEN® RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出する。

(3) 遺伝子変異の検出

(2) で得られた DNA 試料からハイブリダイゼーションプローブを用いて既知の 30 種類の肝癌関連遺伝子（Totoki Y et al. Nat Genet, 2014.）を選択的に抽出し、次世代シーケンサー Illumina® を用いてその塩基配列を決定する（ターゲットディープシーケンシング）。

(4) 染色体コピー数異常の検出

(2) で得られた DNA 試料を一塩基多型（SNP）を用いた SNP アレイにより各染色体の各領域のコピー数を決定する。本研究では Affymetrix™ OncoScan™ の SNP アレイを採用した。

(5) 遺伝子発現量の解析

(2) で得られた RNA 試料を ThermoFisher SuperScript™ VIL0™ cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA

に逆転写する。得られた cDNA について、標的遺伝子 (*TERT*、*TP53*、*CTNNB1*、*ARID1A*) のメッセンジャーRNA にそれぞれ特異的なプライマーを付加し、Roche LightCycler® 480 System II を用いて定量的 PCR (qPCR) を行う。qPCR 試薬には Roche LightCycler® 480 SYBR Green I Master を用いる。標準試料を用いて検量線を作製し、検量線に基づいて各試料の標的遺伝子のメッセンジャーRNA 量を推定する。正確を期するため測定は 3 回行い、その中央値を以て目的試料の定量に用いる。

4. 研究成果

(1) 症例の集積

F0-1 群 9 症例、F4 群 10 症例を集積した。各症例の内訳を下表に示す。

F0-1 群 (9 症例)					
性	手術時年齢	線維化進展度	腫瘍径(mm)	肉眼型	分化度
女	31	F0	16	単純結節型	中分化
女	64	F1	87	単純結節周囲増殖型	低分化
男	47	F1	75	単純結節周囲増殖型	低分化
男	48	F1	25	小結節境界不明瞭型	低分化
男	52	F1	150	単純結節周囲増殖型	中分化
女	46	F0	130	単純結節周囲増殖型	低分化
男	61	F0	11	単純結節型	中分化
男	65	F1	86	単純結節周囲増殖型	中分化
男	65	F1	125	単純結節周囲増殖型	低分化
F4 群 (10 症例)					
男	64	F4	17	小結節境界不明瞭型	中分化
男	45	F4	18	単純結節周囲増殖型	低分化
男	54	F4	70	小結節境界不明瞭型	中分化
男	64	F4	23	小結節境界不明瞭型	低分化
男	45	F4	31	小結節境界不明瞭型	低分化
女	73	F4	28	単純結節周囲増殖型	中分化
男	48	F4	23	単純結節周囲増殖型	低分化
男	63	F4	38	単純結節型	高分化
男	55	F4	90	単純結節周囲増殖型	低分化
男	67	F4	39	単純結節周囲増殖型	低分化

(2) DNA・RNA の抽出

各症例、肝癌、背景肝ともに十分量の組織検体を採取でき、必要な DNA 量、RNA 量を確保できた。

(3) 遺伝子変異の検出

各症例の癌組織由来の DNA 試料を用いた肝癌関連遺伝子のターゲットディープシーケンシングの結果を下表に示す。全症例において点突然変異の認められなかった遺伝子は省略し、少なくとも 1 症例で変異の認められた遺伝子のみを示した。またそれぞれの変異について変異の特徴 (プロモーター変異: Promoter、コード領域のミスセンス変異: Missense、コード領域のナンセンス変異: Nonsense、コード領域のフレームシフト変異: Frameshift) を記載する。

F0-1 群の 1 症例のみシーケンシングに失敗し結果が得られなかった。F0-1 群では F4 群と比較して変異の数が少ない傾向が認められた。また既報において最も高頻度に変異の認められた 4 遺伝子 (*TERT*、*TP53*、*CTNNB1*、*ARID1A*) のうち *CTNNB1* を除く 3 遺伝子について F0-1 群は F4 群よりも変異が少なかったが、統計学的有意差はなかった。背景肝組織の DNA 試料を用いたシーケンシングでは、

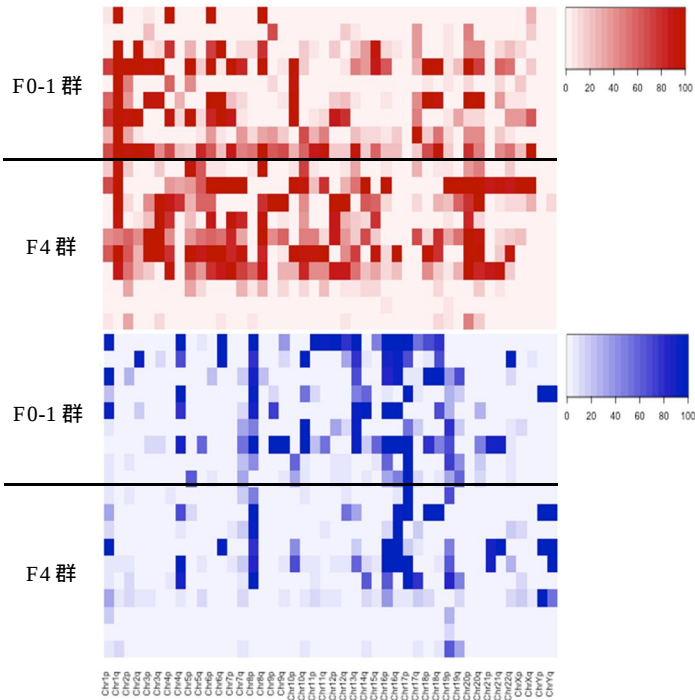
いずれの症例からも既知の肝癌関連遺伝子 30 種類に遺伝子変異は検出されなかった。

	<i>TERT</i>	<i>TP53</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>ARID1A</i>	<i>BRD7</i>	<i>ATM</i>	<i>AXIN1</i>	<i>ACVR2A</i>	<i>ATRX</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>MAP2K3</i>	<i>RB1</i>	<i>TSC1</i>
F0-1群	Promoter		Missense										
		Frameshift							Missense				
			Missense										Nonsense
							Nonsense					Frameshift	
	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
F4群	Promoter	Missense	Missense	Nonsense									
	Promoter			Frameshift									
	Promoter												
		Missense	Missense	Nonsense				Missense					
					Nonsense					Frameshift			
						Missense							
							Missense					Missense	
											Missense		

(4) 染色体コピー数異常の検出

各症例の癌由来 DNA 試料を用いた染色体コピー数解析の結果を下図に示す。コピー数の増幅と欠失とのそれぞれについて各染色体全体に占める増幅領域・欠失領域の割合をヒートマップとして表す。赤は増幅、青は欠失を表す。行は症例を示し、列は染色体の短腕、長腕を交互に示す。全染色体のコピー数異常の比較では、F0-1 群では F4 群と比較して増幅の頻度が少なかった。

遺伝子別の比較では、F0-1 群全例に *TP53* の欠失が認められ、F4 群と比較して有意に高頻度であった。*TERT* と *CTNNB1* では両群ともに増幅が認められ、*ARID1A* では両群ともに欠失が認められ、頻度に有意差は認められなかった。全症例、背景肝組織には染色体コピー数異常は検出されなかった。



	<i>TERT</i>	<i>TP53</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>ARID1A</i>
F0-1群	Loss	Loss		Loss
		Loss		
		Loss		Loss
	High gain	Loss	Gain	Loss
	Gain	Loss		Loss
	Gain	Loss	Gain	
		Loss		
		Loss	Gain	
F4群	Gain			
		Loss		Loss
	Gain			Loss
	Gain	Loss	Gain	
	Gain	Loss	Gain	
			Gain	
	Gain			
		Loss		

(5) 遺伝子発現量の解析

全 19 症例のうち 12 症例（F0-1 群 4 症例、F4 群 8 症例）で *TERT*、*TP53* の遺伝子発現量測定が完了した。*TERT*、*TP53* それぞれについて、肝癌組織の背景肝組織に対する遺伝子発現量の比を表す。全症例の測定に至っていないため現時点での正確な統計学的解析は実行できないが、現時点で得られた結果からは、*TERT* の発現量はコピー数増幅の有無に拘わらず症例間のばらつきが非常に大きく、*TP53* の発現量はコピー数欠失の有無に拘わらず低下している傾向があった。

		<i>TERT</i>	<i>TP53</i>
	F0-1 #2	689.7	0.366
F0-1群	F0-1 #6	541.2	0.669
	F0-1 #7	0.0002616	2.868
	F0-1 #9	3.204	0.3322
	F4 #2	666.3	0.3035
	F4 #4	0.712	0.9727
	F4 #5	52.71	0.2832
F4群	F4 #6	0.00009316	3.182
	F4 #7	4.028	0.8467
	F4 #8	0.6285	0.5212
	F4 #9	94.35	0.3711
	F4 #10	685	0.6071

(6) 研究成果のまとめ

F0-1 群においては F4 群と比較して染色体のコピー数欠失が有意に高頻度に認められ、特に *TP53* 遺伝子領域の欠失は全例において認められた。F4 群においては既報の通り肝癌関連遺伝子に変異の蓄積が認められた。両群の遺伝子発現量の解析は進行中であるが、現時点では両群に明らかな差は認められない。このことから、肝線維化の進行していない HBV の非活動性キャリアにおける肝発癌には染色体コピー数欠失、とりわけ *TP53* 遺伝子など一部のがん抑制遺伝子の欠失が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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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