

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08745

研究課題名（和文）ゲノミクス解析によるC型肝炎治癒後の肝発癌における免疫微小環境変容の解明

研究課題名（英文）Genomics analysis of immune microenvironmental changes in hepatocarcinogenesis after cure of hepatitis C

研究代表者

杉町 圭史（Sugimachi, Keishi）

独立行政法人国立病院機構（九州がんセンター臨床研究センター）・その他 部局等・肝胆膵外科部長

研究者番号：90452763

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：C型肝炎ウイルス(HCV)治療後の肝癌発生の分子機序を解明することを目指して研究を実施した。肝癌臨床検体の全ゲノムメチル化シーケンスとRNAシーケンスによるデータを基に詳細な解析を行なった。C型肝炎罹患によって起こった肝のメチル化異常は抗ウイルス治療によって臨床的にC型肝炎が治癒した後も保持され、正常化していないという重要な知見を得た。さらに、転写因子の解析により、維持されたエピゲノム異常がアポトーシスと炎症シグナル経路の異常を引き起こし、肝発癌に関連していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、C型肝炎が治癒した後もC型肝炎ウイルス(HCV)によって引き起こされたメチル化異常が肝臓で保持されているという重要な知見を得ることができた。さらに、HCV排除後も維持されているメチル化・エピゲノム異常に起因する転写因子と標的遺伝子の発現変化が、SVR肝発癌に関与していることが分かった。本研究成果によりメチル化変動転写因子は、肝癌発生の予測や早期発見のバイオマーカーとして有望であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We conducted research aimed at elucidating the molecular mechanisms underlying the development of hepatocellular carcinoma (HCC) after treatment for hepatitis C virus (HCV) infection. Analyses were performed based on whole-genome methylation sequencing and RNA sequencing. We obtained important insights that epigenome abnormalities in the HCC caused by HCV infection are retained and remained unnormalized even after virological cure of HCV by antiviral therapy. Furthermore, through analysis of transcription factors and their target genes, we revealed that sustained epigenetic abnormalities induce abnormalities in apoptosis and inflammatory signaling pathways, which are associated with the development of HCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝細胞癌 エピゲノム 転写因子 C型肝炎治癒

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝がんの予後と治療法

肝細胞癌(以下肝がん)は日本の死亡者数第5位を占め年間2.5万人以上が亡くなっている(2018年)。肝がんに対して手術や薬物の集学的な治療が発展してきたが、高頻度に肝硬変を合併していることもあり未だに治療後の再発率が高く発症後の5年生存率は36.2%に過ぎない。この現状より肝がんの治療成績の向上のために新たな分子標的治療の開発が急務であるが、肝がんの死亡者を減らすためには肝発癌を予防することがさらに重要であると考えている。

(2) C型肝炎治療による免疫環境の変化と肝がんの発生

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は肝がんの主成因である。2009年にインターフェロン(IFN)治療によって約70%の患者で体内からHCVを排除(ウイルス学的著効:sustained viral response(SVR))できるようになり、2011年以降には直接作用性抗ウイルス薬(direct-acting antiviral agent(DAA))によりほぼ100%の患者でSVRが達成されるようになった。しかし、SVRによって肝発癌リスクが低減する一方でHCV消失後も一定数の発癌(再発)が起こり、肝がん切除後にSVRを得られれば再発率が下がり予後が良いがウイルス消失後も一定数の発癌(再発)が起こりうる事を我々は報告してきた(Hepatol Res 2013, Anticancer Res 2015)。これらの知見の集積よりSVR後に発生する肝がんの発癌リスク評価とその発癌機序の解明は次の喫緊の課題となっている。過去に少数例の報告でIFNとDAAでは治療後で発癌リスクが異なることが示されたが未だ議論がある。IFNは抗ウイルス効果とともに免疫増強による発癌抑制効果があること、一方のDAAは免疫抑制効果が示唆されており、何らかの宿主免疫状態が発癌に関与している可能性がある。「SVR肝がん発生に免疫環境の変化はどのような役割を果たしているのか?」という問いからSVR肝発癌機序の解明していくことは臨床的かつ生物学的に極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1.肝がんの遺伝子変異、コピー数変異、遺伝子発現を特に免疫関連遺伝子に着目した統合的解析により腫瘍内における免疫活動性、抑制状態を評価し、肝がんの免疫環境を制御する遺伝子異常を解明すること、2. IFN治療とDAA治療後に発生したSVR肝がんの免疫環境を比較解析し、SVR肝がん発生における免疫環境変化の役割を解明すること、3.肝がんの免疫環境の変化と免疫療法の効果を解析し、新たな免疫療法の開発やその効果を予測するバイオマーカーの開発に貢献すること、である。

3. 研究の方法

(1) サンプルング

本研究は、九州がんセンター倫理審査委員会の承認を得た。九州がんセンターで原発性肝細胞癌に対して肝切除術を受けた14人の患者から腫瘍および対応する隣接する非腫瘍性肝サンプルを採取した。採取された臨床検体には、HCV感染患者8人とSVR患者6人が含まれていた。さらに、転移性肝癌または肝内胆管癌に対して肝切除術を受けた患者10人から正常(非腫瘍性)肝組織サンプルを得た。これらのサンプルは、肝炎、脂肪性肝疾患、その他の慢性肝疾患を持たない患者から選択された。検証解析では、九州がんセンターで肝切除を受けた肝細胞癌患者13人から検体を得た。検証コホートの病因は、HCV患者5人、SVR患者8人であった。本研究のアクセシには新鮮凍結臨床検体のみを使用した。切除標本で壊死や線維化が少なく、生存腫瘍細胞の多い部分を病理組織学的に確認し核酸抽出に選択した。

(2) メチル化シーケンス

標的メチローム配列決定ターゲットメチロームシーケンシングのためのライブラリー調製は、post-bisulfite adaptor tagging (PBAT) に基づいて行った。最小サイクルのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(4サイクル)で増幅した後、これらのライブラリーをHiSeq 2500で101サイクルのシングルエンドシーケンスをラピッドランモードで行った。

(3) RNA シーケンス

RNA シーケンス (RNA-seq) 解析のためのライブラリー調製には100ngの全RNAを用い、12サイクルのPCR増幅を行った。シーケンスにはIllumina HiSeq 2500を用い、高出力モードで101サイクルのシングルエンドシーケンスを行った。

(4) 異なるメチル化領域(DMR)の解析。

個々のCpG部位についてメチル化レベルを計算した。プローブ領域のメチル化レベルは、個々の領域におけるCG部位のメチル化レベルを平均することで決定した。メチル化差領域(DMR)は、P値が0.01未満で、メチル化の差が20%より大きいCpG部位を10個以上含むものをフィルターにかけた。DMRの5kbs以内に位置する遺伝子は、対応するDMRと関連していると定義した。

(5) 細胞培養と脱メチル化処理

細胞は、ヒトHCC細胞株Huh7とPLC/PRF/5を使用した。培地を、脱メチル化剤である5-aza-20-deoxycytidine (5-Aza)を最終濃度10 μ Mで添加した。培養期間終了後、細胞を回収して全RNA抽出を行った。

(6) Gene Ontology の pathway 解析

パスウェイ解析は、統計ソフト R バージョンと R パッケージ cluster Profiler バージョンを用いて行った。Gene Ontology (GO) 解析は、HCV 群と SVR 群で発現が変動する遺伝子を用いて行い、有意に濃縮される pathway を解析した。GO 名称のうち、がん関連 pathway に関連するものだけを選択した。

4. 研究成果

(1) 肝細胞癌におけるメチル化依存性発現差遺伝子の同定

DMR の 5kb 以内に位置する遺伝子を関連遺伝子と解釈し、エピゲノム変化とトランスクリプトーム解析を統合して、その制御がエピゲノム変化によって直接的または間接的に影響を受けている可能性のある遺伝子を同定した。プロモーター領域での DNA メチル化が遺伝子制御に関与することはよく知られているが、遺伝子転写終結部位の下流を含む遺伝子内および遺伝子間領域での DNA メチル化も遺伝子機能に重要な役割を果たす。メチロームと RNA シークエンシングによって同定された DMR と発現差遺伝子 (DEG) を、SVR と HCV のサンプルと正常肝組織の結果を比較した。メチル化レベル (DMR) と遺伝子発現レベル (DEG) の両方で変化を示した遺伝子が同定され、腫瘍組織では合計 212 の高メチル化 DEG と 88 の低メチル化 DEG が同定され、非腫瘍組織では 61 の高メチル化 DEG と 18 の低メチル化 DEG が同定された。

(2) メチル化変化と転写因子(TF)によって制御される発がん関連標的遺伝子の同定

メチル化は TF の発現を制御する重要なメカニズムであり、肝がんと幹細胞の両方の発生に関与していることが知られている。DNA メチル化は一般に転写抑制と関連しているが、ほとんどの転写因子の結合親和性に対するメチル化の影響はまだわかっていない。これまでの研究で、個々の TF の TF 結合親和性はメチル化によって増加または減少することが報告されている。本研究では、グローバルなメチル化状態を探索するため、標的遺伝子に対する TF 機能の活性化と抑制の両方を含んで解析した。腫瘍組織では 40 個の高メチル化 TF と 6 個の低メチル化 TF が同定され、非腫瘍組織では 11 個の高メチル化 TF と 4 個の低メチル化 TF が同定された。メチル化レベルは、正常肝組織と比較して、SVR および HCV の腫瘍組織で有意に高かった。これらの特定の TF に対する変化がどのような機能を持っているのか解明するため、661 の下流標的遺伝子を TRRUST データベースを利用して同定した。メチル化と遺伝子発現の状態を総合的に解析することにより、これらの標的遺伝子から、特定の TF の発現に対応して遺伝子発現が有意に増加または減少した 111 遺伝子を絞り込んだ。これらの遺伝子を発現差のある標的遺伝子 (DETG) として同定することができた。

(3) 肝癌培養細胞のメチル化解析

各 TF の標的遺伝子は複数存在し、エピジェネティックな転写制御には活性化と抑制の両方が含まれる。DETG がメチル化によって実際に機能的に影響を受けていることを確認するために、培養肝癌細胞株を用いた。Huh7 と PLF-PRF5 の 2 つの HCC 細胞株を用いて、汎脱メチル化アッセイを行った。HCC 細胞を 5-Aza で処理することにより完全な DNA 脱メチル化を起こした上で、遺伝子発現の変化を RNA-seq 解析によって同定した。細胞株での発現変化が、前の解析での臨床サンプルにおける DMR が低メチル化していたものの中から一致する遺伝子を選択し、臨床サンプルと細胞株の両方で、11 遺伝子の発現に有意な変化が起きていることが同定された。これらの 11 遺伝子のうち、10 遺伝子に対応する TF とともにメチル化によって実際に発現変化を示していた。これらの結果は、HCV 感染後にメチル化変化によって、TF によって制御される遺伝子機能が変化するというメカニズムを示唆している。さらに、HCV 治癒後も持続するエピジェネティックな修飾が維持され、肝発癌に関与しているという説を支持するものであった。

(4) 検証コホートによる HCV と SVR-HCC の遺伝子発現解析

これまでの系統的解析により、有意な遺伝子発現変化を示すいくつかの遺伝子が同定されたため、次に HCV-HCC 患者 5 例と SVR-HCC 患者 8 例の臨床検体を含む独立したコホートで RNA-seq 解析を行い、これらの変化の妥当性を検証した。1 回目の解析で同定された 5 つの TF と 11 の DETG (1 つの TF ; KLF4 を含む) の遺伝子発現レベルを 2 回目の検証コホートで解析した。RELA 転写因子を除き、4 つの TF (RXRA, KLF4, RUNX1, RORA) と 10 個の標的遺伝子 (HSD17B2, CXCL12, TF, TNFRSF10B, TRIB3, CDH5, IFITM3, SOD1, ATF3, TUBA1B) の腫瘍組織と非腫瘍組織の両方における遺伝子発現変化が検証コホートでも同様に有意に発現変化が起きていることが確認された。DNA メチル化の異常は、DNA メチル化酵素 (DNMT) および TET 経路の調節異常によって引き起こされる。検証コホートの HCV-HCC、SVR-HCC および正常肝組織における DNMT および TET の発現を調べた。SVR および HCV 組織における DNMT1, DNMT3A, TET2 および TET3 の発現レベルは、正常肝組織と比較して有意に高かった。興味深いことに、非癌部 SVR および HCV 組織の発現レベルも正常肝組織と比較して高かった。これらの結果は、メチル化/脱メチル化活性が HCC で上昇し、SVR 後も活性化された状態で持続していることを示していた。

(5) SVR 関連転写因子と標的遺伝子の GO 解析

これら 14 の抽出遺伝子がどのように肝発癌リスクを高めるかを GO pathway セットを用いて解析した。111 の遺伝子セットのうち、アポトーシスシグナル伝達経路の制御と炎症反応の制御という 2 つの GO が、有意な相関を示し ($P = 0.002$)、SVR における肝細胞の発がんに関連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2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitagawa A, Osawa T, Noda M, Kobayashi Y, Aki S, Nakano Y, Saito T, Shimizu D, Komatsu H, Sugaya M, Takahashi J, Kosai K, Takao S, Motomura Y, Sato K, Hu Q, Fujii A, Wakiyama H, Tobo T, Uchida H, Sugimachi K et al.	4. 巻 128
2. 論文標題 Convergent genomic diversity and novel BCAA metabolism in intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2206 ~ 2217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-023-02256-4	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 Sugimachi Keishi, Araki Hiromitsu, Saito Hideyuki, Masuda Takaaki, Miura Fumihito, Inoue Kentaro, Shimagaki Tomonari, Mano Yohei, Iguchi Tomohiro, Morita Masaru, Toh Yasushi, Yoshizumi Tomoharu, Ito Takashi, Mimori Koshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Persistent epigenetic alterations in transcription factors after a sustained virological response in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 854 ~ 863
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉町圭史、島垣智成、富野高広、大西恵美、増田隆明、森田勝、三森功士、藤也寸志
2. 発表標題 C型肝炎治療後肝癌の転写因子 - 標的遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第34回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keishi Sugimachi, Tomonari Shimagaki, Yohei Mano, Emi Onishi, Masaru Morita, Yasushi Toh, Koshi Mimori
2. 発表標題 Sustained epigenetic carcinogenic alteration in hepatocellular carcinoma arising on the liver after viral eradication
3. 学会等名 Society of Surgical Oncology 2023 International Conference on Surgical Cancer Care (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉町圭史、間野洋平、島垣智成、大西恵美、増田隆明、藤本禎明、上原英雄、中島雄一郎、杉山雅彦、山本学、森田勝、三森功士、藤也寸志
2. 発表標題 全ゲノムのメチローム・トランスクリプトーム解析によるSVR後肝発癌関連転写因子の同定
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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
研究分担者	間野 洋平 (Mano Yohei) (10792244)	独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・肝胆膵外科医師 (87102)	
研究分担者	増田 隆明 (Masuda Takaaki) (50463493)	九州大学・大学病院・准教授 (17102)	
研究分担者	荒木 啓充 (Araki Hiromitsu) (60572823)	九州大学・経済学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	吉住 朋晴 (Yoshizumi Tomoharu) (80363373)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

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