

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390196

研究課題名(和文)肝幹細胞への遺伝子異常が肝発癌に果たす役割の解明

研究課題名(英文)Role of mutated hepatic progenitor cells on hepatocarcinogenesis

研究代表者

丸澤 宏之(MARUSAWA, HIROYUKI)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80324630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円、(間接経費) 4,080,000円

研究成果の概要(和文)：上皮系悪性腫瘍の発生起源となる細胞を同定することが、発癌機序の解明や新たな癌の治療戦略の開発につながるものと期待されている。しかしながら、癌の発生が組織の幹細胞や前駆細胞を起源としているのか、どのような遺伝子異常を獲得することにより腫瘍化にいたるのか、については不明のままである。本研究により、感染や炎症の結果、肝臓の組織幹細胞・前駆細胞に多段階にゲノム異常が生成・蓄積することが肝癌の発生につながっていることがモデルマウスの解析から明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Although the origin of cancer cells remains mostly unsolved at present, it appears reasonable to assume that long-lived tissue stem/progenitor cells can accumulate genetic alterations and hence could be the origin of tumor cells. Whether the stepwise accumulation of genetic alterations on originally normal hepatic stem/progenitor cells contributes to the development of tumor cells, however, remains unknown. We demonstrated that engrafted hepatic progenitor cells played a role in the origin of liver tumors, including both hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma, through the accumulation of somatic mutations in a variety of target genes.

研究分野：医歯薬学

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：肝癌 遺伝子変異 前駆細胞 幹細胞 AID

1. 研究開始当初の背景

ヒトの癌の発生には、細胞増殖やアポトーシス制御などに関連した種々の発癌関連遺伝子に変異や欠失などのゲノム異常が生成・蓄積することがきわめて重要な役割を果たしていることが知られている。しかしながら、これまで肝癌を含むさまざまなヒト癌組織において多様な遺伝子異常の報告がなされているものの、その生成機序に関しては大部分が不明のままであった。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、その 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。この APOBEC family 分子の中で Activation-induced cytidine deaminase (AID) は唯一、ヒト自身の遺伝子(DNA)配列に直接変異を導入する活性を有することが示されている。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。その結果、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。

一方、近年、癌組織の中に、正常な組織幹細胞と同様に自己複製能と多分化能をもつごく少数の細胞群が存在することが明らか

となり、これらの細胞が癌を形成する細胞群を供給していると想定されるようになってきた。この、癌幹細胞(cancer stem cell)あるいは腫瘍始原細胞(tumour-initiating cell)と呼ばれる細胞群が、癌の発生源としての役割を果たすのみならず、癌の再発や転移、あるいは抗癌剤や放射線療法への耐性の根幹となっているものと想定されている。この癌幹細胞は、急性骨髄性白血病ではじめて同定されたが、その後の研究により、白血病のみならず肝臓癌、乳癌、大腸癌、膵臓癌、脳腫瘍といった固形癌にも適応されるようになり、現在の癌研究の中心的な研究分野に成長しつつある。これらの上皮系悪性腫瘍の発生源となる細胞を同定することが、発癌機序の解明や新たな癌の治療戦略の開発につながるものと期待されている。しかしながら、白血病と同様に、固形癌においても正常な組織幹細胞や前駆細胞に遺伝子異常が蓄積することが癌細胞の起源となっている可能性が推定されているものの、造血系細胞とは異なり組織内に存在する各分化段階の細胞群を精製・単離することがきわめて困難であること、ヒトの発癌過程を模倣するような遺伝子異常が多段階に生じて腫瘍が発生するマウスモデルがないこと、などが癌細胞の発生源を解明するための障壁となってきた。このため、これらの固形癌の起源となっている細胞が、各組織の幹細胞に起源しているのか、正常な幹細胞と同様の特性をもつのか、どのようにして悪性形質を獲得し腫瘍化に至るのか、など大部分は不明のままである。

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、発癌に関連した遺伝子に変異が生成・蓄積し、肝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

から、肝癌の発生が肝組織の幹細胞や前駆細胞を起源としているのか、どのような遺伝子異常を獲得することにより腫瘍化にいたるのか、については不明のままである。そこで、肝幹細胞/前駆細胞に持続的に AID 発現を誘導し、発癌の有無と背景に存在する遺伝子異常の全体像を網羅的に解析することにより、肝癌が肝幹細胞や前駆細胞に起源しているかどうかを明らかにするとともに、多段階の遺伝子変異の生成機構という観点から、ヒト肝癌発生の分子機構を解明することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

AID を全身に発現したトランスジェニック・マウス(AID-Tg マウス)は、発癌関連遺伝子への変異が多段階的に生成・蓄積することにより、悪性リンパ腫、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。また、幹細胞マーカー分子のひとつである TNAP を発現する細胞に AID を特異的に発現する遺伝子改変マウス(TNAP-AID マウス)の表現型の解析から、未熟な細胞に持続的に AID を発現することが肝癌や肺癌の発生に繋がることを確認している。そこで、肝発癌過程において、肝幹細胞/前駆細胞への持続的な AID 発現により多段階的にもたらされる遺伝子異常の全体像を解明する目的で、AID-Tg マウスの胎仔肝組織から抽出した肝幹/前駆細胞分画を AID が野生型であるマウスに移植し、レシピエントマウスの表現型の解析を行った。また、レシピエントマウスに発生した腫瘍のゲノム・エピゲノム変化の網羅的解析を行った。具体的には、胎仔肝組織からの肝前駆細胞の選別採取は、胎生 13.5 日の妊娠マウスの胎仔肝組織より細胞を分離し、コラゲナーゼ処理を行った後に調整培地の中で sphere 形成を行った。Sphere 形成した細胞群をさらにコラーゲンコートした dish にて培養することで血球系

細胞を除外し、細胞選別作業の後、経脾的にレシピエントマウスに細胞移植を行った。移植細胞の肝組織への生着を促進する目的で、本研究では細菌毒素受容体を ALB プロモーター下に肝組織に特異的に発現するトランスジェニック・マウスをレシピエントマウスとして活用することとした。このマウスは、細菌毒素投与により肝細胞特異的な傷害が生じる結果、持続的な肝再生が引き起こされるため、移植細胞がきわめて効率よく生着することが期待される。

一方、ヒト肝癌の 60-70%は、C 型肝炎ウイルス(HCV)感染による肝硬変や慢性肝炎を背景に発生することが知られている。そこで、肝発癌前に潜在的に肝組織に蓄積したゲノム異常を特定する目的で、次世代シーケンサーを用いた HCV 陽性肝硬変組織の遺伝子解析を行った。次世代シーケンサーによるゲノムのシーケンス解析には、全ゲノムの解析の他に、全エクソン解析という手法がある。全エクソン解析は全ゲノム解析と異なり、全ゲノム中の約 1%に相当するタンパク質をコードする遺伝子領域のみを解析する手法である。すなわち、解析対象領域を、タンパク質をコードするエクソンのみに絞っているため、比較的簡便かつ低コストでの解析が可能となっている。本研究では、この全エクソン解析により HCV 感染による肝硬変症例において、癌部とともに、その背景となる非癌部においての遺伝子解析を行い、腫瘍発生前から肝組織に潜在するゲノム異常の全体像を検討した。

4. 研究成果

胎生 13.5 日の妊娠マウスの胎仔肝組織から肝幹/前駆細胞のみを分離・精製し、経脾的にレシピエントマウスに移植することで、効率良くレシピエントマウスの肝臓に生着させるという肝幹/前駆細胞移植システムを応用し、肝組織幹/前駆細胞にゲノム異常を

持続的に誘導し、その表現型の解析を行った。まず最初に肝前駆細胞移植モデルを用いて、GFP トランスジェニック・マウスの胎仔肝組織から採取した肝前駆細胞の移植を行った。レシピエントマウスへの GFP 発現した移植細胞の生着率を経時的に検討することにより、肝前駆細胞のレシピエント肝への生着がもっとも高率に達成できる肝障害の誘導レベルの至適条件を設定することができた。

次に、AID トランスジェニックマウス胎生 13.5 日の胎仔肝から肝幹/前駆細胞を分離・精製し、得られた細胞をレシピエントマウスに経脾的に移植し、肝臓に生着させた。移植後、24, 48, 72 週齢に解剖し、肝組織の病理組織学的な検討、移植細胞の生着率の評価、ならびに全身の表現型解析を行ったところ、AID を持続発現した肝前駆細胞を移植したレシピエントマウスには平均 90 週の経過で 11 匹中 7 匹に肝腫瘍が発生した。その一方で、コントロールマウス(野生型マウス)の胎仔肝から採取した肝幹/前駆細胞を移植したレシピエントマウスの肝臓では、まったく腫瘍形成を認めなかった。興味深いことに、AID トランスジェニックマウスの肝幹/前駆細胞の移植を受けたレシピエントマウスに発生した肝癌を構成している腫瘍細胞は移植した肝前駆細胞に由来していることがわかった。そこで、発生した肝癌細胞と、その起源となった肝前駆細胞に対して次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行い、それらを比較検討することで、発癌過程で生じた変異を抽出した。今回 2 例の肝癌について解析を行った結果、肝癌#1 では 23 個、肝癌#2 では 162 個の遺伝子変異を認めた。また、ICGC(international cancer genome consortium)でのヒト肝癌ゲノムデータベースと照合すると、今回のマウスモデルに発生した肝癌に認めた遺伝子変異の約 8 割がヒト肝癌でも報告されていることが確認された。これらの変異を獲得した遺伝子が生体内で

どのような働きをしているかを知るために、バイオインフォマティクスデータベースである KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)を用いて解析を行ったところ、MAPK pathway や metabolic pathway など生体に重要な役割を果たす多数のシグナル伝達経路に関わっていることが明らかとなった。以上の結果は、感染や炎症の結果、組織幹/前駆細胞に多段階にゲノム異常が生成・蓄積することが腫瘍細胞の発生につながっていることを示唆している。

ヒト臨床検体の解析対象は、HCV 陽性肝硬変を背景に、多発 HCC を有する肝硬変 3 症例と単発 HCC の 1 症例、計 4 症例である。多発 HCC 症例では 2 つの HCC と非癌部肝硬変を、単発 HCC 症例においては癌部と非癌部の肝硬変組織の全エクソーム解析を行った。7 つの腫瘍組織の検討からは、計 768 遺伝子で 970 個の体細胞変異が生じていることがわかった。これらの遺伝子がどのような細胞機能に関連しているかを調べてみると、様々な代謝経路に関連した遺伝子が最も多く含まれていることがわかった。さらに、多発 HCC を有する 3 症例では、同時多発した 2 個の腫瘍間における変異パターンの傾向に違いがあることもわかった。症例 1 では 32 遺伝子、症例 2 では 9 遺伝子と、2 個の腫瘍で検出された遺伝子変異の約 30%程度が重複していたのに対し、症例 3 においては腫瘍間における遺伝子変異の共通点は全く認めなかった。つまり、前者では、同時多発した HCC は肝内転移により発生、後者は多中心性に個々に発癌してきたものと推定され、多発する HCC の発生経路の差異による遺伝的背景の違いを明瞭に反映しているものと考えられた。また、非癌部肝硬変の解析からは、病理組織学的には腫瘍の発生を認めない肝硬変組織においても、多数の遺伝子変異が潜在していることが明らかとなった。驚くべきことに、症例によっては、癌部よりも多くの変異を有する例も存在

していた。さらに、これらの変異の中には癌部と共通して存在する変異も認められ、これらの変異遺伝子の中には発癌に関わるものが含まれている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma.

Gastroenterology. 146: 222-232: 2014.
doi: 10.1053/j.gastro.2013.09.025.

査読有

Kim SK, Nasu A, Komori J, Shimizu T, Matsumoto Y, Minaki Y, Kohno K, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: A model of liver carcinogenesis originating from hepatic progenitor cells with accumulation of genetic alterations.

Int J Cancer. 134: 1067-76:2014.
doi: 10.1002/ijc.28445. 査読有

Kim SK, Marusawa H, Eso Y, Chiba T, Kudo M: Novel mouse models of hepatocarcinogenesis with stepwise accumulation of genetic alterations. Digestive Diseases. 31: 454-458: 2013.
doi: 10.1159/000355244. 査読有

Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T: Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme

catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. Int J Cancer 130: 1294-1301:2012.

doi:10.1002/ijc.26114. 査読有

[学会発表](計 9 件)

金秀基、丸澤宏之、千葉勉. ワークショップ 16: 消化器癌に対する幹細胞研究の現状と展望 (肝 W16-9) 肝幹/前駆細胞を起源とする肝発癌モデルを用いたゲノム異常の網羅的解析. 第 17 回日本肝臓学会大会. JDDW2013. 品川プリンスホテル. 東京. 2013/10/11

丸澤宏之. シンポジウム 1: 感染がん・炎症がんの分子基盤 (S1-1) 慢性炎症によるゲノム異常生成と肝発癌. 第 72 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2013/10/4

千葉勉、丸澤宏之. シンポジウム 3: ゲノム不安定性とがん (S3-3) 炎症と遺伝子不安定性. 第 72 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2013/10/03

池田敦之、丸澤宏之、千葉勉. シンポジウム 11: 肝疾患に対する先端医療 (肝 S11-3) 次世代シーケンサーの肝疾患診療への応用 ~ 肝発癌のゲノム診断 ~. 第 54 回日本消化器病学会. 第 16 回日本肝臓学会大会. JDDW2012. ポートピアホテル. 兵庫. 2012/10/11

金秀基、丸澤宏之、那須章洋、千葉勉. E-1032: Liver cancer is originated from the hepatic progenitor cells through the accumulation of genetic alterations. (肝幹細胞/前駆細胞への遺伝子異常の蓄積が肝癌の発生に果たす役割) 第 71 回日本癌学会学術総会. 札幌市教育文化会館. 北海道. 2012/09/19

池田敦之、丸澤宏之、千葉勉. 肝癌の発生・進展を規定するゲノム異常の次世代シーケンサー解析. 第 53 回消化器病学会(第 15 回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション 21) 福岡国際会議場. 福岡. 2011/10/23.

奥山俊介、丸澤宏之、千葉勉. 炎症刺激により発現誘導される遺伝子編集酵素ファミリーによる多段階肝発癌モデル

マウスの解析．第 53 回消化器病学会(第 15 回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション 4)．福岡国際会議場．福岡．2011/10/20.

丸澤宏之．慢性炎症により誘導されるゲノム異常からの肝癌発生機構．第 70 回日本癌学会学術総会．名古屋国際会議場．愛知．2011/10/4.

池田敦之、丸澤宏之、千葉勉．肝癌の発生母地としての肝硬変に潜在する遺伝子異常の次世代ゲノム解析．第 70 回日本癌学会学術総会．名古屋国際会議場．愛知．2011/10/4.

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

該当なし

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