

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2014

課題番号：24229005

研究課題名(和文)炎症からの消化器発癌におけるゲノム・エピゲノム異常の統合的解析と生成機構の解明

研究課題名(英文)Global analysis of genetic and epigenetic alterations during inflammation-associated gastrointestinal cancer development, and elucidation of its mechanism

研究代表者

千葉 勉 (Chiba, Tsutomu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30188487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 132,100,000円

研究成果の概要(和文)：消化器癌の発症には感染などによる炎症の持続が重要な役割をはたしている。一方申請者らは、炎症による発癌時に遺伝子編集酵素AIDが異所性に発現して、遺伝子変異を導入して炎症発癌に寄与することを報告してきた。本研究では、次世代シーケンサー技術を駆使して、炎症を背景とした消化器癌の発症過程において多段階的に生じる、ゲノム/エピゲノム異常を経時的かつ統合的に解析すると同時に、種々の遺伝子改変マウスを用いて、炎症におけるゲノム/エピゲノム異常の生成にAIDが深く関与することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Infection and/or inflammation play important roles in the development of various cancers in digestive organs. We have previously demonstrated that activation-induced cytidine deaminase (AID), a DNA editing enzyme, is involved in inflammation-associated carcinogenesis through induction of various mutations. In the present study, by using ultra-deep sequencer we serially analyzed genetic and epigenetic changes during cancer development with the background of inflammation in both human and mice. As a result, we demonstrated that AID has crucial roles in the induction of not only genetic but also epigenetic changes during inflammation-induced carcinogenesis.

研究分野：消化器病学、消化器癌発症の機序、新しい癌治療の開発

キーワード：AID 炎症発癌 癌幹細胞 組織幹細胞 エピゲノム 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

消化器癌の発症には*H. pylori*や肝炎ウイルス感染などによる炎症の持続が重要な役割をはたしている。一方、発癌過程では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知られている。申請者らは、遺伝子編集酵素の一つAIDが炎症からの発癌過程における遺伝子変異の蓄積に重要な役割をはたしている事実を明らかにしてきた。すなわち(1) AID transgenic (TG) マウスでは様々な癌が多数発生した。(2) ヒト臨床検体の検討からは、胃炎～胃癌、肝炎～肝癌、潰瘍性大腸炎～大腸癌、胆管炎～胆管癌でAIDが異所性に強く発現していること、(3) ヒト胃上皮、肝細胞を用いた実験で、HP感染、HCVウイルス導入、TNF やIL1などのサイトカイン刺激がAID発現を強く誘導し、同時にAID依存性に様々な変異が導入されることを示してきた。以上の成績は、炎症を背景とした発癌過程において、異所性に発現したAIDが遺伝子変異を導入して発癌に関与している可能性を強く示唆している。

2. 研究の目的

炎症発癌におけるゲノム、エピゲノム異常生成の分子機序をAIDに焦点を当てて明らかにすることを目的とする。

- 1) **AIDによる炎症発癌過程で生じるゲノム異常蓄積の全貌を明らかにする：**
本研究では、AIDによって生じるゲノム異常の全体像を、Exon captureと次世代シーケンサーを組み合わせた大規模遺伝子解析によって明らかにする。同時にCGH解析を行って、ゲノムの欠失などコピー数の変化と遺伝子変異の関係を明らかにする。本検討では、マウスによる*in vivo*実験、細胞株を用いた*in vitro*実験で、遺伝子異常の蓄積を経時的に観察する。
- 2) **AIDにより炎症発癌過程で生じるエピゲノム(メチル化)変化を網羅的に解析する：**
AIDはCpGのメチル化シトシン(C)も標的とするが、近年AIDが脱メチル化分子として重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつある。しかし発癌過程でのエピゲノム異常生成におけるAIDの役割は不明である。そこで炎症発癌過程でAIDがどのようなメチル化変化を誘導するのかについて、メチル化塩基の免疫沈降法と次世代シーケンサーを組み合わせた網羅的解析により検討する。
- 3) **慢性炎症からの多段階発癌過程におけるヒト消化器系臓器のゲノム・エピゲノム変化の全体像を解明する：**

ヒトの非癌部炎症組織に多段階的に生じているゲノム・エピゲノム異常の全体像を解明するため、Exon captureと次世代シーケンサーを組み合わせた網羅的ゲノム解析とメチル化解析を統合的におこない、ヒトでの炎症発癌における遺伝子異常の生成にAIDがどの程度関与しているのかを明らかにする。

4) **炎症発癌における癌細胞の発元起源としての組織幹/前駆細胞の役割を検証する：**

近年、組織幹細胞が癌細胞の起源となっている可能性が指摘されている。そこで、組織幹/前駆細胞マーカーをラベルしたレポーターマウスに炎症モデルマウスを交配し、lineage tracing法により炎症発癌における癌細胞の由来を同定する。また同時にAIDを幹細胞や分化した細胞に導入したマウスを作成し、上記マウスと交配し、癌細胞の起源を検討するとともに、癌細胞発生初期におけるAIDの役割を明らかにする。

5) **組織幹/前駆細胞への、炎症刺激によりもたらされる遺伝子変化を解析する：**

炎症刺激によりAIDを介して組織幹/前駆細胞に生じるゲノム・エピゲノム変化を特定することにより、正常な幹細胞から癌幹細胞への形質転換の鍵を握る遺伝子変化を同定する。

6) **AIDによる遺伝子異常生成の分子機構を詳細に解明する：**

DNA修復系に関与する分子をノックダウンしたり、ノックアウトマウスを用いることによって、AIDによる遺伝子変異導入とゲノム不安定性の生成機構、及びそれらの相互関係を検討する。

3. 研究の方法

1) **AIDにより炎症発癌過程で生じるゲノム異常の全貌を明らかにする：**

申請者らはすでに、慢性肝炎・肝硬変を背景とした肝癌の発生過程においてAIDが異所性に発現し、遺伝子異常(変異、欠失など)を誘導することによって炎症発癌に関与していることを報告してきた。今回の研究ではまず、AIDを恒常的に発現するAIDトランスジェニック(TG)マウスの胎児肝より肝幹/前駆細胞を分離・採取しレシピエントマウスに移植して肝発癌を検討した。続いて、肝癌細胞と、その起源となった肝幹/肝前駆細胞の全エクソン塩基配列を次世代シーケンサーで網羅的解析し、両者の配列の比較を行った。また、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)を用いた機能解析もおこなった。さらに、ヒト胃癌、胃炎粘膜、

またヒトTP53遺伝子を導入したAID-TGマウス胃粘膜において、網羅的遺伝子解析、並びにTP53遺伝子のdeep sequencingをおこなった。

2) **AIDにより発癌過程に生じるエピゲノム変化の包括的解析：**

発癌には、遺伝子変異など遺伝子不安定性の導入とメチル化などエピジェネティックな修飾の両方が重要である。一方AIDはメチル化、非メチル化シトシン両方に変異を導入できるが、どちらをより標的とするかは明らかではない。このメチル化状態とAIDによる変異導入の関係を明らかにするために、AID-TGマウスの胃・大腸・肝・膵、各臓器から全DNAを抽出し、断片化後にメチル化結合蛋白であるMBD2を用いてメチル化されているDNA断片を結合させ、DNAメチル化を受けている遺伝子領域を特異的に抽出した。

3) **慢性炎症からの多段階発癌過程におけるヒト消化器系臓器のゲノム・エピゲノム変化の全体像の解明：**

肝細胞癌(HCC)発症リスクが極めて高いC型肝炎ウイルス(HCV感染による肝硬変組織)に潜在する遺伝子異常を明らかにすることを目的とし、HCC腫瘍組織、並びに、非腫瘍組織である肝硬変組織の体細胞変異の全エクソン解析を行った。HCV感染による肝硬変を背景に、同時多発したHCCを有する3症例と単発HCCの1症例、計4症例を対象とし、各症例の末梢血リンパ球をコントロールとして、全遺伝子のタンパク質をコードする全エクソン領域の塩基配列を決定した。さらに、22例のHCV感染を伴った肝硬変症例の体細胞変異解析を行った。

4) **炎症発癌における癌細胞の発起始源としての組織幹・前駆細胞の役割の解明：**

消化器系組織幹・前駆細胞マーカーとしては、申請者がすでに報告しているTNAP、Sox9とともに、Villin、Lgr5それぞれのプロモーター依存性にCreリコンビナーゼを発現するマウスを準備した。これらのマウスとRosa26マウスを交配したレポーターマウスを作成し、慢性炎症からの発癌モデルマウスと交配を行うことにより、炎症を背景として発生した癌組織が消化器系幹・前駆細胞由来かどうかの検証をlineage tracingの手法を用いて開始した。慢性炎症からの発癌モデルとしては、肝発癌モデルとしてC型肝炎ウイルス(HCV)タンパクを誘導性に発現するHCV-TG、炎症性大腸発癌モデルとしてIL-10 KOマウスを活用し、交配後の表現型解析を進めている。

5) **組織幹・前駆細胞への炎症刺激によりもたらされる遺伝子変化の解析：**

組織幹/前駆細胞マーカーをラベルしたレポーターマウスとして、Sox9-プロモーター制御下にGFPを発現するSox9-GFPマウスを準備した。また、肝胆道系の幹細胞マーカーとしてEpiCAM-プロモーター下にCREを発現するマウスを新たに作成し、これらのマウスとレポーターマウスを交配することにより、Sox9発現細胞、EpiCAM発現細胞の動態を詳細に検討することが可能なモデルを構築した。

6) **AIDによる遺伝子異常生成の分子機構を解明する：**

炎症にさらされた消化器系上皮組織におけるゲノム異常の生成過程において、AIDが種々の遺伝子変化を誘導する機序、及びその際のDNA修復酵素の関与を明らかにする目的で、Villin-Cre(消化管)、Albumin-Cre(肝臓)マウスとconditional AIDトランスジェニックマウスとを交配した消化器系細胞で特異的にAIDを持続発現するマウスモデルを樹立した。同時に、これらの臓器特異的なCreマウス系と、DNA修復酵素であるMsh2をノックアウトすることが可能なconditional Msh2ノックアウトマウス、UNGノックアウトマウスと交配を行った。

4. **研究成果**

1) **AIDにより炎症発癌過程で生じるゲノム異常の全貌を明らかにする：**

肝癌の発生過程においてAIDの持続発現により惹起されるゲノム異常全体像を明らかにした。

AIDを恒常的に発現するAIDトランスジェニック(TG)マウスの胎児肝の幹/前駆細胞をレシピエントマウスに移植したところ、11匹中7匹(64%)に肝癌の発生を認めた。他方、wild-typeマウスの胎児肝由来の肝前駆細胞を移植したレシピエントマウス群には全く肝腫瘍を認めなかった。続いて、肝癌細胞と、その起源となった肝幹/肝前駆細胞の全エクソン塩基配列を次世代シーケンサーで網羅的解析し、両者の配列の比較を行った。この結果、肝幹/前駆細胞から肝癌に至るまでに、数十~数百ヶ所のゲノム異常が起こっていることが明らかになった。また機能解析にて、肝癌発生過程で生じた変異遺伝子の多くは、MAPKシグナル伝達や、代謝経路など生体内の重要なpathwayに関わることが示唆された。着目すべき重要な点として、これらの変異遺伝子の約80%がヒト肝癌で報告されている変異遺伝子と重複していることが確認された。さらに、ヒト胃癌、胃炎粘膜、またヒトTP53遺伝子を導入したAID-TGマウス胃粘膜の網羅的遺伝子解析、並びにTP53遺伝子のdeep sequencingにて、いずれも、C/G to T/A

遺伝子変異、さらにGC領域に強い、変異の選択性を認めた。このことから、*H. pylori*胃炎からの胃発癌におけるAIDの重要性が、さらに明らかとなった。

2) **AIDにより発癌過程に生じるエピゲノム変化の包括的解析：**

現在AID-TGマウスの組織を用いて次世代シーケンサーにより解析中。

遺伝子のメチル化状態とAIDによる変異導入の関係を明らかにするために、AID-TGマウスの胃・大腸・肝・膵、各臓器から全DNAを抽出し、断片化後にメチル化結合蛋白であるMBD2を用いてメチル化されているDNA断片を結合させ、DNAメチル化を受けている遺伝子領域を特異的に抽出した。引き続き、次世代シーケンサーを用いて包括的に塩基配列変化を解析しコントロールマウスと比較することにより、AIDの持続発現により生じたエピゲノム変化の全体像の検討を進めている。

3) **慢性炎症からの多段階発癌過程におけるヒト消化器系臓器のゲノム・エピゲノム変化の全体像の解明：**

C型肝炎ウイルス(HCV)感染を伴った肝硬変組織には、多様な遺伝子変異が生成・蓄積しており、レプチン受容体遺伝子に引き起こされた体細胞変異が肝発癌に関与している可能性を明らかにした。

HCV感染による肝硬変を背景に、同時多発したHCCを有する3症例と単発HCCの1症例、計4症例を対象とし、各症例の末梢血リンパ球をコントロールとして、全遺伝子のタンパク質をコードする全エクソン領域の塩基配列を決定した。その結果、7つのHCC組織で、計768遺伝子で970個の体細胞変異が検出された。また、癌部における解析からは、多発HCCを有する3症例のうち、2症例では複数の遺伝子変異が腫瘍間において重複していたのに対し、1症例では腫瘍間で重複する遺伝子変異は全く認めず、同時多発した腫瘍の発生機転の症例間での相違が示唆された。また、非癌部肝硬変組織の全エクソン解析から、病理学的には腫瘍細胞を認めない肝硬変組織にも多数の体細胞変異が検出されることがわかった。これら非腫瘍部肝硬変組織で検出された遺伝子変異の中から、癌部においても共通して存在する体細胞変異を抽出したところ、leptin receptor (LEPR)遺伝子が複数の症例で変異を生じていることがわかった。そこでさらに、22例のHCV感染を伴った肝硬変症例の体細胞変異解析を行ったところ、12例(54.5%)でLEPR遺伝子変異が検出された。肝硬変組織で検出された7つのLEPR遺伝子変異のうち、4カ所(57.1%)において、leptin刺激による下流のSTAT3リン酸化シグナルの欠失または低下を認めた。また、Lepr欠

損マウスにチオアセトアミド投与を行い、肝炎症刺激を負荷したところ、対照マウスでは肝腫瘍発生を認めなかったが、Lepr欠損マウスの40%ではHCCを含む肝腫瘍を発生することがわかった。以上の結果から、炎症発癌過程においてLEPR遺伝子の機能異常が遺伝子変異により生じることが、肝癌の発生に深く関与している可能性が示唆された。

4) **炎症発癌における癌細胞の発起源としての組織幹・前駆細胞の役割の解明：現在、消化器系組織幹・前駆細胞のレポーターマウスを用いた炎症発癌モデルを構築中。**

TNAP、Sox9、Villin、Lgr5それぞれのプロモーター依存性にCreリコンビナーゼを発現するマウスとRosa26マウスを交配したレポーターマウスを作成し、慢性炎症からの発癌モデルマウスと交配を行うことにより、炎症を背景として発生した癌組織が消化器系幹・前駆細胞由来かどうかの検証をlineage tracingの手法を用いて開始した。慢性炎症からの発癌モデルとしてC型肝炎ウイルス(HCV)タンパクを誘導性に発現するHCV-TG、また炎症性大腸発癌モデルとしてIL-10 KOマウスを活用し、交配後の表現型解析を進めている。また、新たにB型肝炎ウイルス(HBV)タンパクを肝細胞特異的に薬剤誘導性に発現するB型慢性肝炎モデルマウスの作成を開始した。モデルマウス作成のためのコンストラクト作成、マウス胚へのinjection、F0マウスを7ライン樹立し、それぞれのラインのF1マウスの獲得までの作業を完了した。うち、先行する1ラインからのF1マウスを用いて、薬剤誘導性に血中にHBVタンパク質が発現・分泌されることを確認した。

5) **組織幹・前駆細胞への炎症刺激によりもたらされる遺伝子変化の解析：組織幹/前駆細胞マーカーをラベルしたレポーターマウスの作成と表現型解析を進行中。**

Sox9-GFPマウス、EpiCAM-CREマウスを作成し、これらのマウスとレポーターマウスを交配することにより、Sox9発現細胞、EpiCAM発現細胞の動態を詳細に検討することが可能なモデルを構築した。これらの、幹細胞レポーターマウスに薬剤刺激、*H. felis*の経口的な感染により、慢性炎症時やその後の発癌過程における組織幹・前駆細胞の局在や増減の検討を進めている。

6) **AIDによる遺伝子異常生成の分子機を解明する：**

conditional AID-TGマウスとDNA修復酵素の欠損マウスの交配したモデルマウスの表現型を現在、解析中。

Villin-Cre(消化管)、Albumin-Cre(肝臓)

マウスと conditional AID トランスジェニックマウスとを交配した消化器系細胞で特異的に AID を持続発現するマウスモデルを樹立した。同時に、これらの臓器特異的な Cre マウス系と、DNA 修復酵素である Msh2 をノックアウトすることが可能な conditional Msh2 ノックアウトマウス、UNG ノックアウトマウスと交配を行った。これらのマウスは現在、24-36 週齢に達しており、48 週齢以降に、腫瘍発生の有無を含めた各消化器系臓器の表現型を検討する。同時に、消化管、肝臓それぞれに特異的に AID の持続発現と DNA 修復酵素のノックアウトをあわせもつマウスの樹立も進めており、ヒト癌細胞で高頻度に認められる DNA 修復過程の異常が、AID による能動的な遺伝子変化の導入後のゲノム変化に及ぼす影響についての解析を進める予定としている。

引用文献
なし

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 25 件)

Matsumoto T, Shimizu T, Nishijima N, Ikeda A, Eso Y, Matsumoto Y, Chiba T, Marusawa H.

Hepatic inflammation facilitates transcription-associated mutagenesis via AID activity and enhances liver tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2015 Epub ahead of print 査読有

Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H.

Reactivation from occult HBV carrier status is characterized by low genetic heterogeneity with the wild-type or G1896A variant prevalence. 査読有
J Hepatol. 2014 Sep;61(3):492-501. doi: 10.1016/j.jhep.2014.04.033.

Shimizu T, Marusawa H, Matsumoto Y1, Inuzuka T, Ikeda A, Fujii Y, Minamiguchi S, Miyamoto S, Kou T, Sakai Y, Crabtree JE, Chiba T.

Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 2014 Aug;147(2):407-17. e3. 査読有
doi:10.1053/j.gastro.2014.04.03.

Ikeda A¹, Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Chiba T, Watanabe N.

Progression of autoimmune hepatitis is mediated by

IL-18-producing dendritic cells and hepatic CXCL9 expression in mice.

Hepatology. 2014 Jul;60(1):224-36. doi: 10.1002/hep.27087. 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. 2014 Mar 1;134(5):1067-76.

doi: 10.1002/ijc.28445. 査読有

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*. 2014

Jan;146(1):222-32. e35. doi: 10.1053/j.gastro.2013.09.025. 査読有

Shiokawa M, Kodama Y, Yoshimura K, Kawanami C, Mimura J, Yamashita Y, Asada M, Kikuyama M, Okabe Y, Inokuma T, Ohana M, Kokuryu H, Takeda K, Tsuji Y, Minami R, Sakuma Y, Kuriyama K, Ota Y, Tanabe W, Maruno T, Kurita A, Sawai Y, Uza N, Watanabe T, Haga H, Chiba T.

Risk of cancer in patients with autoimmune pancreatitis.

Am J Gastroenterol. 2013

Apr;108(4):610-7. doi:

10.1038/ajg.2012.465. 査読有

Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T.
Dcl1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine.

Nat Genet. 2013 Jan;45(1):98-103.

doi: 10.1038/ng.2481. 査読有

Chiba T, Marusawa H, Ushijima T.

Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. *Gastroenterology*. 2012

Sep;143(3):550-63. doi:

10.1053/j.gastro.2012.07.009. 査読有
Shimizu T, Marusawa H., Endo Y, Chiba T.
Inflammation-mediated genomic instability: roles of activation-induced cytidine deaminase in carcinogenesis. Cancer Sci. 2012 Jul;103(7):1201-6. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02293.x. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

Tsutomu Chiba
Mutation signature in precancerous gastritis mucosa
7th Annual scientific meeting
2014 年 7 月 24 日
Singapore
Tsutomu Chiba, Yuko Matsumoto, Takahiro Shimizu, Hiroyuki Marusawa.
Induction of genetic aberration during gastric cancer development by H.pylori infection
The4th JCA-AACR Special conference
2013 年 12 月 17 日
Tokyo Bay Maihama Hotel Club & Resorts (Tokyo, Urayasu)
Yugo Sawai, Yuzo Kodama, Yuji Ota, Masahiro Shiokawa, Akira Kurita, Norimitsu Uza, Hiroyuki Marusawa, Tsutomu Chiba
Activation-induced cytidine deaminase(AID) contributes to pancreatic cancer initiation by induction of tumor related gene mutations
DDW2013 2013 年 5 月 20 日
Orlando (USA)
Tsutomu Chiba
Mechanism of gastric cancer development by Helicobacter pylori infection
Asian Pacific Digestive Week 2012
2012 年 12 月 7 日
Bangkok (Thai)
Takahiro Shimizu, Hiroyuki Marusawa, Tsutomu Chiba
Activation-induced cytidine deaminase links chronic inflammation to genetic instability leading to carcinogenesis
Keystone Symposia 2012
2012 年 5 月 23 日
Dubrin(Ireland)

[図書]

なし

[産業財産権]
なし

[その他]

ホームページ
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~gastro/gastro.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
千葉 勉 (CHIBA, Tsutomu)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：24229005

(2)研究分担者
丸澤 宏之 (MARUSAWA, Hiroyuki)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：80324630

渡邊 智裕 (WATANABE, Tomohiro)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：40444468

牛島 俊和 (TOSHIKAZU, Ushijima)
独立行政法人国立がん研究センター
・研究所
研究者番号：90232818

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし