

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665  
研究種目：基盤研究(A)  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24249068  
研究課題名(和文)次世代シーケンサー・包括的エピゲノム解析による肝癌多段階発癌責任遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of aberrant pathways by integrated analysis in stepwise hepatocarcinogenesis

研究代表者  
高山 忠利(TAKAYAMA, Tadatoshi)  
日本大学・医学部・教授

研究者番号：30280944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：早期肝癌は慢性肝疾患より発生し、脱分化を経て古典的肝癌へと進展してゆく。本研究では次世代シーケンサーを用いて早期肝癌47例、古典的肝癌105例について統合解析を行い肝発癌・進展における責任遺伝子を同定した。遺伝子変異はWNT、p53/RB経路、MLLが早期肝癌の段階で、SWI/SNF複合体、PI3K経路が古典的肝癌のみで変化していたが、WNT下流遺伝子及びp53/RB関連の細胞周期遺伝子の発現上昇は早期肝癌では認められず、各経路の遺伝子変異を伴う古典的肝癌のみで活性化されていた。また、TERT遺伝子は早期肝癌の段階から複数の原因により発現上昇し肝発癌の原因の一つとなっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Early hepatocellular carcinoma (HCC) is histologically diagnosed as the existence of intratumoral portal tracts and develops into classical HCC. To identify sequential genomic changes in stepwise hepatocarcinogenesis, we analyzed 47 early and 105 classical HCCs using next generation sequencer. Mutations in p53/RB and WNT pathways were recurrently observed both in early and classical HCCs. Exome and RNA sequences frequently showed mutation of promoter region and increased expression of TERT. On the other hand, inactivation in SWI/SNF complexes were observed more often in classical HCC (23.8%) than early HCC (8.5%,  $P=0.027$ ), and mTOR/PI3K pathway was aberrantly activated in classical HCC (8.5% vs 29.5%,  $P=0.003$ ) by integrated analysis. Taken together, inactivating mutations of p53/RB and WNT signaling pathways and TERT up-regulation are the first events in hepatocarcinogenesis and aberrations of SWI/SNF complexes and mTOR/PI3K pathway may play pivotal roles in the progression of HCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：肝癌多段階発癌 次世代シーケンス p53 WNT TERT 統合解析

1. 研究開始当初の背景

早期肝癌は腫瘍内にグリソン鞘が残存し、その多くは腫瘍径が1.5cm以下で肉眼的には境界不明瞭型を呈する。これらの腫瘍は慢性肝疾患より発生し、脱分化を経て古典的肝癌へと進展してゆく。このように肝細胞癌は慢性肝疾患を背景として多段階に進展してゆくものと考えられるが、その一方で臨床レベルでの報告はみられるものの遺伝子レベルでの発癌メカニズムについては未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では次世代シーケンサーを用いて遺伝子変異、エピゲノム変化、コピー数変化、遺伝子発現レベルについて包括的に解析し、肝癌多段階発癌メカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

早期肝癌 47 例、古典的肝癌 105 例及び背景肝についてそれぞれエクソーム・RNA シークエンスを行い包括的発現解析・コピー数解析・融合遺伝子・遺伝子変異について統合解析を行い、肝発癌・進展における責任遺伝子を試みた。

4. 研究成果

(1) 早期肝癌における遺伝子発現プロファイルは古典的肝癌よりもむしろ慢性肝疾患に近く、染色体変化も古典的肝癌と比較して有意に少なかった。また、1 検体あたりの融合遺伝子数 ( $P = 0.043$ ) 及び遺伝子変異数 ( $P < 0.001$ ) も早期肝癌で有意に少なかった。

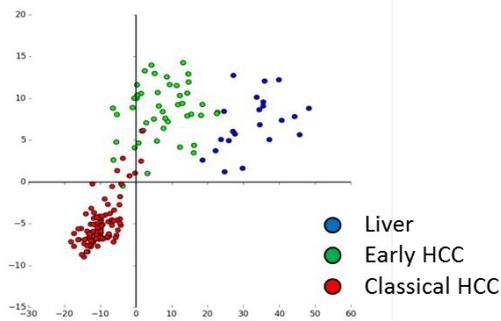


図1 .LDA による発現レベルのグループ化

(2) 遺伝子変異は *CTNNB1*、*CSMD3*、*AXIN1*、*COL11A1*、*TSC2*、*ATM* が既に早期肝癌で認められた一方で *TP53*、*ARID2*、*ALPK2* の変異は古典的肝癌で有意に高頻度であった。遺伝子変異をパスウェイ毎に分類すると WNT 経路 (25.5 vs 42.9%,  $P = 0.047$ )、p53/RB 経路 (31.9 vs 41.9%,  $P = 0.282$ )、MLL (17.0 vs 20.0%,  $P = 0.823$ ) が早期肝癌の段階で、SWI/SNF 複合体 (8.5 vs 42.3%,  $P = 0.027$ )、AKT/PI3K 経路 (8.5 vs 24.8%,  $P = 0.026$ ) が古典的肝癌のみで変化していた。

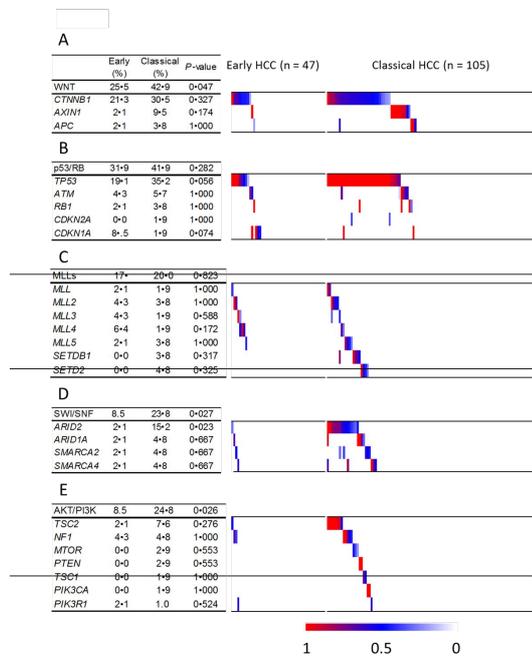


図2. シグナル経路ごとの遺伝子変異

(3) 次に遺伝子発現レベルと WNT 及び p53 経路の遺伝子変異について統合解析を行った。WNT パスウェイについては *CTNNB1* の突然変異と発現上昇が強く相関している遺伝子群が存在し、Gene Set Enrichment Analysis により WNT target gene set であることが確認された。これらの遺伝子セットは *AXIN1* の突然変異では発現は上昇せず、逆に *AXIN1* の変異でのみ発現が上昇する遺伝子群も存在した。さらに *CTNNB1* および *AXIN1* の突然変異で上昇するのは古典的肝癌のみで、早期肝癌では発現の上昇がみとめられなかった。同様に p53 の下流遺伝子である細胞周期関連遺伝子については p53 経路の変異のある古典的肝癌のみで発現が上昇し、早期肝癌では発現の上昇は認められなかった。

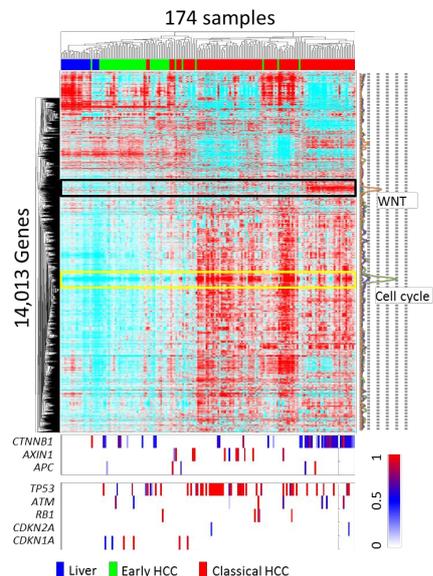


図3. 遺伝子発現と突然変異の統合解析

(4) その一方で *TERT* の発現上昇は早期肝癌の段階から認められた。*TERT* 発現上昇のメカニズムとしては融合遺伝子 (*SLC12A7-TERT*)、HB ウィルスのプロモーター領域への組み込み、プロモーター領域の変異、*TERT* を含む染色体領域 5p15.33 の増幅が考えられた。融合遺伝子については RT-PCR および Sanger 法シーケンスにより確認を行い、また *TERT* の C 端側を含む領域の抗体で免疫染色を行ったところ強発現を認めたことからインフレームであることが推測された。

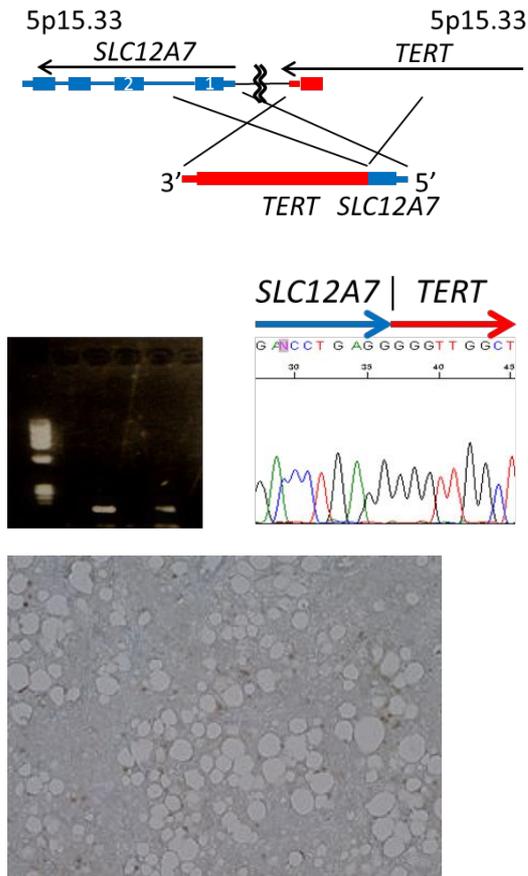


図 4-1 . *TERT* 融合遺伝子

また、HB ウィルスの *TERT* プロモーター領域への取り込みは同ウィルスのキャプチャーにより同定が可能であり、染色体変化はエクソームシーケンスにより、また、プロモーターの変異 (ATG 開始点より 124 および 146 塩基上流) については Sanger 法にてそれぞれ確認をおこなった。*TERT* 発現上昇の程度を各原因別に比較すると、5 番短腕領域の増加を除いてはそれぞれが排他的であり、その中でも 5p15.33 領域の増加、融合遺伝子、HB ウィルスの *TERT* プロモーター領域への取り込みが特に同遺伝子の発現上昇に寄与する因子であることがわかった。

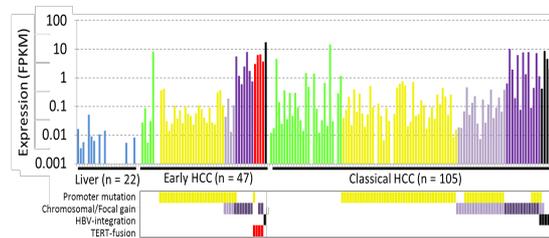


図 4-2 . *TERT* 発現上昇

(5) 早期肝癌は *CTNNB1*, *TP53* などのドライバー遺伝子の変異が比較的高頻度に認められたにもかかわらずその下流遺伝子の発現量は変化していなかった。これらの遺伝子経路が活性化するためにはドライバー遺伝子変異に加えて染色体変化、SWI/SNF 複合体や AKT/PI3K 経路などの他のゲノム変化が加わり古典的肝癌へと進展してゆくものと推察された。一方で *TERT* 遺伝子は早期肝癌の段階から複数の原因により発現上昇し肝発癌の原因の一つとなっていると考えられた。

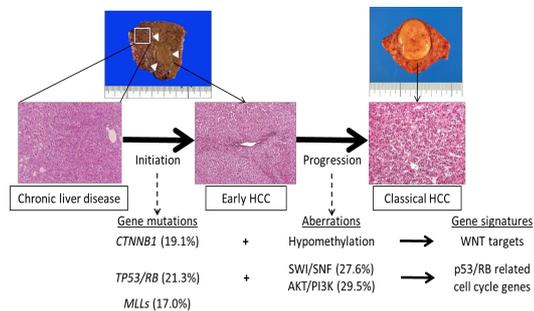


図 5 . 肝癌多段階発癌のメカニズム

以上、次世代シーケンサーによる包括的ゲノム解析により、古典的肝癌で認められたドライバー遺伝子のシグナル伝達経路は早期肝癌では活性化しておらず、ゲノム変化は発育速度の遅さなど臨床上の低悪性度の所見と一致して軽度であり、治療方針時期の決定は前癌病変に準じて行うべきであると考えられた。

< 引用文献 >

Midorikawa Y, et al. Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2009; 49: 513-22.  
 Midorikawa Y, et al. Marginal survival benefit in the treatment of early hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2013; 58: 306-11.  
 Totoki Y, et al. Trans-ethnic mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet*. 2014; 46: 1267-73.

## 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 13 件)

Esumi M, Ishibashi M, Yamaguchi H, Nakajima S, Tai Y, Kikuta S, Sugitani M, Takayama T, Tahara M, Takeda M, Wakita T. Transmembrane serine protease TMPRSS2 activates hepatitis C virus infection.

**Hepatology**. 2015; 61: 437-46. 査読有  
Utsunomiya T, Shimada M, Kudo M, Ichida T, Matsui O, Izumi N, Matsuyama Y, Sakamoto M, Nakashima O, Ku Y, Takayama T, Kokudo N; Liver Cancer Study Group of Japan. A comparison of the surgical outcomes among patients with HBV-positive, HCV-positive, and non-B non-C hepatocellular carcinoma: a nationwide study of 11,950 patients. **Ann Surg**. 2015; 261:513-20. 査読有

Totoki Y, Tatsu no K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. **Nat Genet**. 2014; 46: 1267-73. 査読有

Miyata A, Ishizawa T, Kamiya M, Shimizu A, Kaneko J, Ijichi H, Shibahara J, Fukayama M, Midorikawa Y, Urano Y, Kokudo N. Photoacoustic tomography of human hepatic malignancies using intraoperative indocyanine green fluorescence imaging. **PLoS One**. 2014; 9: e112667. 査読有

Isogaya K, Koinuma D, Tsutsumi S, Saito RA, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K. A Smad3 and TTF-1/NKX2-1 complex regulates Smad4-independent gene expression. **Cell Res**. 2014; 24: 994-1008. 査読有  
Inoue T, Kohro T, Tanaka T, Kanki Y, Li G, Poh HM, Mimura I, Kobayashi M, Taguchi A, Maejima T, Suehiro J,

Sugiyama A, Kaneki K, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Yamamoto S, Tsutsumi S, Fujita T, Ruan X, Aburatani H, Nangaku M, Ruan Y, Kodama T, Wada Y.

Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1 alpha and PPAR beta/delta is the result of the conformational proximity of two response elements. **Genome Biol**. 2014; 15: R63. 査読有

Naka-Kaneda H, Nakamura S, Igarashi M, Aoi H, Kanki H, Tsuyama J, Tsutsumi S, Aburatani H, Shimazaki T, Okano H. The miR-17/106-p38 axis is a key regulator of the

neurogenic-to-gliogenic transition in developing neural stem/progenitor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2014; 111: 1604-9. 査読有

Takayama K, Horie-Inoue K, Katayama S, Suzuki T, Tsutsumi S, Ikeda K, Urano T, Fujimura T, Takagi K, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Aburatani H, Hayashizaki Y, Inoue S. Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. **EMBO J**. 2013; 32: 1665-80. 査読有

Midorikawa Y, Takayama T, Shimada K, Nakayama H, Higaki T, Moriguchi M, Nara S, Tsuji S, Tanaka M. Marginal survival benefit in the treatment of early hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**. 2013; 58: 306-11. 査読有

Yamazaki S, Takayama T, Moriguchi M, Mitsuka Y, Okada S, Midorikawa Y, Nakayama H, Higaki T. Criteria for drain removal following liver resection. **Br J Surg**. 2012; 99: 1584-90. 査読有

Okamoto K, Ishiguro T, Midorikawa Y, Ohata H, Izumiya M, Tsuchiya N, Sato A, Sakai H, Nakagama H. miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. **EMBO J**. 2012; 31: 1752-63. 査読有

Tsuji S, Midorikawa Y, Takahashi T, Yagi K, Takayama T, Yoshida K, Sugiyama Y, Aburatani H. Potential responders to FOLFOX therapy for colorectal cancer by Random Forests analysis. **Br J Cancer**. 2012; 106: 126-32. 査読有

Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S,

Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H. Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. **Genome Res.** 2012; 208-19. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Identification of aberrant pathways by integrated analysis in stepwise hepatocarcinogenesis. Yutaka Midorikawa, Shogo Yamamoto, Kenji Tatsuno, Hiroo Ueda, Kotaro Sonoda, Shingo Tsuji, Genta Nagae, Tatsuhiro Shibata, Kyle Covington, David Wheeler, Tadatoshi Takayama, Hiroyuki Aburatani. 第 73 回日本癌学会 . 2014.9.25.-27. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Identification of inactivating mutations in stepwise hepatocarcinogenesis using next generation sequencer. Yutaka Midorikawa, Shogo Yamamoto, Hiroo Ueda, Kotaro Sonoda, Shingo Tsuji, Kenji Tatsuno, Tatsuhiro Shibata, Kyle Covington, Margaret Morgan, David Wheeler, Tadatoshi Takayama, Hiroyuki Aburatani. American Association for Cancer Research 2014. 2014.4.5.-9. (San Diego (USA))

Identification of mutation patterns using exome sequencing for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. Yutaka Midorikawa, Shogo Yamamoto, Hiroki Ueda, Kotaro Sonoda, Shingo Tsuji, Genta Nagae, Kenji Tatsuno, Tatsuhiro Shibata, Kyle Covington, David Wheeler, Tadatoshi Takayama, Hiroyuki Aburatani. 第 72 回日本癌学会 2013.10.3.-5. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Genome-wide analysis of stepwise hepatocarcinogenesis using next generation sequencer. Yutaka Midorikawa, Tadatoshi Takayama, Shogo Yamamoto, Hiroo Ueda, Kotaro Sonoda, Kiyoko Takane, Shingo Tsuji, Genta Nagae, Kenji Tatsuno, Margaret Morgan, David Wheeler, Hiroyuki Aburatani. American Association for Cancer Research 2013. 2013.4.6.-10. (Washington DC (USA))

Integrative analysis of methylation

and expression profiles for discovering functional key molecules in colorectal cancer. Yutaka Midorikawa, Shingo Tsuji, Genta Nagae, Tadatoshi Takayama, Yasuyuki Sugiyama, Hiroyuki Aburatani. 第 71 回日本癌学会 . 2012.9.19.-21. ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

〔図書〕(計 7 件)

緑川 泰, 山本尚吾, 高山忠利, 油谷浩幸: 全エクソンシーケンス・RNA シークエンスによる肝癌多段階発癌メカニズムの解明 日本臨床 73: 208-12, 2015.

緑川 泰, 高山忠利: 肝切除の適応と治療成績. 腫瘍内科, 科学評論社: 13(5): 585-92, 2014.

緑川 泰, 高山忠利, 田中正俊: ガイドラインと集学的治療 肝癌診療 Q&A 中外医学社: 125-8, 2013.

緑川 泰, 山本尚吾, 高山忠利, 油谷浩幸: メタボ肝癌の病態. メタボ肝癌, アークメディア: 81-8, 2013.

緑川 泰, 高山忠利: 肝尾状葉切除 肝胆膵脾手術アトラス 金原出版: 711-4, 2013.

緑川 泰, 高山忠利: アルゴリズムに沿った良方針 肝癌治療の要点と盲点 文光堂: 78-85, 2013.

緑川 泰, 山崎慎太郎, 高山忠利: 肝細胞癌のすべて 2012 切除. 肝胆膵, アークメディア: 65(6): 1205-10, 2012.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/rinsho\\_15.html](http://www.med.nihon-u.ac.jp/department/rinsho_15.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 忠利 (TAKAYAMA, Tadatoshi)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号: 30280944

(2) 研究分担者

緑川 泰 (MIDORIKAWA, Yutaka)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号: 10292905

堤 修一 (TSUTSUMI, Shuichi)  
東京大学・先端科学技術研究センター・  
特任准教授  
研究者番号: 30345152

辻 真吾 (TUSJI, Shingo)  
東京大学・先端科学技術研究センター・  
特任助教  
研究者番号：80431823