

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293171

研究課題名(和文) 肝臓の慢性炎症が誘導する発がん候補遺伝子におけるドライバー変異の同定

研究課題名(英文) Identification of novel mutations of candidate driver genes in immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma

研究代表者

中本 安成 (Nakamoto, Yasunari)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：40293352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞がん(肝がん)に対する新たな標的治療の開発をめざして、炎症性発がんモデルの119個の発がん候補遺伝子について発現変化に影響するゲノム・エピゲノムの変異・修飾を包括的に検出した。がん組織において、1%以上の頻度でアミノ酸配列の非同義変異が特異的に認められる遺伝子24個、コード領域周辺にあるCpGアイランドにメチル化の亢進を認めた遺伝子7個が同定された。これらは、遺伝子オントロジー(GO)解析において、酸化還元 / ミトコンドリア / 酸化還元酵素活性に関連が深く、がん標的分子となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The current study was designed to identify novel mutations of 119 candidate driver genes in an animal model of immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC). In the tumor tissues, non-synonymous mutations (> 1%) were detected in the 24 genes and hyper-methylation of CpG islands were observed around the coding region of 7 genes. Gene ontology analysis reveals that these gene changes may be enriched in functions involved in oxidation reduction / mitochondrion / oxidoreductase activity, suggesting the plausible molecular targets for HCC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌 遺伝子 核酸 動物 内科

1. 研究開始当初の背景

ウイルス肝炎に対して相次いで抗ウイルス薬が開発されているにもかかわらず、未だ我が国には慢性肝炎患者(B型、C型)が200万人以上存在している。そして、慢性の炎症反応が発がんポテンシャルを亢進することとなり(炎症性発がん)、依然として年間3万5千人以上が肝細胞がん(肝がん)によって死亡しており悪性新生物の第3位を占めている。これに対して、近年新たな分子標的キナーゼ阻害薬ソラフェニブが使用されるようになって3ヵ月間の延命効果が報告された(N. Engl. J. Med. 359:378,2008)。しかし多数例に用いられるようになって、明確な腫瘍の消失・縮小作用が認められず治療効果が限定的であることが分かってきた。その原因として、肝がん特有の責任遺伝子や細胞内分子機構が明らかとなっておらず、理論的根拠の確立された薬剤開発がなされて来なかったことが考えられる。

【発がんの責任候補遺伝子】肝発がん過程での責任遺伝子(群)を検討する目的で、応募者は平成22~24年度の基盤研究(B)(課題番号:22390149)において、慢性肝炎→前がん状態→肝がんと炎症性発がんのプロセスを誘導するモデル系(Nakamoto et al.: J. Exp. Med. 188:341,1998)を用いて網羅的発現解析を行った。その結果、単なる炎症反応や細胞増殖とは関連せずに、がん化過程の進展とともに発現レベルの変化する119個の責任候補遺伝子、8個のマイクロRNAを選択した(米国肝臓病学会AASLD2012、口演)。しかし、これらの発現変化の原因となる遺伝子の変異に関する情報は明らかとなっていない。

【遺伝子のドライバー変異】染色体DNAにみられる遺伝子変異の中で、生殖の過程で親から引き継がれるgermline変異に対して、出生後に成長の段階において遺伝子に蓄積されるsomatic変異は、正常細胞ががん細胞に分化する過程においても高度に集積されてくる。これまで、がん組織での染色体DNAのsomatic変異に関して多くの検討がなされ、大部分はパッセンジャー(乗客;非責任)変異であることが明らかとなった。そして、膨大な遺伝子変異の中からがん化の直接的な引き金となるドライバー(運転手;責任)変異を識別し選択することは容易ではないとされてきた(Science 318:1108,2007; Nature 458:719,2009)。

そこで、肝臓の炎症性発がん過程を病態生理学的に再現したB型慢性肝炎(発がん)マウスモデル(Nakamoto et al.: J. Exp. Med. 196:1105,2002; J. Immunol. 183:3053,2009; Cancer Res. 70:6556,2010他)において、がん化の進展に伴い発現変化を示す119遺

伝子について高速核酸解析技術を用いたドライバー変異の探索を行う本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

B型慢性肝炎モデルを用いてがん化のドライバー変異を同定するために、がん組織の染色体DNAについて119遺伝子に絞った核酸変異の抽出を行い、その変異が慢性肝炎の経過において出現する時期を検討する。一連の過程において特に早期に出現した変異をドライバー候補として機能解析を行った。

3. 研究の方法

B型慢性肝炎(発がん)モデル(Nakamoto et al.: J. Exp. Med. 1998; Cancer Res. 2004)における網羅的発現解析(DNAチップ; Agilent社)で、これまでに炎症性発がん特有の遺伝子群/細胞内シグナル経路(Cluster 2: 119個の遺伝子)が得られている。これに対して、Cluster 5(274個)の遺伝子は急性期の炎症反応によっても発現が変動している。

(1) 発現遺伝子プロファイル解析

モデル系において、経時的に得られた肝・腫瘍組織よりRNAを抽出して、定量的に発現遺伝子を解析した。

(2) 宿主ゲノム塩基配列解析(プロモーター領域を含むリシーケンシング)

(1)においてがん化過程での発現低下が検証された遺伝子について、次世代シーケンサー(MiSeq; Illumina社)を含むハイスループット核酸解析技術を用いて、発現変化の原因となるゲノム変異を探索した。

(3) 宿主エピゲノム解析

遺伝子の発現低下の機序として、塩基配列の変化に加えて、エピゲノム(メチル化)による修飾が加わっている可能性があった。そこで、(2)の塩基配列解析と同様に、メチル化されたDNAを濃縮して(EpiXploreTM Methylated DNA Enrichment Kit; TAKARA社)メチル化の程度が変化したゲノム領域(DMRs: Differentially Methylated Regions)を検出した。

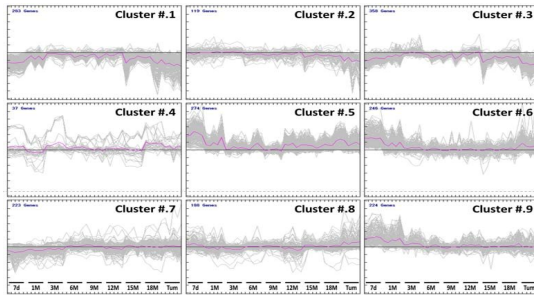
(4) 変異ゲノムの機能的解析

遺伝子の機能や細胞内局在に関するアノテーションを遺伝子オントロジー(GO)解析を施行した。

4. 研究成果

(1) 発現遺伝子プロファイル解析

経時的な発現解析において、Cluster 2 の発現レベルが炎症反応には依存せず、前がん状態 (> 15 ヶ月目) やがん組織において顕著に低下することが分かった。これより、Cluster 2 は肝組織のがん化にともなって特異的に発現低下を示す遺伝子群であることが明らかになった。また Cluster 2 以外にも 8 つのクラスターが存在することが示された (下図: Cluster 1-9; K-means Cluster Analysis; ANOVA)。

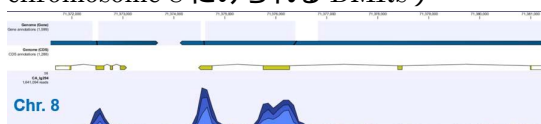


(2) 宿主ゲノム塩基配列解析 (プロモータ領域を含むリシーケンシング)

(1) においてがん化過程で発現低下が検証された遺伝子について、次世代シーケンサーを用いたハイスループット核酸解析技術によりゲノム変異を探索した。a.ゲノム DNA 抽出→b.ターゲット領域濃縮→c.高速シーケンス、の手順で進行しており、現在のところ各肝組織 (前がん 5 個、がん 5 個、対照 5 個) から約 26,000,000 ~ 64,000,000 リードのデータが得られている。リードデータのトリミングについては、50 塩基以下のリードやあいまいな塩基の除去、品質スコアによる選別を行った。Cluster 2 遺伝子のプロモータ領域内での変異 (rSNP: regulatory SNP) やコード領域エキソン内での変異 (cSNP: coding SNP) に関して経時的な比較を行った。がん組織において、1%以上の頻度でアミノ酸配列の非同義変異が特異的に認められる遺伝子が 24 個認められた。この中で、複数のがん組織にわたって変異がみられる遺伝子は 9 個であり、同一組織内で複数の変異が集積する遺伝子は 5 個であった。

(3) 宿主エピゲノム解析

遺伝子の発現低下の機序として、メチル化の程度が変化したゲノム領域 (DMRs) を検出した。発症前の肝組織のデータを対照として、経時的組織における変化をゲノムマップ上に配列すると、メチル化の亢進した領域が Cluster 2 のうち 7 遺伝子周辺の CpG アイランドに認められることが分かった。(下図: chromosome 8 にみられる DMRs)



(4) 変異ゲノムの機能解析

(2)(3) で認められたゲノム・エピゲノム変化について遺伝子オントロジー (GO) について検討したところ、oxidation reduction / mitochondrion / oxidoreductase activity に関連が深く、がん標的分子となる可能性が示された。

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 24 件)

- 1) Ohno T, Ohtani M, Suto H, Ohta M, Imamura Y, Matsuda H, Hiramatsu K, Nemoto T, Nakamoto Y: Effect of green tea catechins on gastric mucosal dysplasia in insulin-gastrin mice. *Oncol. Rep.* 35: 3241-3247, 2016 (査読あり)
doi: 10.3892/or.2016.4717.
- 2) Akazawa Y, Hiramatsu K, Nosaka T, Saito Y, Ozaki Y, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Nemoto T, Suto H, Yamaguchi A, Imamura Y, Nakamoto Y: Preoperative diagnosis of cavernous hemangioma presenting with melena using wireless capsule endoscopy of the small intestine. *Endosc. Int. Open.* 4: E249-E251, 2016 (査読あり)
doi: 10.1055/s-0041-111321.
- 3) Naito T, Baba T, Takeda K, Sasaki S, Nakamoto Y, Mukaida N: High-dose cyclophosphamide induces specific tumor immunity with concomitant recruitment of LAMP1/CD107a-expressing CD4-positive T cells into tumor sites. *Cancer Lett.* 366: 93-99, 2015 (査読あり)
doi: 10.1016/j.canlet.2015.06.009.
- 4) Tanaka T, Hiramatsu K, Nosaka T, Saito Y, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Nemoto T, Suto H, Yamamoto T, Kimura H, Nakamoto Y: Pituitary metastasis of hepatocellular carcinoma presenting with panhypopituitarism: a case report. *BMC Cancer* 15;863, 2015 (査読あり)
doi: 10.1186/s12885-015-1831-7.
- 5) Nosaka T, Hiramatsu K, Nemoto T, Saito Y, Ozaki Y, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Suto H, Imamura Y, Nakamoto Y: Ruptured hepatic metastases of cutaneous melanoma during treatment with vemurafenib: an autopsy case report. *BMC Clin. Pathol.* 15: 15, 2015 (査読あり)
doi: 10.1186/s12907-015-0015-3.
- 6) Ozaki Y, Suto H, Nosaka T, Saito Y, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani

- M, Hiramatsu K, Nemoto T, Imamura Y, Nakamoto Y: A case of Helicobacterpylori-negative intramucosal well-differentiated gastric adenocarcinoma with intestinal phenotype. **Clin. J. Gastroenterol.** 8:18-21, 2015 (査読あり) doi: 10.1007/s12328-014-0543-x.
- 7) Ikawa M, Okazawa H, Tsujikawa T, Matsunaga A, Yamamura O, Mori T, Hamano T, Kiyono Y, Nakamoto Y, Yoneda M: Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex: A PET study. **Neurology** 84: 2033-2039, 2015 (査読あり) doi: 10.1212/WNL.0000000000001588.
 - 8) Nio K, Yamashita T, Okada H, Kondo M, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Zeng SS, Yoshida M, Hayashi T, Sunagozaka H, Oishi N, Honda M, Kaneko S: Defeating EpCAM+ liver cancer stem cells by targeting chromatin remodeling enzyme CHD4 in human hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.** Nov;63:1164-1172. 2015 (査読あり) doi: 10.1016/j.jhep.2015.06.009.
 - 9) Ji J, Zheng X, Forgues M, Yamashita T, Wauthier EL, Reid LM, Wen X, Song Y, Wei JS, Khan J, Thorgeirsson SS, Wang XW: Identification of microRNAs specific for epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells in hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 62: 829-840 2015 (査読あり) doi: 10.1002/hep.27886.
 - 10) Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y and Nakatsura T: A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer. **Int. J. Oncol.** 46: 497-504, 2014 (査読あり) doi: 10.3892/ijo.2014.2787.
 - 11) Nemoto T, Matsuda H, Nosaka T, Saito Y, Ozaki Y, Hayama R, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Comparison of hepatic arterial infusion chemotherapy and sorafenib in elderly patients with advanced hepatocellular carcinoma: A case series. **Mol. Clin. Oncol.** 2: 1028-1034, 2014 (査読あり) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4179816/pdf/mco-02-06-1028.pdf>
 - 12) Kitahara M, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Mukaida N, Matsushima K, Kaneko S: Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. **Int. Immunopharmacol.** 21: 346-353, 2014 (査読あり) doi: 10.1016/j.intimp.2014.05.023.
 - 13) Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang X, Kaneko S: Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 60: 1674-1685, 2014 (査読あり) doi: 10.1002/hep.27093.
 - 14) Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, Nakamoto Y, Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S: In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation. **Cancer Immunol. Immunother.** 63: 347-356, 2014 (査読あり) doi: 10.1007/s00262-013-1514-7.
 - 15) Miyake Y, Yamamoto K, Matsushita H, Abe M, Takahashi A, Umemura T, Tanaka A, Nakamura M, Nakamoto Y, Ueno Y, Saibara T, Takikawa H, Yoshizawa K, Ohira H, Zeniya M, Onji M, Tsubouchi H; Intractable Liver and Biliary Diseases Study Group of Japan: Multicenter validation study of anti-programmed cell death-1 antibody as a serological marker for type 1 autoimmune hepatitis. **Hepatol. Res.** 44: 1299-1307, 2014 (査読あり) doi: 10.1111/hepr.12305.
 - 16) Muramatsu T, Ikawa M, Yoneda M, Sugimoto K, Matsunaga A, Yamamura O, Hamano T, Okazawa H, Nakamoto Y: Pathophysiological decrease in the regional cerebral bloodflow in Hashimoto's encephalopathy: a multiple-case SPECT study. **Eur. Neurol.** 72: 13-19, 2014 (査読あり) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24777056>
 - 17) Zeng SS, Yamashita T, Kondo M, Nio K, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Yoshida M, Hayashi T, Oishi N, Ikeda H, Honda M, Kaneko S: The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. **J. Hepatol.** 60: 127-134, 2014 (査読あり) doi: 10.1016/j.jhep.2013.08.024.
 - 18) Shirasaki T, Honda M, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S: Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. **Hepatology** 60: 1519-1530, 2014

(査読あり)

doi: 10.1002/hep.27277.

- 19) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase in CD14+HLA-DR⁻/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 62: 1421-1430, 2013 (査読あり)
doi: 10.1007/s00262-013-1447-1.
 - 20) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S: Discrete nature of EpCAM⁺ and CD90⁺ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57: 1484-1497, 2013 (査読あり)
doi: 10.1002/hep.26168.
 - 21) Ikawa M, Yoneda M, Muramatsu T, Matsunaga A, Tsujikawa T, Yamamoto T, Kosaka N, Kinoshita K, Yamamura O, Hamano T, Nakamoto Y, Kimura H: Detection of preclinically latent hyperperfusion due to stroke-like episodes by arterial spin-labeling perfusion MRI in MELAS patients. *Mitochondrion* 13: 676-680, 2013 (査読あり)
doi: 10.1016/j.mito.2013.09.007.
 - 22) Matsunaga A, Ikawa M, Fujii A, Nakamoto Y, Kuriyama M, Yoneda M: Hashimoto's encephalopathy as a treatable adult-onset cerebellar ataxia mimicking spinocerebellar degeneration. *Eur. Neurol.* 69: 14-20, 2013 (査読あり)
doi: 10.1159/000342217.
 - 23) Miwa S1, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H: TNF- α and tumor lysate promote the maturation of dendritic cells for immunotherapy for advanced malignant bone and soft tissue tumors. *PLoS One.* 7: e52926, 2013 (査読あり)
doi: 10.1371/journal.pone.0052926.
 - 24) Yamashita T, Wang XW: Cancer stem cells in the development of liver cancer. *J. Clin. Invest.* 123: 1911-1918 2013 (査読あり)
doi: 10.1172/JCI66024.
- [学会発表] (計 9 件)
- 1) Naito T, Baba T, Takeda K, Sasaki S, Mukaida N, Nakamoto Y: Chemokine CCL3/CCR5-recruited, Cytotoxic CD4⁺ T Cells Eradicate Hepatoma Cells in a Model of Anticancer Chemotherapy with High-Dose Cyclophosphamide. **第 66 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, U.S.A.):** Hepatology 62 (1, Suppl.) 1240A; 一般; poster: Nov. 17, 2015.
 - 2) Matsuda H, Nemoto T, Ozaki Y, Naito T, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Serial Changes of Th1 and Th17 Cytokines and a SNP in HLA class II DPB1 Gene Associated with Hepatitis B Virus Reactivation in Patients Treated with Immunomodulatory Agents. **第 66 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, U.S.A.):** Hepatology 62 (1, Suppl.) 1029A; 一般; poster: Nov. 16, 2015.
 - 3) Nemoto T, Matsuda H, Hiramatsu K, Ozaki Y, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Ohtani M, Suto H, Nakamoto Y: Inhibitor Of DNA Binding 2 Gene Induced By High Levels Of Insulin Contributes To Adipogenesis And Fatty Liver In A Model Of Type 2 Diabetes Mellitus. **第 66 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, U.S.A.):** Hepatology 62 (1, Suppl.) 673A; 一般; poster: Nov. 15, 2015.
 - 4) Ofuji K, Saito K, Nakamoto Y, Nakatsura T: Pre-operative plasma glypican-3 levels detected by a novel ELISA system predict the risk of post-operative recurrence in patients with stage I hepatocellular carcinoma. **第 66 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, U.S.A.):** Hepatology 62 (1, Suppl.) 464A; 一般; poster: Nov. 14, 2015.
 - 5) Nakamoto Y, Yamashita T, Hiramatsu K, Nemoto T, Suto H, Kaneko S: Identification of Hypermethylation and Non-Synonymous Mutations in Genes Down-Regulated during the Process of Hepatocarcinogenesis in a Model of Chronic Hepatitis B. **第 65 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 60 (1, Suppl.) 637A; 一般; poster: Nov. 9, 2014.
 - 6) Naito T, Baba T, Mukaida N, Nakamoto Y: Cytotoxic CD4⁺ Cells Play a Pivotal Role in Cyclophosphamide-Mediated Cytotoxicity against Hepatoma without Antigen Priming. **第 65 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 60 (1, Suppl.) 497A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.
 - 7) Ofuji K, Yoshikawa T, Tada Y, Shimomura M, Nakamoto Y: Identification of a Novel HLA-A2 Restricted Immunotherapeutic

Target Derived from an EGFR Mutated Antigen for the Treatment of Metastatic Liver Tumors. **第 65 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 508A; 一般; poster: Nov. 8, 2014.

- 8) Matsuda H, Naito T, Nosaka T, Nemoto T, Ohtani M, Hiramatsu K, Suto H, Nakamoto Y: Serial Changes of Cellular, Humoral, and Innate Immune Responses following Immunosuppressive Chemotherapies Responsible for Hepatitis B Virus Reactivation. **第 65 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts)**: Hepatology 60 (1, Suppl.) 1039A; 一般; poster: Nov. 11, 2014.
- 9) Ohtani M, Suto H, Nakamoto Y: Clinical evaluation of patency capsule system in high risk patients for video capsule endoscopy. **Japan Digestive Disease Week 2013 (Tokyo)**; 一般; oral: Oct. 12, 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中本 安成 (NAKAMOTO YASUNARI)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：40293352

(2)研究分担者

山下 太郎 (YAMASHITA TARO)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：90377432

(3)連携研究者

なし