

## 非アルコール性脂肪肝由来肝癌原因遺伝子の網羅的探索

大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学教室

小玉 尚宏

### 1. はじめに

肝癌は、世界でその死亡率が全癌種中第2位に位置する予後不良の疾患である。日本においてはHCVの持続感染による慢性肝疾患が肝癌の主たる原因であったが、C型肝炎の治療薬の進歩によりHCV由来の肝癌は減少傾向にあり、今後もさらに減少していくと考えられている。一方、増加傾向にあるのがHBV・HCV共に陰性の肝癌であり、これらの多くはNASHからの発症と考えられている。食生活の欧米化に伴う肥満人口の増加から、欧米のみならず日本においてもNASH患者は増加の一途を辿っており、今後NASHは肝癌の主要な原因になっていくと考えられている。

肝癌は、多中心性発癌による再発率の高さが特徴的であり、有効な治療法の確立には肝発癌制御機構の解明が非常に重要である。ゲノム異常の蓄積が癌の本質であるとの考えの下、近年、癌におけるゲノム変異の包括的なカタログを作成すべく、国際がんゲノムプロジェクトが数千に及ぶ癌患者の全ゲノムシーケンスを行った。これにより、500例を超える肝癌のゲノム情報も明らかとなり、その結果10,000を超える遺伝子の低頻度な変異が同定された<sup>1</sup>。しかし、この検体数でも、これら低頻度の遺伝子異常が実際に肝発癌に寄与しているかを統計学に検討することは困難であった。また、癌では、エピゲノムや翻訳後修飾などの、ゲノム以外に生じる異常も重要な役割を果たしている。しかし、このような多角的な遺伝子制御機構を、十分な数のヒト検体を用いて同時に解析することは未だ実現不可能である。

申請者は以前ヒト検体を用いた解析の限界を克服する手法として、トランスポゾン挿入変異スクリーニング法を用い、肝発癌のドライバー遺伝子の同定を行った。このスクリーニングには、高コピーのSleeping Beauty (SB) トランスポゾンとトランスポゼースを有するマウスが用いられる。トランスポゾンとは、トランスポゼースの働きにより、ゲノム上の位置を転移するDNA塩基配列である。このマウスのSBトランスポゾンは、変異原として作用させるため、転移先の遺伝子発現を挿入位置・方向依存的に減弱・増強させるように内部の塩基配列が設計されている。つまりこのマウスでは、トランスポゼースの発現によってトランスポゾンの無作為な挿入変異がゲノムワイドに反復誘導され、その結果癌化に強く寄与する挿入変異を獲得した細胞が出現・増加し、癌が発症する。これにより発症した数十の腫瘍において、トランスポゾン挿入部位を次世代シーケンサーを用いて解析することで、発癌に寄与した遺伝子の網羅的な同定が可能となる。申請者は、長期飼育により肝癌を発症するHBs-Ag過剰発現マウスを上述のトランスポゾンマウスと交配することで、肝臓での腫瘍形成を促進させ、HBV感染からの肝発癌に関する遺伝子の網羅的なスクリーニングを行った。この結果、数十に及ぶ肝癌の新規ドライバー遺伝子の同定に成功し、これを報告した<sup>2</sup>。

本研究では、この手法を発展・応用させることにより、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を成因とする肝発癌の原因遺伝子についてゲノムワイドな癌遺伝子スクリーニングを行い、NASH由来肝癌の発症機構の解明を目指した。本研究により、NASH由来肝癌の原因遺伝子が網羅的に同定されることで、新規バイオマーカーや発癌・再発予防を目的とした治療薬の発見等に繋がることが期待される。

## 2. 方法

アルブミンプロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (B6. Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn/J) と、挿入変異型 Sleeping Beauty トランスポゾンとトランスポゼースのダブルトランスジェニックマウス (Gt (ROSA)26Sortm2 (sb11)Njen; TgTn (sb-T2/Onc2)Njen) を交配した。この交配から得られたマウスの肝細胞内では、トランスポゼースの発現により約 350 コピーのトランスポゾンが転移し、それらの無作為な挿入変異がゲノムワイドに反復誘導される。このトランスポゾンは、構造上、挿入部位の遺伝子発現を挿入位置・方向依存的に減弱・増強させ、これにより腫瘍形成を誘導すると考えられる。実際、これまでに、このマウスは約 1 年半-2 年の飼育により肝腫瘍形成が誘導されることを我々は報告している<sup>2</sup>。

- ① 高脂肪食負荷モデル：上記マウスに離乳後から高脂肪食（脂質エネルギー比 60%）を投与し、脂肪肝を誘導した。
- ② Pten 欠損モデル：肝細胞特異的 Pten 欠損マウスは、約 3 ヶ月齢から脂肪肝を発症し、約 12 ヶ月齢で肝細胞癌を発症することが報告されている<sup>3</sup>。そこで上記マウスと Pten floxed マウス (C. 129S4-Ptentm1Hwu/J) を更に交配し、Pten 欠損下でのトランスポゾン挿入変異スクリーニングを行った。

これらのマウスで発症した肝癌のゲノム内でのトランスポゾン挿入部位を、次世代シーケンサーにより網羅的かつ定量的に解読した。このシーケンスデータを、トランスポゾンを用いたスクリーニングにおいて既に確立されている統計学的手法 (gCIS)<sup>4</sup> を用いて解析し、NASH 由来肝発癌に寄与している遺伝子をゲノムワイドに同定した。

## 3. 結果・研究成果

挿入変異型トランスポゾンを有し、肝細胞特異的にトランスポゼースを発現するマウス (Alb-Cre/SB transposase/T2Onc2 Transposon) の肝細胞内では、トランスポゼースの発現により約 350 コピーのトランスポゾンが転移し、それらの無作為な挿入変異が誘導されることを確認した。

このマウスモデルに対して高脂肪食負荷を行ったところ、3 ヶ月齢から糖尿病と脂肪肝を発症し、12 ヶ月齢の時点で高分化-低分化型肝細胞癌を発症した。一方、トランスポゾンの転移の生じない野生型マウスにおいては、高脂肪食負荷により糖尿病や脂肪肝は発症したものの、12 ヶ月令において肝癌の発症を認めなかった。これらのことから、トランスポゾンによる無作為な遺伝子変異挿入が、脂肪肝由来の肝発癌を促進したことが明らかとなった。そこで、トランスポゾンの変異が生じたこれらのマウスから発症した腫瘍を計約 70 腫瘍採取し、腫瘍から DNA を抽出した。

次に挿入変異型トランスポゾンを有し、肝細胞特異的にトランスポゼースを発現するマウス (Alb-Cre/SB transposase/T2Onc2 Transposon) を更に肝細胞特異的 Pten 欠損マウス (B6. Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn/J; C. 129S4-Ptentm1Hwu/J) と交配し、Pten 欠損下でのトランスポゾン挿入変異スクリーニングを行った。トランスポゾンの変異が生じない肝細胞特異的 Pten 欠損マウスでは、約 3 ヶ月齢から脂肪肝を発症したが、約 8 ヶ月齢までは肝細胞癌を発症しなかった。一方、トランスポゾン挿入変異の生じる Pten 欠損マウスでは約 3 ヶ月齢で脂肪肝を発症し、約 5-8 ヶ月齢において全例高分化-低分化型肝細胞癌を発症した。これらのことから、Pten 欠損により生じた脂肪肝においても、トランスポゾンによる無作為な遺伝子変異挿入が肝発癌を促進したことが明らかとなった。そこで、5-8 ヶ月令のマウスから発症した腫瘍を計約 700 腫瘍採取し、組織学的な解析を行った。これらの腫瘍を、それぞれ Dysplastic nodule、Well-differentiated HCC、Moderately or Poorly-differentiated HCC に分類し、各群から 70-80 腫瘍ずつ選択して DNA を抽出した。

上記の、高脂肪食投与マウスからの約 70 腫瘍、Pten 欠損マウスからの計約 230 腫瘍から抽出したゲノム DNA を用いて、シーケンス用のライブラリーを作成した。これらのライブラリーに対して、96 サンプルず

異なるバーコードを付加し、イルミナ社の次世代シーケンサーHiSeq2000を用いてこれら肝癌ゲノム内でのトランスポゾン挿入部位を、網羅的かつ定量的に解読した。各シーケンスにおいて計約1-2億リードが解読された。各腫瘍あたりでは、平均約8万リードが解読され、平均約3,000のトランスポゾン挿入部位が同定された。これらのデータを、トランスポゾンスクリーニングにおいて既に確立されている統計学的頻度解析手法(gCIS)を用いて解析することで、高脂肪食負荷マウスを用いたスクリーニングからは376の遺伝子を、またPten欠損マウスを用いたスクリーニングからは588の癌遺伝子候補を同定した。これらの遺伝子群についてIn silicoの解析を行ったところ、Cancer Gene Census<sup>5</sup>に登録されている癌遺伝子やヒト肝がんにおいてアミノ酸変化を伴う変異を有している遺伝子が有意に高頻度に含まれていることが明らかとなった。次に、これらの挿入部位のうち各腫瘍内での頻度が一定以上である部位のみを選択し、各腫瘍あたり80-100のトランスポゾン挿入部位について同様のgCIS解析を行った。この手法により腫瘍内において頻度の高い変異、つまり発がん初期のドライバーとして機能した遺伝子の同定が可能となると考えられる。その結果、高脂肪食負荷マウス、Pten欠損マウスそれぞれから45と38の癌トランクドライバー遺伝子候補を同定した。これらの遺伝子の多くは、トランスポゾンの挿入部位の解析からいずれも癌抑制遺伝子として機能していると考えられた。これらの中で、11の遺伝子が両方のスクリーニングにおいて同定されていた。中でもHippo経路の構成因子であるSav1遺伝子に最も強い変異を認めた。そこでHippo経路異常が肝発癌に与える影響を検討するため、不死化肝細胞株において、Pten抑制、並びにHippo経路のメディエーターであるYapの強制発現を行ったところ、細胞増殖の増加並びにスフェロイド形成の亢進を認めた。また、アログラフトによる腫瘍形成能を検討したところ、Ptenを抑制した不死化肝細胞株では、腫瘍形成を認めなかったが、Yapを強制発現した不死化肝細胞株では腫瘍形成を認め、またPten抑制並びにYapを強制発現した細胞では、腫瘍形成能がさらに亢進した。これらのことから、PI3K経路の活性化とHippo経路の不活性化が、不死化肝細胞において癌幹細胞性を増加させ、悪性形質転換を誘導することが明らかとなった。

#### 4. 考察・まとめ

トランスポゾンを用いた癌遺伝子スクリーニングにより、非アルコール性脂肪性肝炎からの肝発癌に重要な役割を果たす遺伝子群を網羅的に同定することに成功した。また、中でもHippo経路の異常は、肝発がんの発症初期に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後これらの遺伝子群について更に詳細な機能解析を行い、肝発がんに対する新規バイオマーカーとしての有用性や、発癌・再発予防を目的とした治療標的としての可能性について検討を行っていく。

#### 5. 参考文献

1. TCGA, Cell 2017
2. Kodama T et al., Gastroenterology 2017
3. Horie Y et al., J Clin Invest 2004
4. Kodama T et al, The Pron Natl Acad Sci U.S.A 2017
5. Futreal PA et al., Nat Rev Cancer 2004