Ⅲ．病因と病態—最近の遺伝子解析を中心に

田中 真二

要 旨

肝細胞癌（肝癌）の多くは、慢性肝炎、肝硬変を背景として発生し、異形成結節、早期肝癌の段階を経て、脱分化によって進行肝癌へと至る、いわゆる多段階発癌のプロセスを辿ることが知られている。多段階プロセスの分子メカニズムについて様々な研究がなされているが、昨今のゲノムワイドな遺伝子解析によって、その全容が明らかになりつつある。本稿では、特に蓄積が進んでいるゲノムのビッグデータに基づいた新しい知見を紹介し、肝癌の病因と病態について概説する。

〔日内会誌 103：19～26, 2014〕

Key words 多段階発癌, GWAS, 全ゲノムシーケンス, クロマチン構造変換, 酸化ストレス, 癌幹細胞

はじめに

2003年4月14日、ヒト遺伝子の99%を99.99%以上の精度で解読したヒトゲノム計画の完全終了が宣言された¹⁾。基本設計図の完成によるポストゲノム時代の幕開けから10年が経過し、様々なイノベーションが生まれている。まず高密度マイクロアレイ技術の開発により、全ゲノムを包括するトランスクリプトミックスが可能となった。現在では、DNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析は一般的な手法となっている。また、ゲノム上の個人差を示す違いを一塩基多型（single nucleotide polymorphism：SNP）と呼ぶが、国際的プロジェクトによって精度の高いSNPパターンのデータベースも整備された（HapMap）。約1千万種存在するSNPの中から、遺伝的多型を識別する代表的なSNP（約50万種）

が“タグSNP”として選別され、2005年からインターネットにより無償で情報公開されている。さらに、遺伝子配列を解読するシーケンス技術も飛躍的に進み、疾患別の全ゲノムを決定する国際プロジェクトが次々に進められている。近年、著しい研究成果が得られているGWAS（genome-wide association study：ゲノムワイド関連解析）および全ゲノム（エキソン）シーケンス解析（whole genome sequencing, whole exome sequencing）を中心に、肝癌における代表的報告をまとめ、その臨床的意義について考察する。

1. 肝癌の病因～GWASからのアプローチ

肝癌の背景となる慢性肝疾患として、ウイルス性肝炎（hepatitis B virus：HBV, hepatitis C virus：HCV）、アルコール性肝炎、非アルコール

東京医科歯科大学肝胆膵・総合外科

Liver Cancer: Progress in Diagnosis and Treatments. Topics: III. Whole genome analysis to reveal the pathogenesis of hepatocellular carcinoma.

Shinji Tanaka: Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, Tokyo Medical and Dental University, Japan.

トピックス

図 1. 肝癌の多段階的進展

肝細胞癌の多くは、ウイルス性肝炎（HBV, HCV）、アルコール性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）などによる慢性肝炎・肝硬変を背景として発生することが知られている。慢性肝炎・肝硬変から発癌へと進む遺伝的感受性は、免疫回避、酸化ストレス抑制、アポトーシス制御などのパスウェイに分類できることがGWASにより明らかとなった。さらに、肝癌の全ゲノムシーケンスの結果、p53/Rb, Wntシグナルに並ぶ第3のドライバー変異パスウェイが見出されている。今後の研究によって、各段階を登る責任遺伝子の同定が期待されている。

ル性脂肪肝炎（non-alcoholic steatohepatitis：NASH）など多様な病因が挙げられる（図1）。HBVの場合、慢性化によって肝癌の発生危険率は7倍となる。HBVウイルス量が高い症例、すなわちウイルス高複製状態が続いていることは肝癌の危険因子であり、HBVジェノタイプによっても頻度が異なることが知られている。HCV慢性化の場合、肝癌の発生危険率は15～20倍にも達し、本邦ではC型肝炎の年間発癌率7～8%（全世界では1～4%）となっている。HCVウイルス量やジェノタイプ1bと発癌についての相関を認める報告がある一方、否定的なデータもある。

肝発癌の病因には、このようなウイルス側の因子だけではなく、宿主側の素因、発癌感受性もリスク因子として重要である。以前よりHBV慢性化とHLAタイピングなどの相関が報告されていたが、発癌の遺伝的素因を網羅的に解析する手法として、近年GWASが活用されている。GWASとは、個人を識別するタグSNP（約50万種）をマーカーとして利用し、特定の個人集

団の遺伝的背景を網羅的に炙り出すものである。

Zhangらは中国のHBV慢性感染者のうち、肝癌を持つ348例と持たない359例を比較したGWASを解析した（表）。その結果、KIF1Bのイントロン上の遺伝子多型がHBV陽性肝癌の発癌リスクと相関することを見出した（オッズ比1.64； $p=2 \times 10^{-18}$ ）²⁾。KIF1Bを含むキネシン・ファミリーは微小管上を移動し、様々な物を輸送するモーター蛋白質群で、特にKIF1Bはミトコンドリアなどの細胞内輸送を担っている。KIF1Bを含む染色体1p36.2領域は神経芽腫など多くの癌腫で欠失しており、アポトーシス誘導といった癌抑制遺伝子として機能する可能性が報告されている。KIF1B遺伝子多型による機能変化が、HBV発癌メカニズムと関連することが示唆されるが、日本でのHBV肝癌では相関を認めないという報告もある。また中国のLiらは新しいHBV肝癌感受性遺伝子として、6p21.32上のHLA-DQA1/DRB1（オッズ比=1.28, $p=5.24 \times 10^{-22}$ ）と21q21.3上のGRIK1（オッズ比=0.84, $p=5.24 \times 10^{-10}$ ）の

表. GWASによって同定された肝癌感受性遺伝子

病因別	遺伝子名	SNP番号	分類	機能	オッズ比	地域	文献
HBV肝癌	<i>KIF1B</i>	rs17401966	細胞内輸送モーター (ミトコンドリア輸送 など)	アポトーシス制御 など	1.64	中国	Zhang et al.
HBV肝癌	<i>HLA-DQA1/ DRB1</i>	rs9272105	MHCクラスII分子	抗原提示	1.28	中国	Li et al.
	<i>GRIK1</i>	rs455804	グルタミン酸受容体	酸化ストレス関連	0.87		
HBV肝癌	<i>HLA-DQ</i>	rs9275319	MHCクラスII分子	抗原提示	1.49	中国	Jiang et al.
	<i>STAT4</i>	rs7574865	細胞内シグナル伝達 分子	インターフェロン・ 免疫	1.21		
HCV肝癌	<i>MICA</i>	rs2596542	非古典的MHCクラス Ib分子	NK細胞による攻 撃指標	1.39	日本	Kumar et al.
HCV肝癌	<i>DEPDC5</i>	rs1012068	G蛋白シグナル関連 分子?	膜輸送?	1.75	日本	Miki et al.
(NASH)*	<i>PNPLA3</i>	rs738409	リパーゼ活性酵素	エネルギー代謝	-	米国	Romeo et al.
(アルコール性)*	<i>PNPLA3</i>	rs738409	リパーゼ活性酵素	エネルギー代謝	2.25	米国	Tian et al.

(*) : NASH, アルコール性はそれぞれ慢性肝疾患症例を対象とした解析結果 (肝癌GWAS未報告)

遺伝子多型を同定している³⁾. *GRIK1* (glutamate receptor, ionotropic, kainate 1) はグルタミン酸受容体 (イオンチャネル共役型) の1つである. グルタミン酸は酸化ストレスを制御するグルタチオンの構成要素の1つであり, “癌幹細胞”との関連性からHBV肝発癌における重要性が推察される. さらにJiangらは中国HBV肝癌の解析から, *HLA-DQ* (オッズ比 = 1.49, $p = 2.72 \times 10^{-17}$) と *STAT4* (オッズ比 = 1.21, $p = 2.48 \times 10^{-10}$) を同定した⁴⁾. *STAT4* はインターロイキン12やインターフェロン α/β によって活性化される細胞内シグナル分子であり, ヘルパーT細胞分化やインターフェロン γ 産生に重要な機能を持っている. *STAT4* 遺伝子多型はイントロンにあり, 肝組織の*STAT4* 低発現と相関するという結果から, 感染・癌化メカニズムへの関与が示唆される.

HCV慢性化のGWASでは, 我が国を含む複数の研究グループから*IL28B*遺伝子多型が同定されているが, HCV肝癌のGWASについても我が国の2つの研究グループから報告されている (表). KumarらはHCV陽性肝癌721例, 健常者2,890

例について約43万個のSNPを比較して, 6q21.3の*MICA*領域を同定した (オッズ比 = 1.39, $P = 4 \times 10^{-13}$)⁵⁾. *MICA* 遺伝子多型によって*MICA*蛋白質量が低下することから, 遺伝子プロモーター活性の変化が示唆される. *MICA* (MHC class I chain-related gene A) は非古典的MHCクラスIb分子に属する膜蛋白の1つであり, ウイルス感染や癌化した細胞表面で高発現し, NK細胞の活性型レセプターNKG2Dに対するリガンドとして機能する. つまり, *MICA* 遺伝子多型により*MICA*蛋白が低下すると, NK細胞によって認識されないため, 感染・癌化肝細胞の排除機構が機能不全に陥り, 発癌リスクへとつながることが予想される. 一方, MikiらはHCV慢性感染のうち肝癌が好発する55歳以上を対象を絞り, 肝癌を持つ212例と持たない765例に対して約47万個のSNPを比較して, 22q12.3上に存在する*DEPDC5* のイントロン領域の遺伝子多型を同定した (オッズ比 = 1.75, $p = 1.27 \times 10^{-13}$)⁶⁾. *DEPDC5* (DEP domain-containing protein 5) は, Gタンパク質シグナルを活性化するDEPドメインをC末端に持

トピックス

ち、膜輸送に関与することが示唆されているが、常染色体優性焦点性てんかんの原因遺伝子とも報告されている。DEPDC5 遺伝子多型による発現亢進が発癌を促す可能性が予想されており、機能解析に基づくメカニズムの解明が必須である。

我が国では、非ウイルス性肝障害による肝癌が増加している。アルコール性肝障害に加え、糖尿病などメタボリック症候群を背景とするNASHが注目されているが、HBV潜伏感染の存在なども指摘されており、その発癌メカニズムには不明な点も多い。非ウイルス性肝障害の中でも、NASHでは家族歴を18%に認め、また米国ではヒスパニック系とアフリカ系の発症リスクが10倍以上異なるという報告があり、NASH発症の遺伝的素因が示唆されている。NASH発症に対するGWASの結果、22q13.31上のPNPLA3遺伝子多型が同定され、ヒスパニック系に多いことも証明された⁷⁾。興味深いことにアルコール性肝硬変のGWASでもPNPLA3遺伝子多型と強い相関を認めることが報告されている⁸⁾。PNPLA3 (patatin-like phospholipase domain-containing protein 3: 別名adiponutrin) はリパーゼ活性を持つ酵素であり、トリグリセロールの加水分解、脂肪酸の脂質間移動を介してエネルギー代謝を促す。PNPLA3遺伝子多型によるアミノ酸置換によってリパーゼ活性が低下すると、肝細胞への中性脂肪蓄積が亢進されることが示唆される。PNPLA3遺伝子多型がNASH、アルコール性だけでなくウイルス性肝癌の発癌リスクや予後にも関与するという報告があり⁹⁾、NASH肝癌、アルコール性肝癌の各症例群を対象とした癌特異的GWAS解析が急務である。

以上、各病因における肝癌GWASの報告を表にまとめた。慢性肝炎・肝硬変から発癌へと進む遺伝的感受性は病因によって異なるが、免疫回避(MHC、インターフェロンなど)、酸化ストレス抑制、アポトーシス制御などのパスウェイ

に分類できる可能性が示されている。

2. 肝癌の病態～全ゲノムシーケンスによって解明された第3のパスウェイ

癌の本体は遺伝子異常であり、様々な変異が癌の病態を決定するドライバーとなっている。肝癌における遺伝子変異では癌抑制遺伝子p53 (TP53) やp16 (CDKN2A) をはじめ、β-catenin (CTNNB1) やAxinなどWntシグナル伝達パスウェイの構成分子の変異が報告されてきた (図2)。近年、次世代シーケンサーなど遺伝子解析技術の開発が急速に発展し、癌細胞のゲノムに存在する遺伝子変異の全体像を探るプロジェクトが進んでいる。肝癌でも全ゲノムシーケンスや全エクソンシーケンスが進行しており、興味深い知見が得られている。

肝癌ではゲノム全体で1万以上の遺伝子変異が認められているが、実際に病態に関与するドライバー (運転手) 変異はその一部であり、多くはパッセンジャー (乗客) 変異と考えられている。全ゲノムシーケンスの結果、まず既知のパスウェイにおけるドライバー変異として、p53/Rb細胞周期系 (TP53, CDKN2A) 20%～30%、Wntシグナル系 (CTNNB1, Axin1) 30%～40% が共通に認められ、その他PI3K/Rasシグナル系 (PTEN, PIK3CA, TSC1, KRAS, NRAS) を数%～10% 程度検出している。

新規のHCCドライバー変異としては、米国Liらの全エクソンシーケンスによって報告されたARID2不活化が挙げられる¹⁰⁾。ARID2はSWI/SNFクロマチン構造変換 (リモデリング) 分子複合体のコンポーネントの1つである。DNAはヒストンを核にして巻き付くクロマチン構造によって収納されているが、SWI/SNF複合体はクロマチン構造をほどき転写活性化を促すATP駆動モーターである。SWI/SNF複合体は、ATPase活性をもつ酵素サブユニット (BRM, BRG1)

図 2. 肝癌の代表的なドライバー変異パスウェイ.

A. p53/Rb細胞周期パスウェイ. B. Wntシグナル (古典的) パスウェイ.

Guichardらの報告によると (フランス), 肝癌における遺伝子変異として, p53 (*TP53*)=20.8%, p16 (*CDKN2A*)=7.2%, およびβ-catenin (*CTNNB1*)=32.8%, *Axin1*=15.2%, *APC*=1.6%に認められている¹¹⁾.

図 3. SWI/SNFクロマチン構造変換分子複合体.

A. BAF (SWI/SNF-A) 型, B. BAF (SWI/SNF-B) 型.

Fujimotoらによる本邦の報告では肝癌における遺伝子変異や欠失として, *ARID1A*=10%, *ARID1B*=6.7%, *ARID1B*=5.8%に認められている¹²⁾.

や標的サブユニットなど10個以上の分子群から構成されており, 近年多くの癌でその異常が報告されている. SWI/SNF複合体には, *ARID1A* または*ARID1B*を標的サブユニットとするBRG1-associated factor (BAF) 型と, Polybromol (PBRM1)-*ARID2*-BRD7を標的サブユニットとす

るPolybromo-BAF (PBAF) 型の2種類が知られており, BAF型かPBAF型かのいずれかを持っている (図3). Liらの報告では, 特にHCV肝癌でPBAF型の*ARID2* 不活化変異が多いとしている点は興味深い (18.2%). フランスのGuichardらはアルコール性肝癌における*ARID2* 変異が

トピックス

図4. Keap1-Nrf2 (NFE2L2) システムによる酸化ストレス応答。

Keap1 蛋白は酸化ストレスセンサーとして機能する。定常状態では、Keap1 は転写因子Nrf2 (NFE2L2) と細胞内で結合し、プロテアソームによるNrf2 (NFE2L2) 分解を促している。酸化ストレス状態では、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) によってKeap1 蛋白がシステイン修飾を受けるため、その立体構造が変化してNrf2 (NFE2L2) との結合能を失う。プロテアソームの分解を免れたNrf2 (NFE2L2) は核内移行し、抗酸化酵素群遺伝子のプロモーターに結合して発現を促進する。

Guichardらの報告によると(フランス), 肝癌の6.4%にNrf2 (NER2L2) の遺伝子変異を検出し, 追加解析症例ではKEAP1にも変異を認めている¹¹⁾。

5.6% に対して, BAF型のARID1A変異は16.8%と報告しており¹¹⁾, 同じパスウェイでありながら, 病因によってBAF型, PBAF型に分かれる可能性もある。但し, Fujimotoらによる本邦の報告では病因による差は余り明確ではなく, 肝癌全体での遺伝子変異や欠失はARID1A 10%, ARID1B 6.7%, ARID1B 5.8% としている¹²⁾。さらに, 頻度は少ないながらBRM, BRG1, PBRM1 などの変異も肝癌で認められ, このSWI/SNFパスウェイがp53/Rbパスウェイ, Wntシグナルパスウェイに匹敵する第3のHCCドライバー変異としてクローズアップされてきた。SWI/SNF複合体以外にも, ヒストンをメチル化するtrithorax groupの一員MLLファミリーの変異を認め (MLL; 1.7%, MLL3; 4.2%), また中国HBV肝癌の全ゲノムシーケンスでもHBV DNAの遺伝子組み込み好発部位としてMLL4が同定されている¹³⁾。クロマチン構造変換分子群のドライバー変異は肝癌

全体の50%以上に認められ, それによって惹起されるエピゲノム制御システムの異常が, 肝癌の病態に深く関与していることが示唆される¹²⁾。

3. 酸化ストレスから見た肝癌の特徴

フランスのGuichardらによる報告では, 肝癌の6.4%にNFE2L2の活性化変異を検出している¹¹⁾。NFE2L2は塩基領域ロイシンジッパー構造を持つ転写因子Nrf2をコードしており, グルタチオン合成酵素, グルタチオンペルオキシダーゼ, ヘムオキシダーゼなど一連の抗酸化酵素群に対して強力な転写活性を示し, 酸化ストレス応答のキー因子の1つとして知られている(図4)。Nrf2は通常, ユビキチンリガーE3複合体の基質認識アダプター蛋白Keap1と細胞内で結合しプロテアソームによって次々に分解されているが, 細胞内活性酸素によってKeap1蛋白が

修飾されると立体構造が変化し、Nrf2 (NFE2L2) を放出する。プロテアソームの分解を免れたNrf2 (NFE2L2) は核内移行し、抗酸化酵素群遺伝子のプロモーターに結合して強発現を促進する。肝癌ではNFE2L2 活性化変異以外にも *Keap1* 不活性化変異を認めており、興味深いことに全てWnt シグナル系活性化変異を伴っていた¹¹⁾。肝癌における酸化ストレス代謝と、Wntシグナルの相互作用を示唆する新しい知見である。

酸化ストレス抑制は、前述したように癌幹細胞のみならず幹細胞に備わった特性の1つと考えられている。また癌細胞はタンパク合成が活発であり一般にプロテアソーム活性の亢進を認めるのに対して、未分化幹細胞ではプロテアソーム活性が低く維持されている。そこで我々は、肝癌細胞集団の中からプロテアソーム活性が低く、かつ細胞内活性酸素が低いサブグループを視覚化して、単離・解析を試みた¹⁴⁾。その結果、この細胞分画は非対称性分裂を呈し幹細胞マーカーを持つこと、低酸素下で抗癌剤抵抗性を示し高い造腫瘍性と転移能を持つことが判明し、いわゆる肝癌幹細胞の性質を呈することを明らかとなった。

我々が単離した肝癌幹細胞を用いて、DNA マイクロアレイによる特異的遺伝子シグネチャーを解析すると、ケモカイン・ネットワークが異常亢進していることを見出した。実際、*in vitro* ではマクロファージ遊走能を呈し、*in vivo* 転移組織の解析では肝癌幹細胞の周囲にマウスマクロファージが集簇することを確認し、生体内におけるニッチ環境の特異性が示された。さらに肝癌幹細胞の遺伝子シグネチャーを用いて、肝癌切除検体のDNAマイクロアレイデータと照合してみると、肝癌幹細胞遺伝子シグネチャーを呈した肝癌症例は有意に早期再発することが明らかとなった¹⁴⁾。幹細胞特性に基づいた解析は、肝癌の臨床病態の解明へ展開できることが示唆された。

おわりに

一方酸化ストレスは、肝発癌の危険因子として重要であることも知られている。我々は多症例のDNAマイクロアレイ解析の結果、早期肝癌における治癒切除後の再発が、癌部遺伝子ではなく非癌部の酸化ストレス遺伝子シグネチャーのみによって規定されることを報告した¹⁵⁾。酸化ストレス状態は、ゲノム不安定性を促して発癌のイニシエーターとなるばかりでなく、ゲノム不安定性がさらに多様性を誘導して悪性化を促すという癌進展のプロモーターとしても働く。このような悪性スパイラルの中で、逆に酸化ストレスを抑制する能力を維持するサブグループが、癌幹細胞として機能すると考えられる。肝癌は多様な病因、病態を示す疾患であるが、多様性を生む根幹である癌幹細胞は、転移や再発など癌難治性の要因でもある。肝癌の全ゲノム解析は未だ緒に就いたばかりであり、癌の本態を解明するため、臨床に則した多様な視点からの解析が急務となっている。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Collins FS, et al: A vision for the future of genomics research. *Nature* 422 (6934): 835-847, 2003.
- 2) Zhang H, et al: Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *Nat Genet* 42 (9): 755-758, 2010.
- 3) Li S, et al: GWAS identifies novel susceptibility loci on 6p21.32 and 21q21.3 for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. *PLoS Genet* 8 (7): e1002791, 2012.
- 4) Jiang DK, et al: Genetic variants in STAT4 and HLA-DQ genes confer risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 45 (1): 72-75, 2013.
- 5) Kumar V, et al: Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 43 (5): 455-458, 2011.

トピックス

- 6) Miki D, et al : Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet* 43(8) : 797-800, 2011.
 - 7) Romeo S, et al : Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 40 (12) : 1461-1465, 2008.
 - 8) Tian C, et al : Variant in PNPLA3 is associated with alcoholic liver disease. *Nat Genet* 42 (1) : 21-23, 2012.
 - 9) Hassan MM, et al : Genetic variation in the PNPLA3 gene and hepatocellular carcinoma in USA: Risk and prognosis prediction. *Mol Carcinog* 2013, in press.
 - 10) Li M, et al : Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 43 (9) : 828-829, 2011.
 - 11) Guichard C, et al : Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 44 (6) : 694-698, 2012.
 - 12) Fujimoto A, et al : Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet* 44 (7) : 760-764, 2012.
 - 13) Sung WK, et al : Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 44(7) : 765-769, 2012.
 - 14) Muramatsu S, et al : Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma reveals in vivo significance of tumor-host interaction and clinical course. *Hepatology* 58 (1) : 218-228, 2013.
 - 15) Tanaka S, et al : Oxidative stress pathways in non-cancerous human liver tissue to predict hepatocellular carcinoma recurrence ; a prospective multi-center study. *Hepatology* 54 (4) : 1273-1281, 2011.
-