

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590997

研究課題名(和文) 包括的エピゲノム解析に基づいた脂肪性肝疾患からの肝発癌予測因子の同定

研究課題名(英文) Identification of risk factors of hepatocarcinogenesis in fatty liver disease through the comprehensive analysis of epigenetic alterations

研究代表者

西田 直生志(NISHIDA, Naoshi)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：60281755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞株では酸化DNA損傷(8-OHdG)でエピゲノム変異が誘発され、慢性肝炎組織では異常メチル化を持つ遺伝子数は発癌までの期間と相関した。DNAメチル化の網羅的解析により、ウイルス陰性肝癌では、加齢や糖尿病が背景肝のエピゲノムに影響し、DNAメチル化を介した発癌に寄与すると考えられた。脂肪性肝疾患からの発癌リスクの同定を、肝組織8-OHdGをマーカーとして検討し、血清AFP値、及び肝細胞ballooningが独立して、量依存的に8-OHdG強度と関連することを確認した。8-OHdG染色強度はメチル化遺伝子数と優位に相関し、エピゲノム変化を介した発癌予測因子になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that oxidative DNA damage (8-OHdG) induced epigenetic alteration in HCC cell lines. In human chronic hepatitis C, number of methylated tumor suppressor genes (TSGs) was associated with time-to hepatocellular carcinoma (HCC) emergence. Through the comprehensive analysis of DNA methylation in virus-negative HCCs, methylation was affected by aging and presence of diabetes mellitus (DM), suggesting that age and DM might contribute to hepatocarcinogenesis through epigenetic mechanism. We analyzed risk factors of fatty liver-related HCC emergence using 8-OHdG level of hepatocyte as a surrogate marker, and found that serum AFP and hepatocyte ballooning were independently associated with 8-OHdG; number of methylated TSGs was significantly higher in livers with high degree of 8-OHdG levels in hepatocyte. These evidences support the idea that serum AFP level and hepatocyte ballooning could be a marker of high-risk group of HCC in patients with fatty liver.

研究分野：消化器内科

キーワード：脂肪性肝疾患 肝細胞癌 エピジェネティクス がん抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はインスリン抵抗性に起因する肝病変と考えられている。従来、NAFLD では、肝線維化進展、あるいはその進行が予想される非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) が肝癌のリスクであると報告されていた¹⁾。しかし、肝線維化軽度の症例からの肝癌発生が報告されており、肝線維化を伴わない脂肪肝の肝発癌リスクに関しては未知である¹⁾。加えて初期の NASH と単純性脂肪肝を明確に区別するのは困難である²⁾。従って、肝生検所見で将来の肝発癌リスクを十分推定するのは難しい。

申請者らは、C 型肝炎・肝硬変から発生した肝癌、非癌部肝の DNA メチル化レベルを、多数の癌抑制遺伝子プロモーター領域において解析し、メチル化レベルから癌部と非癌部を識別する癌抑制遺伝子のグループを絞り込んだ。興味深い事に、インターフェロン治療不応例での C 型慢性肝炎組織において、この遺伝子群で、異常メチル化を示す遺伝子数多い例ほど、初回発癌までの期間が短い事が明らかとなっている。すなわち、遺伝子メチル化が C 型肝炎からの肝発癌に影響し、また慢性肝炎から将来の肝発癌時期を予測し得ることを示していた。

2. 研究の目的

上記の背景より、本研究では NAFLD からの肝発癌に展開し、エピゲノム変異に基づく新規の NAFLD からの発癌予測マーカーの開発することを目的とする。そのために以下の知見を得る。

(1) NAFLD 関連肝癌と考えられる症例の癌部、非癌部の DNA メチル化を網羅的に解析し、癌部-非癌部間でメチル化に差がある CpG locus を抽出する。

(2) 上記のなかで、癌部でメチル化が亢進する CpG をプロモーターに持つ遺伝子を選び、メチル化の亢進が遺伝子発現の不活性化を引き起こしているかを検討する。

(3) NAFLD の病態進展に重要な役割を果たす酸化ストレスに注目し、酸化的 DNA 損傷がエピゲノム変異を誘導するかを検討する。

(4) 非ウイルス性肝癌 (NBNC 肝癌) の背景肝のメチル化の差異に影響を及ぼす臨床背景を明らかにする。

(5) NAFLD 肝生検組織の酸化的 DNA 損傷と相関する臨床病理学的因子を明らかにする。さらにこれらの NAFLD 肝生検組織において、酸化的 DNA 損傷の程度と、上記(1)(2)で抽出した DNA メチル化との関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 肝癌 (HCC)、その非癌部肝 (ウイルス性 37 例、NBNC 22 例) を用い、DNA メチル化 profile をイルミナ社 HM BeadChip450 を用い解析する。癌-非癌でメチル化レベルに差異のある CpG を、値の差 > 0.15 かつ U 検定と FDR 法による補正 q 値 $< 1.0E-12$ を基準として抽出し、癌部に特徴的なメチル化の変化が生じる CpG 部位を絞り込む。

(2) 5 種の肝癌細胞株を 5-Aza-dC 及び trichostatin A (TSA) を用いて脱メチル化処理し、処理前後での遺伝子発現の変化を発現が 2 倍以上回復する遺伝子を SurePrint G3 発現アレイを用いて網羅的に解析し抽出する。上記(1)において抽出された遺伝子のうち、癌部でメチル化レベルが亢進しており、さらに脱メチル化処理にて発現が回復する遺伝子を、NAFLD からの発癌に関連するエピゲノムを生じる遺伝子として絞り込む。

(3) 肝癌細胞株 (HepG2) および肝細胞由来細胞株 (HC 細胞) を過酸化水素で処理し、処理前後のヒストン修飾の変化を免疫沈降-定量 PCR (ChIP-qPCR) にて検討する。ヒストン修飾の変化の検討には、転写促進型ヒストン修飾を検出する抗体 (AcK16H4、3MeK4H3)、転写抑制型ヒストン修飾を検出する抗体 (3MeK27H3) を用い、過酸化水素処理による酸化的 DNA 損傷部位の検出には 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 抗体を用いる。

(4) NBNC、およびウイルス陽性 HCC の非癌部を、臨床背景別 (糖尿病、BMI 25、飲酒歴、HBV/HCV、性、年齢 70 才、F stage) に群別し、上記で抽出した CpG のうち、各群間で差のあるものを U 検定の $p < 0.01$ かつ BH FDR 法の補正 $q < 0.35$ で抽出する。さらに、これらの CpG 部位の内、癌部でメチル化が上昇する部位に関して、そのメチル化の変化が対応する遺伝子の転写抑制を誘導しているかを確認するため、上記(2)の結果と照合する。

(5) NAFLD からの発癌予測因子を同定するため、肝組織の 8-OHdG レベルをサロゲートマーカーとし、臨床病理学的因子との対比を行う。NAFLD 肝生検組織の 8-OHdG を免疫組織化学染色にて定量する。組織学的検索は、脂肪化、炎症、ballooning、線維化の程度を NAS スコア等の評価項目で検討し、優位に肝組織中 8-OHdG と相関する臨床病理学的因子を抽出する。さらに、肝生検において、検出される遺伝子メチル化の程度と 8-OHdG レベルとの関連を解析する。

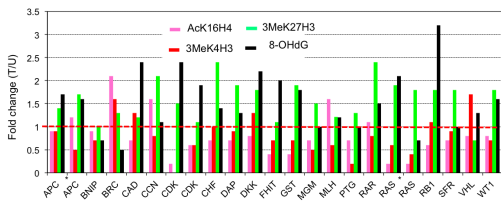
4. 研究成果

(1) 酸化ストレス前後でのヒストン修飾パターンの変化:

肝癌細胞株 HepG2 細胞、および肝細胞由来 HC 細胞を過酸化水素で処理した。20 種の癌抑制遺伝子プロモーター (CpG island を有する) における処理前後の転写促進型 (AcK16H4、3MeK4H3)、転写抑制型 (3MeK27H3)、8-OHdG による DNA 修飾の変化を求めた。処理前に対する処理後の DNA 修飾の変化比を図 1 に示す。

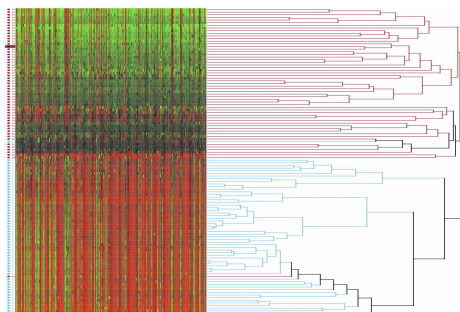
大部分のプロモーターにおいて、処理後の DNA は転写抑制型の変化比 (fold change) は 1 以上であり、転写抑制型の変化比 < 1 となっている。また 8-OHdG の変化比 > 1 であり、処理後では 8-OHdG 修飾が増加し、それらの DNA 上のヒストン修飾は転写抑制型に変化していた。すなわち、酸化ストレスに起因する酸化的 DNA 損傷はヒストン修飾を変化させることが示唆された。

図1 H₂O₂処理前後での8-OHdG量とヒストン修飾変化



(2) 肝癌部でのメチル化変化の網羅的解析と NBNC 肝癌における非癌部での背景因子によるメチル化プロファイルの変化

図2 癌-非癌でメチル化レベルの差が大きい500部位の CpG での値による階層クラスター解析



上部は癌組織、下部は非癌部のクラスターである。1 例を省いて、癌と非癌部はそれぞれ別個のクラスターを形成した。

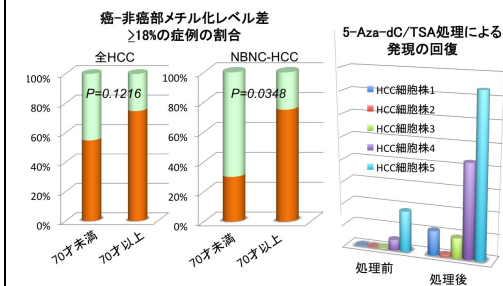
方法の部分で述べた条件に基づき、癌部でメチル化が上昇する CpG を 3052 部位、低下する CpG を 35279 部位抽出した。この CpG を含む遺伝子中で、値の差異の大きい上位 500 遺伝子を抽出した結果、癌部と非癌部で明確なクラスターを形成した (図 2)。

これらの内、肝癌の背景肝である非癌部肝組織でのメチル化レベルに注目し、肝発癌のリスクであると考えられる各臨床背景の有無が、非癌部でのメチル化レベルの差と関連があるかを検討した。各群間で差のあるものを U 検定 $p < 0.01$ かつ FDR 法の補正 $q < 0.30$ で抽出したと

ころ、NBNC 非癌部で、年齢 (70 才) により差異のある CpG が 6517 部位、糖尿病歴で 47 部位が抽出された。一方、性、喫煙歴、飲酒歴、BMI、線維化別では差異のある CpG は抽出されなかった。さら年齢の差異で非癌部肝のメチル化レベルに差が生じる CpG の中で、その CpG をプロモーターに持つ遺伝子で、かつ非癌部と比較して癌部でメチル化レベルが 15% 以上の上昇を示し、さらに検討した 5 種中 4 種の肝癌細胞株で、脱メチル化処理により遺伝子発現が 2 倍以上回復する遺伝子として HGF activator inhibitor-1 (HAI-1)/serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1 (SPINT1) 遺伝子が同定された。HAI-1/SPINT1 は細胞膜結合型セリンプロテアーゼインヒビターであり、膵癌や大腸癌では癌抑制遺伝子としての機能も報告されている。NBNC-HCC では 70 才以上の例の癌部で優位に高メチル化を示す頻度が高い (図 3)。このことより、加齢に伴って発生する肝癌の発癌において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(3) NAFLD 肝組織の 8-OHdG レベルを反影する

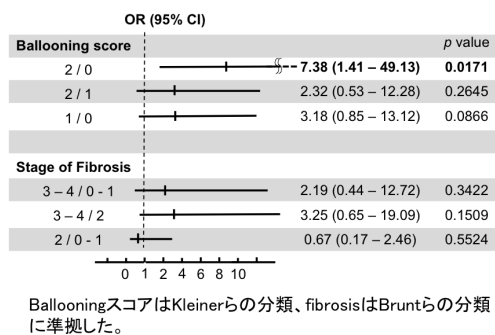
図3 NBNC 肝癌における年齢とSPINT1遺伝子のメチル化



臨床病理学的因子の同定

NAFLD 肝生検組織の 8-OHdG 染色を行い、染色強度と相関する臨床病理背景を検討した。単変量解析では性別 ($p = 0.0465$)、身長 ($p = 0.0428$)、Fibrosis-4 (Fib-4) index ($p = 0.0340$)、AST/ALT 比 ($p = 0.0216$)、血清-フェトプロテイン (AFP) 値 ($p = 0.0395$) が肝細胞の 8-OHdG 量と相関していた。この中で Fib-4 index (年齢、AST、ALT、血小板値より計算される線維化と相関する index) は AST/ALT 比との交絡因子であるため、これを省いて多変量解析した結果、血清 AFP 値が独立して肝細胞の 8-OHdG 量と関連した ($p = 0.0271$)。一方、病理学的因子では ballooning が 8-OHdG 強度と相関し ($p = 0.0021$)、炎症や steatosis は相関する傾向はあるが優位ではなかった。線維化ステージも 8-OHdG 強度と相関したが ($p = 0.0054$)、ballooning が独立して、量依存的に 8-OHdG 強度と関連していた (図 4)。8-OHdG 染色強度はその組織のメチル化 TSG 数と優位に相関していた ($p = 0.0362$)。

図4 中等度/高度の酸化DNA損傷(8-OHdG染色)レベルに対する各組織学的因子のオッズ比(OR)



<引用文献>

Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM, . NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*10, 2013, 656-65.

Yeh MM and Brunt EM., Pathological features of fatty liver disease. *Gastroenterology* 147, 2014, 754-764.

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 18 件)

Nishida N and Kudo M. A bridge between multi-omics data and the management of hepatocellular carcinoma. *Annals of Translational Medicine* 3, 1, 2015. (査読あり) doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.12.01.

Yada N, Nishida N, et al., (10人中9番目). Ultrasound elastography correlates treatment response by antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Oncology.* 87, 118-23, 2014. (査読あり) doi: 10.1159/000368155.

Nishikawa H, Enomoto H, Nishida N, et al., (15人中12番目). Treatment response and tolerability in elderly patients with chronic hepatitis C: Subgroup analysis in ReGIT-J study. *J Virol Antivir Res* 2014, 3:2. (査読あり) doi: 10.4172/2324-8955.1000125

Nishida N, et al., (12人中1番目). Identification of the epigenetically inactivated genes in human hepatocellular carcinoma by integrative analyses of methylation profiling and pharmacological unmasking. *Dig Dis.* 2014;32(6):740-746. (査読あり) doi: 10.1159/000368015.

Nishida N, et al., (14人中1番目). Genome-wide profiling of DNA methylation and tumor progression in human hepatocellular carcinoma. *Dig Dis.* 32: 658-663, 2014. (査読あり) doi: 10.1159/000367982.

Sakurai T, Kashida H, et al., (10人中7番目). Stress response protein Cirp links inflammation and tumorigenesis in colitis-associated cancer. *Cancer Res* 74: 6119-6128, 2014. (査読あり) doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0471.

Nishida N, Kudo M. Alteration of epigenetic profile in human hepatocellular carcinoma and its clinical implications. *Liver Cancer* 3: 417-427, 2014. (査読あり) doi: 10.1159/000343860.

Nishida N, Kudo M. Oxidative stress and epigenetic instability in human hepatocarcinogenesis. *Dig Dis.* 31:447-453, 2013. (査読あり) doi: 10.1159/000355243.

Nishida N, et al., (15人中1番目). Unique association between global DNA hypomethylation and chromosomal alterations in human hepatocellular carcinoma. *PLoS One*;8(9):e72312, 2013. (査読あり) doi: 10.1371/journal.pone.0072312.

Hagiwara S, Nishida N, et al., (9人中9番目). Impact of Combination Therapy with Peginterferon alpha-2b and Entecavir on Persistent Viral Suppression in Patients with Chronic Hepatitis B. *J Med Virol.* 85: 987-995, 2013. (査読あり) doi: 10.1002/jmv.23564.

Nishida N, et al., (13人中1番目). Quantification of tumor DNA in serum and vascular invasion of human hepatocellular carcinoma. *Oncology* 84: 82-87, 2013. (査読あり) doi: 10.1159/000345895.

Minata M, Kudo M, Harada K, Ikai I, and Nishida N. Expression of E-cadherin and vascular endothelial growth factor in non-cancerous liver is associated with recurrence of HCC after curative resection. *Oncology* 84: 88-92, 2013. (査読あり) doi:

10.1159/000345896.

Minata M, Harada K, Kudo M, Ikai I, and Nishida N. The prognostic value of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma for predicting metastasis after curative resection. *Oncology* 84: 75-81, 2013. (査読あり) doi: 10.1159/000345894

Nishida N and Kudo M. Recent advancements in comprehensive genetic analyses for human hepatocellular carcinoma. *Oncology* 84: 93-97, 2013. (査読あり) doi: 10.1159/000345897.

Nishida N, et al., (13人中1番目). Gender differences in the livers of patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C infection. *Digestive Disease* 30: 547-553, 2012. (査読あり) doi: 10.1159/000343057.

Hagiwara S, Sakurai T, Nishida N, et al., (13人中12番目). Risk of HCC development in cases of hepatitis C treated by long-term, low-dose PEG-IFN 2a. *Digestive Disease* 30: 561-567, 2012. (査読あり) doi: 10.1159/000343065.

Nishida N, Kudo M, Nagasaka T, Ikai I and Goel A. Characteristic pattern of DNA methylation alterations predict emergence of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 56: 994-1003, 2012. (査読あり) doi: 10.1002/hep.25706.

Hagiwara S, Kudo M, Nishida N, et al., (8人中6番目). Activation of JNK and High Expression Level of CD133 Predict a Poor Response to Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma. *Br J Cancer* 106: 1997-2003, 2012. (査読あり) doi: 10.1038/bjc.2012.145.

[学会発表](計13件)

Nishida N, Yada N, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Inoue T, Hagiwara S, Minami Y, Sakurai T, Ueshima K, Kudo M. Pathological feature, oxidative DNA damage and epigenetic alteration of tumor suppressor genes in non-alcoholic fatty liver disease. 65th Annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2014.11.8-11 (Boston, MA, USA).

Nishida N, Kudo M, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Inoue T, Hagiwara S, Minami Y, Sakurai T, Ueshima K, Nagasaka T, Goel A. Role of oxidative stress and epigenetic alteration on chronic hepatitis C-related human hepatocarcinogenesis. 64th Annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2013.11.2-5 (Washington, D.C, USA).

Nishida N, Kudo M, Chishina H, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Yokomichi N, Nagasaka T, Goel A. Unique association between global DNA hypomethylation and chromosomal alterations in human hepatocellular carcinoma. 7th ILCA (International Liver Cancer Association) Annual Conference. 2013.9.13-15 (Washington, D.C, USA).

Nishida N. Oxidative stress and epigenetic instability in human hepatocarcinogenesis. 4th International Kyoto Liver Cancer Symposium. Early Morning Breakfast Workshop 3: Carcinogenesis, Genomics, Pathways and Targets. 2013.6.7-8 (Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan).

Nishida N, Kudo M., Arizumi T., Hayaish S., Takita M., Kitai S., Yada N., Inoue T., Hagiwara S., Minami Y., Ueshima K., Sakurai T., Nagasaka T., Goel A. Novel Association between global DNA hypomethylation and chromosomal instability phenotype in human hepatocellular carcinoma. 82th Digestive Disease Week (DDW): AASLD Basic Plenary. 2012.5.19-22 (San Diego, CA, USA).

西田直生志、工藤正俊. NBNC 肝癌の背景肝におけるメチル化プロファイルと加齢および糖尿病の影響. 第22回日本消化器関連学会週間(第18回日本肝臓学会大会) シンポジウム14「NBNC 肝がんの諸問題」. 2014.10.23-25 (神戸国際会議場・ポートピアホテル、兵庫県、神戸市).

萩原智、西田直生志、工藤正俊. ヒト肝発癌における酸化ストレスとエピゲノム変異の関連. 第50回日本肝臓研究会パネルディスカッション2「ゲノム・エピゲノム解析に基づく肝癌診療の将

来展望」. 2014.6.5-6 (京都国際会議場、京都府、京都市).

西田直生志、中居卓也、工藤 正俊. 肝外再発例の肝癌 DNA メチル化プロファイルを用いた治癒切除後の早期再発予測. 第 50 回日本肝臓学会総会. 2014.5.29-30 (ホテルニューオータニ、東京都、千代田区)

西田直生志、工藤正俊. NASH/NAFLD モデルマウスの発癌過程における酸化 DNA 損傷とエピゲノム変異の誘導. 第 100 回日本消化器病学会総会 ワークショップ 9: NAFLD/NASH における新知見と治療法の進歩. 2014.4.23-26 (東京国際フォーラム、東京都、千代田区).

西田直生志、有住忠晃、田北雅弘、北井聡、矢田典久、井上達夫、萩原智、南康範、櫻井俊治、上嶋一臣、工藤正俊. ヒト肝癌に認められるゲノムワイドな脱メチル化と染色体不安定性の関連. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013.6.6-7 (京王プラザホテル、東京都、新宿区)

西田直生志、工藤正俊. 肝発癌における酸化ストレスとエピゲノム変異. 第 20 回日本消化器関連学会週間(第 16 回日本肝臓学会大会) パネルディスカッション 5: 消化器癌と酸化ストレス. 2012.10.10-13 (神戸国際会議場・ポートピアホテル、兵庫県、神戸市).

西田直生志、工藤正俊. 肝癌の遺伝子変化および背景肝組織の男女差に関する検討. 第 20 回日本消化器関連学会週間(第 16 回日本肝臓学会大会) ワークショップ 7: 消化器疾患と性差. 2012.10.10-13 (神戸国際会議場・ポートピアホテル、兵庫県、神戸市).

Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Kudo M. Impact of DNA methylation alterations in chronic hepatitis C on emergence of human hepatocellular carcinoma. 第 71 回日本癌学会学術総会: English Oral Session (DNA methylation and Biomarker). 2012.09.19-21 (ロイトン札幌・札幌市教育文化会館、北海道、札幌市).

〔図書〕(計 1 件)

西田直生志、工藤正俊. 肝癌における DNA メチル化プロファイリングの意義と現状. 肝胆膵特集: 肝胆膵腫瘍におけるバイオインフォマティクス. 2011. 353-363 (11 ページ).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/shoukaki/research/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西田 直生志 (NISHIDA Naoshi)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号: 60281755

(2) 研究分担者

波多野 悦朗 (HATANO Etsuro)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 80359801