



2012年5月28日

独立行政法人国立がん研究センター
独立行政法人理化学研究所
独立行政法人医薬基盤研究所

肝臓がんの全ゲノムを27例で解読

—多様なゲノム変異は肝炎ウイルスや飲酒などとも関連—

本研究成果のポイント

- 肝臓がんの発生要因（肝炎ウイルス感染、飲酒）が、がんゲノム異常の起こり方に影響
- *TERT* 遺伝子近くへのウイルスゲノム挿入が、B型肝炎関連肝臓がんの発がんに関与する可能性
- 約60%の症例でクロマチン制御遺伝子の異常が見つかり、それらを標的とした新しい治療法や予防法の開発に期待

国立がん研究センター（堀田知光理事長）、理化学研究所（野依良治理事長）は、共同で27例の肝臓がんの全ゲノムシーケンス解析を行い、肝臓がんの体細胞ゲノム異常を包括的に解析しました。本研究は、国立がん研究センター研究所（中釜斉所長）がんゲノミクス研究分野の柴田龍弘分野長と、理研ゲノム医科学研究センター（久保充明センター長代行）パイオマー探索・開発チームの中川英刀チームリーダーとの共同研究として行なわれ、国際がんゲノムコンソーシアム（ICGC）^{*1}のプロジェクトの一環として進められました。（本研究は、医薬基盤研究所（山西弘一理事長）「保健医療分野における基礎研究推進事業」からの支援によって行われました。）

日本では、年間約4万人が肝臓がんと診断され、3万人以上が亡くなっています（出典：2011年国立がん研究センター がん対策情報センター調べ）。特に、日本や中国を含む東アジア地域とアフリカ地域で発症頻度が高く、世界全体の部位別がん死亡率では第3位に挙げられています。主な原因としては肝炎ウイルスの持続感染が重要であり、B型肝炎ウイルス^{*2}やC型肝炎ウイルス^{*2}の感染に伴い、慢性肝炎から肝硬変を経て肝臓がんが高頻度に発生する事が知られています。病態に応じて様々な治療法がありますが、その効果は十分ではなく、分子機構の解明による新たな治療法や予防法の開発が強く望まれています。

今回、共同研究グループは、27例の肝臓がん（B型肝炎関連11例、C型肝炎関連14例、非ウイルス性2例）について、その腫瘍のDNAと同一患者の白血球から得られた正常DNAの全塩基配列（約30億塩基対）を次世代シーケンサー^{*3}を用いて解析し、がん特異的なゲノム異常を包括的に解析しました。そのデータ総量は約7兆個もの配列情報となり、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピューターを駆使してデータ解析を行いました。その結果、ゲノム異常の数は、1つの腫瘍あたり平均で点突然変異^{*4}が約11,000カ所、染色体構造異常^{*5}が21カ所でした。個々の症例はそれぞれ多様なゲノム異常を示しましたが、全ゲノムレベルで塩基の置換パターンに着目したところ、肝炎ウイルスや飲酒の習慣など、肝臓がんの原因となる発がん要因の影響を受けていることが分かりました。

今回新たに発見した肝臓がんにおけるゲノム変異の内、*ARID1A*、*ARID1B*、*ARID2*、*MLL*、*MLL3*など、クロマチン制御^{*7}に関わる10個の遺伝子の変異が、27症例中16例と約60%の症例で起きていることが判明しました。細胞株を用いた機能実験の結果、これらの遺伝子は肝臓がん細胞の増殖を抑制する機能を有していることが分かりました。さらに、B型肝炎関連の肝臓がんにおいて、染色体末端の構造を維持し、細胞の不死化に重要な働きをしてい

るテロメラーゼ遺伝子 *TERT*^{*8}の近くに、B型肝炎ウイルスゲノムが高い頻度で挿入されていることも分かり、B型肝炎関連の肝臓がんの発生に關与する可能性が示唆されました。

今回、約60%の肝臓がんでクロマチン制御機構の異常を認めたことから、今後こうした分子を標的とした新たな治療法や予防法の開発が期待されます。また、今回の解析データは、ICGCのホームページ (<http://www.icgc.org/>) で公開されています。

本研究成果は、英国の科学雑誌『*Nature Genetics*』の掲載に先立ち、オンライン版(5月27日付け：日本時間5月28日)に掲載されます。

1. 背景

肝臓がんは、日本における部位別死亡者数では、男性で3位、女性では6位です。年間約4万人が肝臓がんと診断され、3万人以上が亡くなっています。特に、日本や中国を含む東アジアとアフリカで発症頻度が高く、世界全体の部位別がん死亡率では第3位に挙げられています。また最近では、アジアだけでなく欧米でも増加しているがんとして世界的に対策が急がれています。主な原因としては肝炎ウイルスの持続感染が重要であり、世界中の肝臓がんの約75%は、B型肝炎ウイルス (HBV) またはC型肝炎ウイルス (HCV) の感染によるものと推定され、高頻度で慢性肝炎から肝硬変を経て肝臓がんが発生する事が知られています。また過度のアルコール摂取に伴う肝障害も肝臓がんの原因として知られています。一方、日本では、肝臓がんの約75%がC型肝炎ウイルス、約20%がB型肝炎ウイルスの持続感染が原因と推定されています

(独立行政法人国立国際医療研究センター肝炎情報センター調べ)。肝炎ウイルスは血液を介して感染します。輸血あるいは血液製剤などの医療行為や注射器の共有などが主な感染原因として挙げられ、社会的問題となっています。肝臓がんは、こうしたウイルス肝炎の終末的な形として発生しています。

肝臓がんの治療法には、外科的切除や肝動脈塞栓術など、さまざまな手段があります。2007年頃から、再発性や進行性肝臓がんに対して分子標的薬が使われるようになりました。しかし、そうした治療を行なっても肝臓がんの生命予後は依然として悪く、肝臓がんの分子機構の解明による新たな治療法や予防法の開発が強く望まれています。

近年のDNA解読技術の飛躍的な進歩に伴い、次世代シーケンサーを用いて、さまざまなタイプのがんについて、ゲノム異常を包括的に明らかにすることが可能になってきました。がんはゲノム異常が蓄積することで発生し進行する“ゲノムの病気”であり、世界中でがんのゲノムシーケンス解析が精力的に行われています。国際協力の下、50種類のがんで起こっているゲノム異常の全貌解明とカタログ化を進めることを目的に、2008年に結成されたのが「国際がんゲノムコンソーシアム (ICGC)」です。日本では、医薬基盤研究所と理化学研究所の支援の下、国立がん研究センター並びに理化学研究所の研究チームが、肝炎ウイルス関連の肝臓がんの全ゲノム解読解析を進めています。

2. 研究手法と成果

今回共同研究グループは、5つの肝臓がんの専門医療機関^{*9}と共同で、25人の患者から27例の肝臓がん (B型肝炎関連11例、C型肝炎関連14例、非肝炎型2例) のサンプルを収集し、その腫瘍のDNAおよび同一患者の白血球からの正常DNAについて、全ゲノム (約30億塩基対) シーケンス解析を行いました。これは、がん特異的なゲノム異常を包括的に検索する手法です。そのデータ総量は約7兆個もの配列情報となり、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータ

一を駆使してデータを解析しました。その結果、ゲノム異常の数は、肝臓がん1症例あたり平均で点突然変異が約11,000カ所、染色体構造異常が21カ所起きている事が明らかになりました。

27例の腫瘍のうち2例（B型肝炎関連1例、C型肝炎関連1例）は、明らかに他の25症例と異なるゲノム異常を示し、そのうち1例にはDNA修復酵素MLH1遺伝子の変異が認められました。残り25例のうち4例は、肝臓内に2個の腫瘍を持つ患者（2名）から採取された多中心性腫瘍^{*10}で、それら4例の塩基配列を比較した結果、同じ患者さんの同じ肝臓から発生したがんにもかかわらず、全く異なるゲノム異常を有していることがわかりました。一方で、全ゲノムレベルで塩基が置換されたパターンに着目し、明らかに異なるゲノム異常を示した上記2例を除いた25例の腫瘍を比較したところ、肝炎ウイルスの種類や飲酒の習慣の有無とパターンが有意に関連していることがわかりました。興味深いことに、同一の発がん要因に暴露していると考えられる多中心性腫瘍の塩基置換パターンは極めて類似していました（図1）。以上から、全体として肝臓がんは非常に多様なゲノム異常を示す一方で、個々のがんゲノムの塩基置換パターンは、がんの発生要因となる肝炎ウイルスや飲酒の影響を受けることがわかりました。

次に、27例の肝臓がんゲノム異常を起こした遺伝子リストを作成して統計的な検討を行なった結果、*ARID1A*、*ARID1B*、*ARID2*、*MLL*、*MLL3*などクロマチン制御に関わる10個の遺伝子が16例（約60%）の症例において遺伝子変異が起きていることが明らかになりました（図2）。肝臓がん細胞株を用いた実験により、それらの多くは肝臓がん細胞の増殖を抑制する機能を有していることもわかりました。B型肝炎ウイルスは、ウイルスゲノムが肝細胞のゲノムに入り込む（インテグレーションと呼ばれる）ことで、肝臓がんの発生に関与すると考えられています。今回解析した11例のB型肝炎関連の肝臓がんのうち、4例でテロメラーゼ遺伝子*TERT*周辺にB型肝炎ウイルスのゲノムが挿入されていることがわかりました。テロメラーゼは、染色体末端の構造を維持し、細胞の不死化に重要な働きをしており、B型肝炎ウイルスゲノムの*TERT*周辺への挿入が、B型肝炎関連の肝臓がんの発がんに関与する可能性が考えられました。

3. 今後の期待

今回の研究結果から、ウイルス性に限っても、肝臓がんのゲノム変異は非常に多様であることがわかりました。一方で約60%の肝臓がんゲノムでクロマチン制御機構の異常が認められたことから、これを標的とした新たな治療法や予防法を開発できる可能性があります。また、個々の肝臓がん症例においては、分子標的治療の標的となりうるゲノム変異がリン酸化酵素（キナーゼ）を含めて複数同定されています。今後、さらに解析数を増やしていくことで、腫瘍の変異情報に基づいた肝臓がんの個別化医療を展開できる可能性があります。

2012年3月の時点で、ICGCでは47個のがんゲノムに関するプロジェクトが進行中であり、3,500症例以上の塩基配列の解析データが一般に公開されています（<http://www.icgc.org/>）。日本の肝臓がんに関するゲノムプロジェクトについては、現在77例の肝臓がんの全塩基配列の解析データをICGCで公開しており、今後さらに解析数を増やしていく予定です。

原論文情報：

Akihiro Fujimoto, Yasushi Totoki, Tetsuo Abe, Keith A Boroevich, Fumie Hosoda, Ha Hai Nguyen, Masayuki Aoki, Naoya Hoshono, Michiaki Kubo, Fuyuki Miya, Yasuhito Arai, Hiroyuki Takahashi, Takuya Shirakihara, Masao Nagasaki, Tetsuo Shibuya, Kaoru Nakano, Kumiko Watanabe-Makino, Hiroko Tanaka, Hiromi Nakamura, Jun Kusuda, Hidenori Ojima, Kazuaki Shimada, Takuji Okusaka, Masaki Ueno, Yoshinobu Shigekawa, Yoshiiku Kawakami, Koji Arihiro, Hideki Ohdan, Kunihito Gotoh, Osamu Ishikawa, Shun-ichi Ariizumi, Masakazu Yamamoto, Terumasa Yamada, Kazuaki Chayama, Tomoo Kosuge, Hiroki Yamaue, Naoyuki Kamatani, Satoru Miyano, Hitoshi Nakagama, Yusuke Nakamura, Tatsuhiko Tsunoda, Tatsuhiro Shibata, and Hidewaki Nakagawa

“Whole Genome Sequencing of Liver Cancers Identifies Etiological Influences on Mutation Patterns and Recurrent Mutations in Chromatin Regulators” *Nature Genetics*, 2012. doi

<報道担当・問い合わせ先>

(問い合わせ先)

独立行政法人国立がん研究センター

がんゲノミクス研究分野

分野長 柴田 龍弘 (しばた たつひろ)

Email: tashibata@ncc.go.jp

TEL : 03-3542-2511 (内線 3123)

FAX : 03-3547-5137

独立行政法人理化学研究所ゲノム医科学研究センター

バイオマーカー探索・開発チーム

チームリーダー 中川 英刀 (なかがわ ひでわき)

Email: hidewaki@ims.tokyo-u.ac.jp

TEL : 03-5449-5786 FAX : 03-5449-5785

横浜研究推進部 企画課

TEL : 045-503-9117 FAX : 045-503-9113

(報道担当)

独立行政法人国立がん研究センター 広報室

TEL : 03-3542-2511 (代表) FAX : 03-3542-2545

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

TEL : 048-467-9272 FAX : 048-462-4715

独立行政法人医薬基盤研究所

研究振興部 研究推進課 課長

江野 英夫

Email: eno@nibio.go.jp

<補足説明>

※1 国際がんゲノムコンソーシアム(ICGC)

2008年に発足。重要な50種類のがんを選定し、それらについてゲノム変異の包括的なカタログを作成するため、メンバー機関間の調整を行う組織。ICGCのメンバーは、ICGCの定めたデータ収集・解析に関する共通基準に従い、特定のがんに関する各種ゲノム変異の包括的かつ高精度な解析を分担する。得られたデータは、全世界の研究コミュニティに対して、迅速かつ無償で提供される。ICGCは、ICGCが生み出す直接の1次データに対して特許やその他の知的所有権を主張しない。2012年3月時点で、14カ国とEUの組織が参画し、47個のプロジェクトが遂行されている。

※2 B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス

日本では、B型肝炎ウイルスで約100万人、C型肝炎ウイルスで150~200万人もの持続感染者がいると推測されている。世界では、慢性B型肝炎の患者数は約3億5,000万人、C型慢性肝炎の患者数は約1億7,000万人に上っており、世界的に極めて重大な健康リスクとなっている。

※3 次世代シーケンサー

2003年のヒトゲノム計画終了後、ヒトゲノムの配列30億塩基対を1,000ドル以下のコストで解読すべく、欧米の政府や企業は技術開発を行ってきた。通常のサンガーシーケンス法と比べて、超大量のDNAシーケンス反応を並列して行う技術であり、現在の第2世代の場合、12日間で約6,000億個の塩基配列を解読することができる(ヒトゲノム6人分をカバー)。さらに、現在開発中の第3世代の場合、高速で一分子シーケンスも可能であり、1日で個人のゲノム解読が可能になりつつある。

※4 点突然変異

ゲノム上の塩基配列の1個~数個が入れ変わったり、抜けたり、挿入されたりする変異。

※5 染色体構造異常

ゲノム上の塩基配列の1個~数個が変異する点突然変異に対して、数百から数千万塩基にわたって、通常2コピーある配列が1コピーになったり(コピー数異常)、別の染色体部位に位置が変わったり(転座)、方向が入れ替わったり(逆位)など、染色体レベルで大きく塩基配列が変化する異常。

※7 クロマチン制御

高等生物のDNAはヒストンというタンパク質と複合体を形成してクロマチン高次構造をとり、その複合体の形成や構造変化を通して、RNAへの転写やDNA複製を制御している。DNAのメチル化やヒストンの化学的修飾、他にさまざまなタンパク質との複合体形成によってクロマチン構造の開閉が行われる。この現象をDNAの配列情報であるゲノムとの対比で、エピゲノムと呼ぶ。

※8 テロメラーゼ TERT

染色体末端(テロメア)の反復配列を伸長させる酵素。5番染色体に位置する *TERT(telomere reverse transcriptase)* 遺伝子は、テロメラーゼの逆転写酵素活性を持つ触媒サブユニットをコードしている。テロメラーゼ活性が低い細胞は、細胞分裂ごとにテロメアの短縮が進み、やがて細胞分裂の停止が起きる。一方、がん細胞、生殖細胞、幹細胞では、高いテロメラーゼの活性が認められ、それらの細胞が分裂を継続できる性質に関与している。

※9 共同研究を行った肝臓がんの専門医療機関

国立がん研究センター中央病院（小菅 智男副院長）

和歌山県立医科大学第2外科（山上 裕機教授）

広島大学医学部消化器内科（茶山 一彰教授）

大阪府立成人病センター（石川 治院長）

東京女子医大消化器外科（山本 雅一教授）

※10 多中心性腫瘍

肝臓がんは、肝硬変などの非常に強い発がんの危険のある肝臓では、転移ではなく、独立した肝臓がんが同時性または異時性に多発することが知られている。

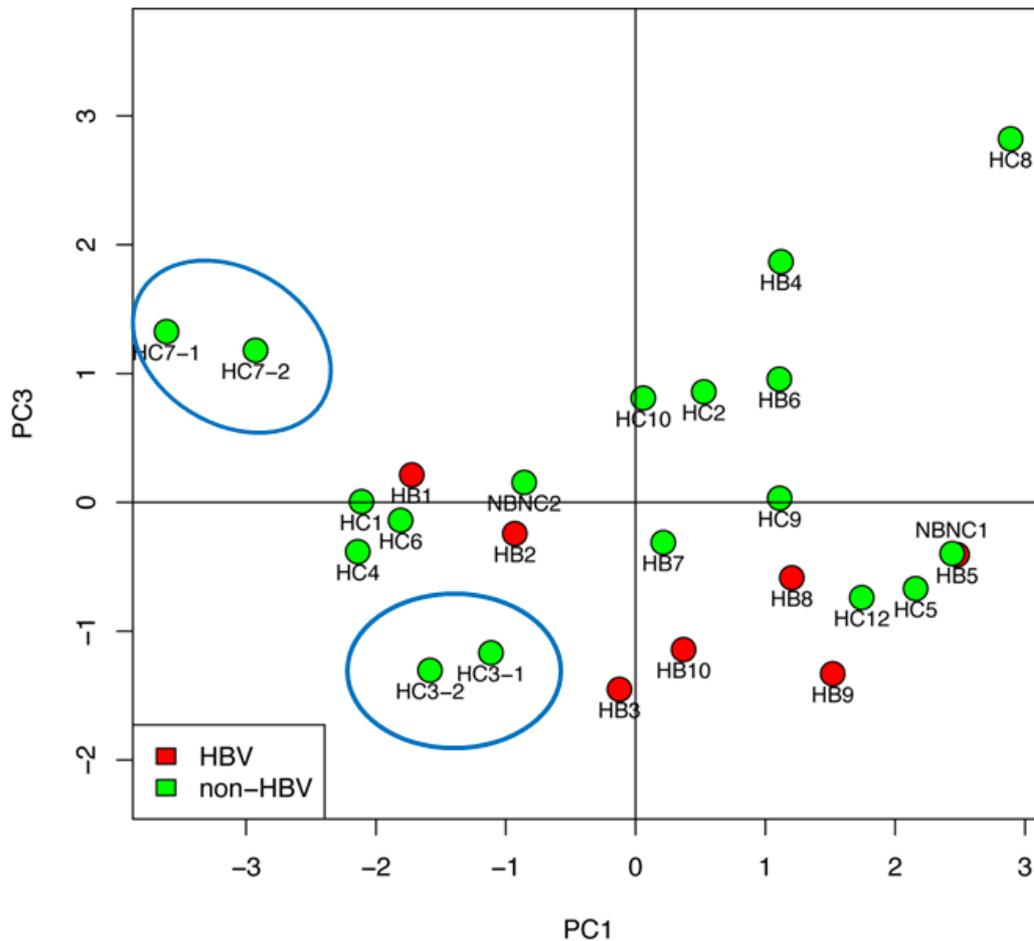


図1 塩基置換パターンに基づく、肝臓がんのゲノム全体でみた変異の類似状況

収集した27例のうち2例（B型肝炎関連1例、C型肝炎関連1例）は、他の25症例と明らかに異なるゲノム異常を示していたので事前に排除し、23人の患者25例（内2人の患者は2例の腫瘍を持つ）について塩基置換パターンについて解析を行った。

B型肝炎関連のうち3例（HB4、HB6、HB7）には、B型肝炎ウイルスの挿入は見られなかった。また、同じ患者由来の多中心性腫瘍（青丸）では、塩基が置換されたパターンは酷似している。

HB：B型肝炎関連、HC：C型肝炎関連、NBNC：非肝炎型

HBV：B型肝炎ウイルスゲノムの挿入がある肝臓がん（赤丸）

non-HBV：B型肝炎ウイルスゲノムの挿入がない肝臓がん（緑丸）

クロマチン制御遺伝子

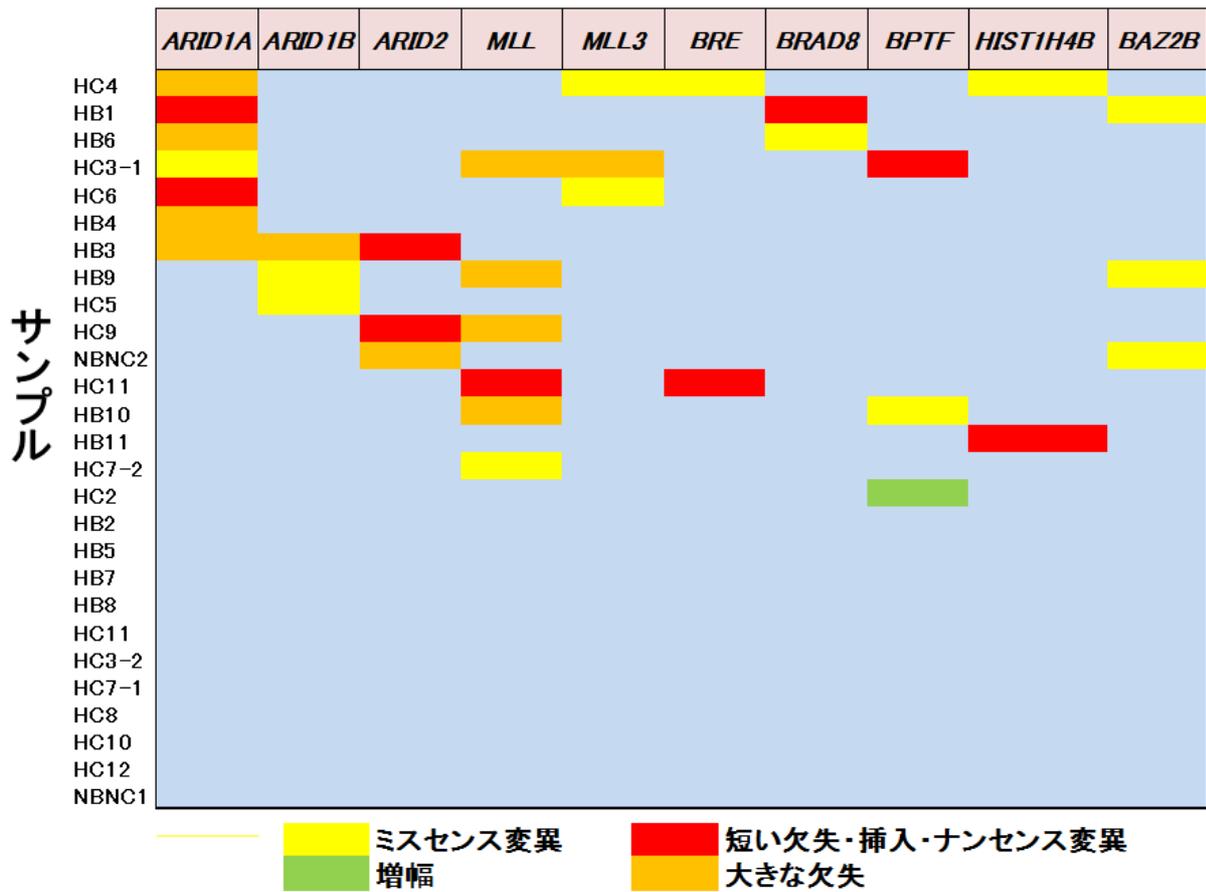


図 2 27 例の肝臓がんのクロマチン制御遺伝子の変異の有無

およそ 60%の肝臓がんで、なんらかのクロマチン制御遺伝子の変異が認められる。

ミスセンス変異：ゲノム変異の結果、タンパク質のアミノ酸配列が変化する

短い欠失・挿入・ナンセンス変異：ゲノム変異の結果、タンパク質が短くなる

増幅：ゲノム上で本来のコピー数以上に増加すること

大きな欠失：ゲノム配列の大部分が欠損する