

博士論文

肝細胞がんにおける網羅的ゲノム解析

山本 尚吾

博士論文

肝細胞がんにおける網羅的ゲノム解析

山本 尚吾

# 目次

要旨.....	1
序文.....	2
1 章. 肝細胞がんゲノムコピー数解析.....	4
1-1 背景.....	4
1-2 目的.....	4
1-3 材料と方法.....	5
HCC サンプル.....	5
ゲノムDNA抽出および SNP アレイ解析.....	7
ゲノムコピー数解析.....	7
蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション.....	9
1-4 結果.....	10
GIM 解析.....	10
ゲノムコピー数変化領域の全体像.....	12
肝細胞がんの進行におけるゲノム不均衡領域の同定.....	15
1-5 考察.....	17
2 章. 統合的オミクス解析による、肝細胞がんの進展に関する研究.....	20
2-1 背景.....	20
2-2 目的.....	20
2-3 材料と方法.....	21
材料.....	21
方法.....	23
2-4 結果.....	28
患者/サンプル情報とシーケンス解析統計.....	28
発現プロファイル、ゲノムコピー数、主な遺伝子変異.....	28
HCC の進展に伴う遺伝子変異.....	35
染色体コピー数変化による early HCC/overt HCC の判定.....	35
Wnt 標的遺伝子の活性化.....	38
p53/RB 経路下流の細胞周期遺伝子の活性化.....	43
TERT 遺伝子の異常な過剰発現.....	46
DNA のメチル化プロファイリングによる HCC の分類.....	49
2-5 考察.....	54
2-6 結論.....	58
参考文献.....	60
謝辞.....	65

# 要旨

肝細胞がんは、世界のがん関連死因の第4位（2018年、日本では5位）と死亡率が高く、外科的治療以外の治療法の選択肢が限られている。肝細胞がん（Hepatocellular Carcinoma, HCC）の腫瘍進化を研究するため、早期肝細胞がん（early HCC）と古典的肝細胞がん（overt HCC）について、SNPアレイを用いたゲノムコピー数解析を行った。ゲノムコピー数解析から、早期に変化する染色体（1q増幅、1p, 17p欠失）と、進行に伴いコピー数が増加する染色体領域（5q, 8q増幅, 4q, 8p欠失）が見いだされ、段階的に変化する腫瘍進化においても重要な因子であることが示唆された。

さらに、全エクソン解析、トランスクリプトーム解析、DNAメチル化プロファイルの網羅的統合解析を行った。遺伝子変異プロファイルとしては、*TERT*, *CTNNB1*, *TP53*の遺伝子異常は早期の時点で overt HCC と同程度の高頻度で観察されたが、遺伝子発現レベルでは、early HCC は overt HCC とは別のプロファイルを示した。*CTNNB1* 変異によって overt HCC で発現誘導される下流遺伝子群は、early HCC のバルク組織でのトランスクリプトーム解析では発現亢進しておらず、また *CTNNB1* タンパク質の核内移行も認められなかった。さらに SWI/SNF 複合体や mTOR/AKT/PI3K パスウェイの early HCC における遺伝子変異は overt HCC に比べ有意に頻度が低いことから、これらのパスウェイやエピゲノム制御の変化を伴う遺伝子発現の変化が、肝細胞がんの進展の一端を担っていることが示唆された。

# 序文

がんは、DNA の複製異常や様々な環境要因により遺伝子変異などのゲノム異常が蓄積し、細胞の不死化、増殖や浸潤・転移といった細胞生存に有利な形質を獲得し、すなわち細胞のがん化が起こり、異常増殖したがん細胞が臓器を侵すことで個体の生存を脅かす疾患である 1980 年代には、がん遺伝子の活性化、あるいはがん抑制遺伝子の欠失などによる不活性化が細胞のがん化の原因であることが報告され、また複数の遺伝子異常の段階的な蓄積が、がんの発生に関与することが報告されてきた。その後、1990 年にヒトゲノムプロジェクトが開始され、約 10 年後の 2000 年にヒトゲノム配列のドラフト版が公開された。さらにその僅か数年後の 2003 年にはヒトゲノム解読の完了が国際的に宣言された(1)。ヒトゲノムプロジェクトの恩恵により 1990 年代後半に開発されたマイクロアレイ技術では、ほぼ全ての配列既知の遺伝子発現量を網羅的に測定できるようになった。次いで SNP ジェノタイピングアレイが登場するなど、遺伝子測定技術の進展が急速に進んだ。

東京大学先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス分野 油谷浩幸研究室は、日本国内で最も早くからがんの網羅的遺伝子解析に取り組んできた研究室の一つである。大学病院や病理学教室との幅広い連携体制により、長年に渡り様々ながん種に関する臨床がん組織の分子生物学的解析を推進し、がんの分子メカニズムの一端を解明してきた。解析技術においても、がん染色体コピー数変化を SNP アレイを用いて高解像度かつアレルを区別して測定可能な手法を開発してきた。さらに 2010 年前後に普及した次世代シーケンサーは、急速な技術進展により指数関数的に解析コスト低下および配列解読能を向上させ、生命科学は大型計算機を駆使する情報科学へとパラダイムシフトを遂げた。

マイクロアレイや次世代シーケンサーといった新しい技術は積極的にがんゲノム解析に利用さ

れ、TCGA、ICGC といったコンソーシアムや世界中の研究室で系統的ながんゲノムの解析を進められた。油谷研究室でも様々ながん種のゲノム解析を精力的に進められ、肝細胞がんはその一つである。

本論文では、早期肝細胞がん (early HCC) および古典的肝細胞がん (overt HCC) に関して行った SNP アレイを用いたゲノムコピー数解析 (1 章) (2)(3)、および次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析を中心とした統合オミクス解析 (2 章) (4)の、大きく 2 つの研究について述べる。

# 1 章. 肝細胞がんゲノムコピー数解析

## 1-1 背景

肝細胞がんは、世界のがん関連死因の第4位（2018年、同年日本では5位）と死亡率が高く、外科的治療以外の治療法の選択肢が限られていることから、有効な分子治療標的の探索が求められている。肝細胞がんの主な発生要因としては、アフリカやアジア諸国では肝炎ウイルスの持続感染による慢性肝炎・肝硬変、欧米諸国では、慢性的なアルコール乱用により生じた慢性肝疾患を背景に、炎症と再生が長い年月繰り返されることで肝細胞の遺伝子変異が蓄積した結果、肝細胞がんが生じると考えられている。近年は、非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease:NAFLD） 或いは病態が進行した非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis:NASH） が肝細胞がんの原因であるとする疫学的報告が増えている(5)。

本章では、SNP アレイを用いた肝細胞がん（Hepatocellular Carcinoma; HCC） のゲノムコピー数解析により、HCC のゲノム変化のプロファイルから高頻度の染色体変化部位を同定し、肝細胞がんにおけるゲノムコピー数変化の特徴について述べる。特に、早期肝細胞がん（early HCC） と古典的肝細胞がん（overt HCC） を調べることで、肝細胞がんの多段階の進展における逐次的なゲノム変化を明らかにする。

## 1-2 目的

早期肝細胞がん（early HCC） と古典的肝がん（overt HCC）、および結節内結節（Nodule-in-Nodule; NIN） タイプ肝細胞がん（NIN HCC） について SNP アレイを用いた Genome Imbalance Map (GIM)法(6)によるゲノムコピー数解析を行い、肝細胞がんの発生と進行、すなわち慢性肝疾患

から early HCC、更に overt HCC への進展に関連する特徴的ゲノム領域を明らかにすることを目的とする。

## 1-3 材料と方法

### HCC サンプル

本研究で解析された症例は、東京大学大学病院 肝胆膵外科で肝切除術を受けた患者様より、本研究への参加にインフォームドコンセントの上でサンプル提供の同意を得られたものである。

解析に用いた肝細胞がんの手術標本および末梢血は、外科の緑川泰医師（現日本大学医学部消化器外科）により、切除後直ちに小片に切断され液体窒素中でスナップ冷凍し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存された。

44名の患者から得られた HCC サンプルは、NIN が 5 例（この内 2 症例では内結節を 2 個認めた）、early HCC が 14 例、overt HCC が 25 例であった。原発性腫瘍 51 例と末梢血検体 44 例について SNP アレイ解析を実施した。切除標本の組織学的所見に基づく臨床因子と腫瘍状態を表 1-1 にまとめた。



表1-1. 44名の患者から得られたHCCサンプルの臨床情報

Sample no.	Age (y)	Gender	Liver	Hepatitis virus	Histology	Size (mm)	fc	sf	vv	vp	b	s
54	63	M	CH	HC	eHCC/MD	20	-	+	-	-	-	-
325	74	M	LC	HC	eHCC/MD	39	-	+	-	-	-	-
326	74	M	LC	HC	eHCC/MD	12	-	+	-	-	-	-
351	72	M	LC	HC	eHCC/PD	35	-	+	-	-	-	-
352	64	F	CH	HC	eHCC/MD	28	-	+	-	-	-	-
7	77	F	CH	HC	eHCC	13	-	-	-	-	-	-
27	65	M	CH	HC	eHCC	12	-	-	-	-	-	-
35	75	M	LC	HC	eHCC	23	-	-	-	-	-	-
49	68	F	LC	HB	eHCC	25	-	-	-	-	-	-
50	60	M	CH	HC	eHCC	15	-	-	-	-	-	-
58	67	F	LC	HC	eHCC	7	-	-	-	-	-	-
65	70	M	LC	HC	eHCC	34	-	-	-	-	-	-
167	56	M	LC	HB	eHCC	35	-	-	-	-	-	-
172	53	F	CH	HB	eHCC	13	-	-	-	-	-	-
199	79	F	LC	HC	eHCC	13	-	-	-	-	-	-
329	55	M	LC	HC	eHCC	12	-	-	-	-	-	-
337	71	F	LC	HC	eHCC	10	-	-	-	-	-	-
362	70	M	CH	HC	eHCC	8	-	-	-	-	-	-
380	65	M	LC	HC	eHCC	25	-	-	-	-	-	-
48	58	M	CH	HB	MD	75	+	-	-	-	-	-
53	73	F	CH	HC	MD	43	+	-	-	-	-	-
67	60	F	LC	HB	MD	71	+	+	+	+	-	-
72	66	M	LC	HC	WD	32	+	-	-	-	-	-
94	74	F	LC	HC	WD	30	+	-	-	-	-	-
130	68	M	CH	HB	MD	26	+	-	-	-	-	-
145	47	M	LC	HB	MD	77	-	-	+	+	-	-
148	82	M	CH	nBnC	MD	100	+	+	+	+	-	-
168	32	M	CH	HB	MD	85	+	+	+	+	-	-
175	68	M	CH	HB	MD	50	+	+	-	-	-	-
176	67	M	CH	HB	PD	15	+	-	-	-	-	-
181	70	M	CH	HB	WD	28	+	-	-	-	-	-
186	68	M	CH	HC	MD	22	+	-	-	-	-	-
189	58	M	LC	HB	MD	60	+	+	-	-	-	-
317	66	M	LC	HC	MD	15	+	+	-	-	-	-
333	52	M	LC	nBnC	MD	35	+	+	-	-	-	-
358	52	M	CH	HB	MD	43	+	+	-	-	-	-
359	51	M	LC	HC	PD	70	+	+	-	-	-	-
360	66	M	CH	HC	MD	70	+	+	-	-	-	-
363	64	M	CH	HB	PD	100	+	+	-	+	-	-
364	74	M	LC	HC	MD	40	+	+	-	-	-	-
365	71	F	LC	HC	MD	65	+	-	-	+	-	-
367	72	M	LC	HC	MD	80	+	-	-	+	-	-
376	57	M	CH	HB	PD	120	+	+	-	+	-	-

略語. Size、腫瘍径；fc、カプセル形成；sf、中隔形成；vv、肝静脈内腫瘍血栓；vp、門脈内腫瘍血栓；b、胆管内腫瘍血栓；im、肝内転移；s、血清浸潤；M、男性；F、女性；CH、慢性肝炎；LC、肝硬変；HB、B型肝炎ウイルス；HC、C型肝炎ウイルス；nBnC、B型C型肝炎ウイルス非感染；WD、高分化HCC；MD、中分化HCC；PD、低分化HCC

## ゲノム DNA 抽出および SNP アレイ解析

ゲノム DNA は、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて、製造元の手順書に従い腫瘍組織または末梢血リンパ球ペレットから単離した。HCC および正常サンプルから抽出したゲノム DNA は、Human Mapping 10K Array XbaI 131 および Human Mapping 50K Array XbaI 131 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いてメーカー実験手順に従いハイブリダイゼーションを行い、GeneChip Scanner 3000 により蛍光強度を測定した。(図 1 - 1)

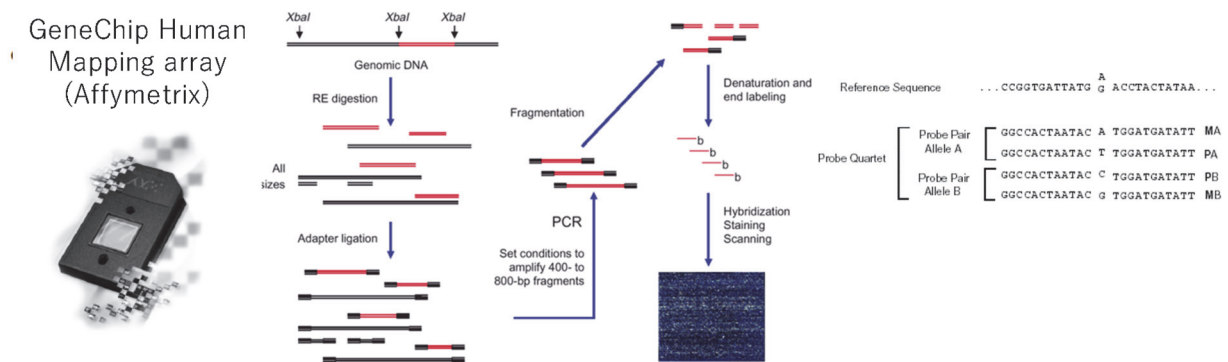


図 1 - 1. SNP タイピングアレイによるコピー数解析の原理

がん、正常それぞれから抽出されたゲノム DNA を酵素で断片化し、SNP アレイにより各 SNP 部位の蛍光強度を測定する。がん部と正常部のそれぞれから得られるシグナル強度を比較することで、がん部で生じたゲノムコピー数変化を測定することができる。

## ゲノムコピー数解析

SNP アレイから得られた HCC と正常 DNA の蛍光シグナル値に GIM アルゴリズムを適用した(6)。各 SNP 遺伝子座の完全一致 (PM) プローブから、最高値と最低値を省略した後の中央値を取り、

がんサンプルとペア正常サンプルからの生のシグナル強度の間のシグナル強度比を計算する。次に、生の比率を期待される比率で割った調整比率を算出する。期待比は、例えば、XbaI フラグメントの長さ、XbaI フラグメントの GC の割合、局所的な GC 含有量、25-mer プローブ配列のハイブリダイゼーション自由エネルギー、コントロールサンプルからの PM プローブのシグナル強度のゲノム平均値などのいくつかのパラメータを実験ごとに調整することによって算出される。高解像度 GIM 解析により、アレル別にゲノムコピー数変化が生じた領域を正確に決定することができる。

(図 1 - 2)

$$\text{Expected ratio} = a + \sum (b_k x_k + c_k x_k^2 + d_k x_k^3)$$

$x_1$  : XbaI fragment の長さ (bp)

$x_2$  : XbaI fragment のGC%

$x_3$  : 局所GC% (XbaI fragmentの中の100bp枠の最大GC%)

$x_4$  : 25mer probe 配列の自由エネルギー (kcal/mol)

$x_5$  : 正常サンプルのSignal値の幾何平均 ( $\log_{10}$  scaled)

Ishikawa S et. al. BBRC (2005)

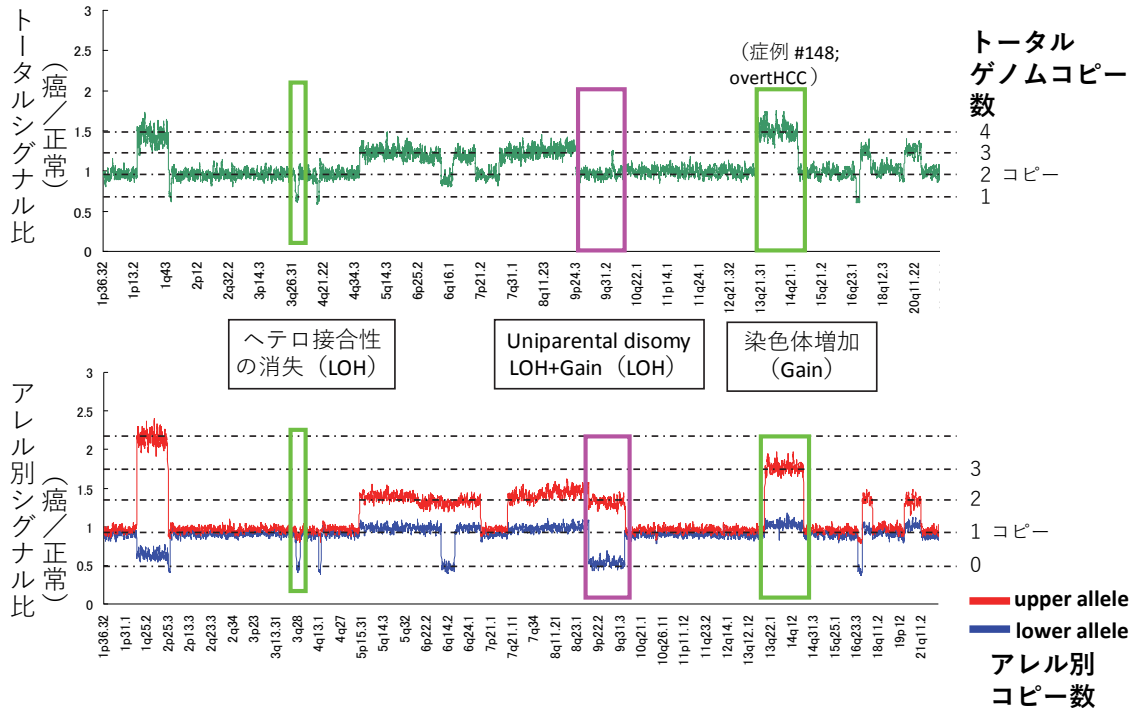


図1-2. SNPアレイを用いたがんゲノムコピー数解析 Genome Imbalance Map (GIM) 法と解析例. SNPアレイから得られたSignal値をモデル化された複数パラメータで傾向補正する(上図)ことにより、ノイズが軽減されたがん・正常の比から、アレル別ゲノムコピー数変化を得ることができる(下図)

## 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション

凍結肝がんおよび背景肝組織をマイクロ波支援蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 解析

に使用した。ヒト BAC ライブラリから 1q21 の RP11-338C15 (ATF3)、1q31-41 の RP11-335O13

(ミオジェニン)、1q21 の RP11-462C5、1q21 の RP11-263K19 (MUC1)、1q25.2 の RP5-973M2

(PTGS2)、および 8p23.2 の RP11-140K14 (CSMD1) の領域を含む 5 つのゲノムクローンを得

た。がん細胞および肝細胞における FISH シグナルをスコア化した。シグナルは、フォーカスを調

整して核全体に重なっているものや欠落しているものを除外するために手動でカウントされた値を用いた。

## 1 - 4 結果

### GIM 解析

44 名の HCC 患者より切除した原発性腫瘍 51 サンプルと末梢血 44 検体について 50K の XbaI SNP アレイを用いた GIM 法によるゲノムコピー数解析を行い、各サンプルについてアレル別コピー数解析結果が得られた。結節内結節を認める HCC 症例における GIM 解析結果の例を図 1 - 3 に示す。緑のボックスで示すように、GIM はこの患者の外側結節において 1q21.2-qter と 17q21.32-qter のゲインを示した。下部。同じ患者の内側結節 (overt HCC) の対立遺伝子用量解析。1q21.2-qter と 17q21.32-qter の獲得に加え、8p32.2-11.21、18q12.3-22.1、21 番染色体、22 番染色体の LOH (黄色枠で示す) が GIM 解析で内側結節のみに認められた。

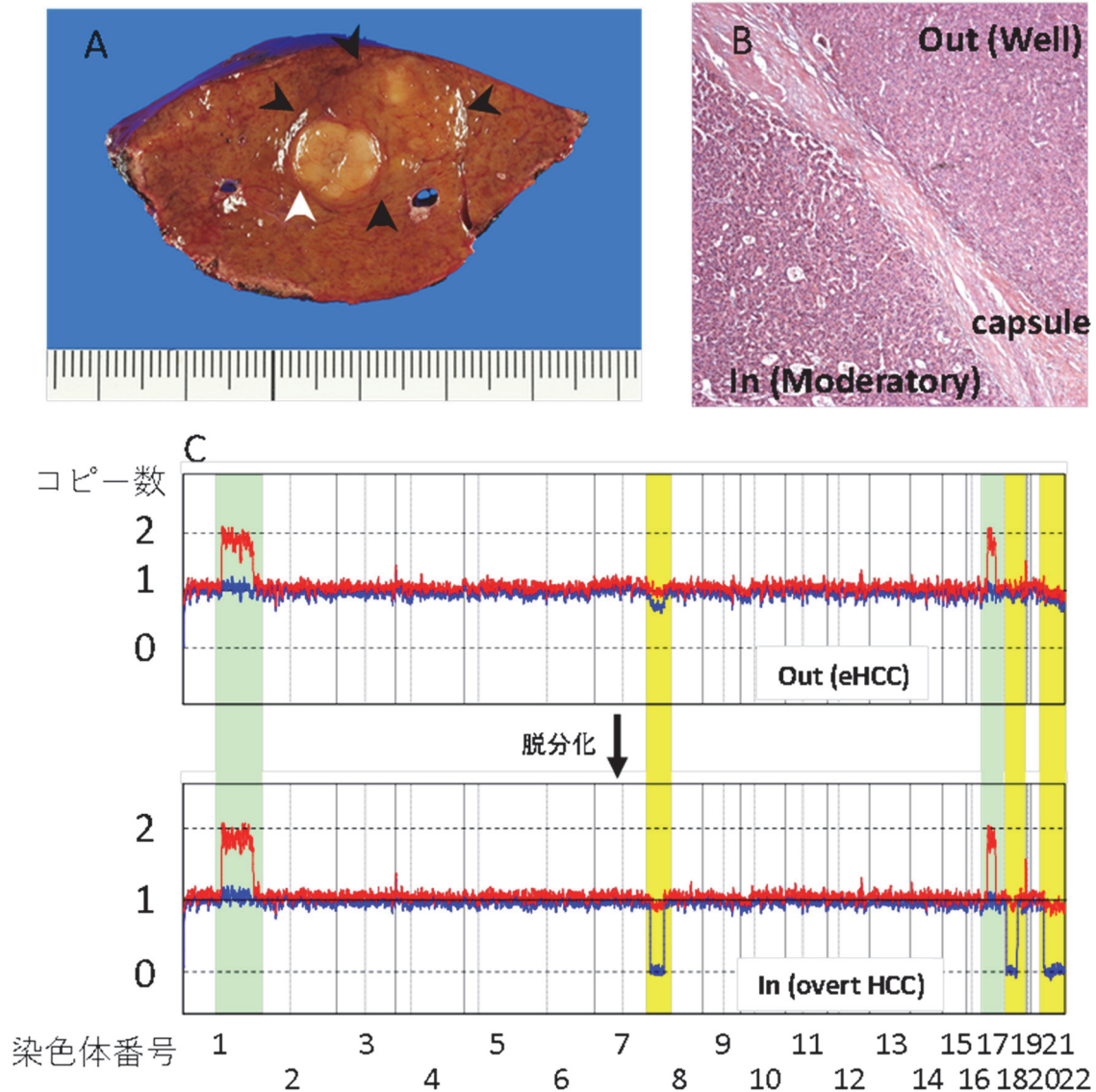


図1-3. 代表的な NIN サンプルの GIM。A. NIN を呈する HCC の肉眼所見。外側の結節の中にはカプセル形成を伴う内側の結節があり、病理学的には中分化型 HCC と診断された。黒矢印は外側結節、白矢印は内側結節を示す。B. NIN の組織学的所見。外側結節と内側結節は結合しており、内側結節のカプセルによって挟まれている。IN は内結節、MD は中分化型 HCC、Out は外結節、WD は well-differentiated HCC。C. 上：患者 5 の外側結節 (early HCC) の全ゲノムにわたる対立遺伝子量解析。

## ゲノムコピー数変化領域の全体像

GIM 解析の結果、NIN と 14 例の early HCC では、5 例の外側結節でも 1q21.3-44 (63%)、1p36.21-36.32 (36%)、17p13.1-13.3 (42%) の染色体異常が高頻度に認められた (図 1 - 4)。early HCC における 1q、1p、17p の染色体異常がバックグラウンドの肝臓ですでに発生しているかどうかを調べるために、すべてのがん組織とその周辺の非がん肝組織について、1q については FISH 解析、1p と 17p については SNP ベースの LOH 解析を用いて対立遺伝子の状態を評価した (図 1 - 5)。これらの解析により、1q 増幅を認めるがん組織 (図 1 - 5 B) と 1p および 17p 上の LOH (図 1 - 5 D) の対立遺伝子の状態が GIM データと一致していることが確認された。一方、1q (図 1 - 5 C) と 17p (図 1 - 5 D) では染色体変化は認められず、バックグラウンドの肝組織では 1p の LOH は 1 例のみであった。

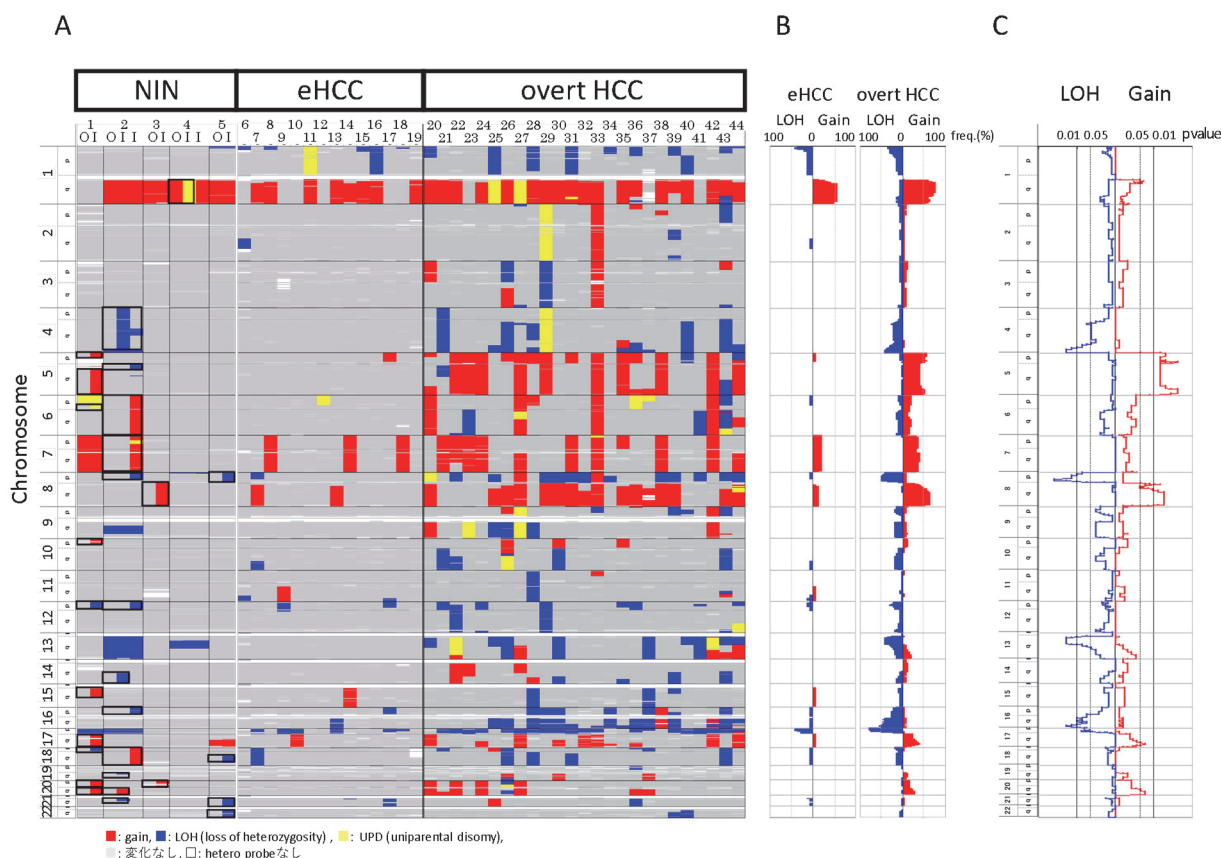


図 1-4. 肝細胞がんのゲノムコピー数変化領域の全体像

A. NIN, early HCC 及び overt HCC のゲノム変異の全体像。横方向に症例（上部に症例番号）、縦方向に染色体番号順に変異プロファイルを示す。赤は Gain、青は LOH、黄色は UPD (uniparental polysomy)、灰色は正常保持領域（変化なし）、白は hetero call の probe がないため情報のない領域をそれぞれ示す。同一症例の Outer-nodule に対して Inner-nodule で新たに加わったゲノムコピー数変化領域を実線の枠で示す。B. early HCC と overt HCC の各群の Gain 及び LOH の頻度を各染色体領域ごとに示す。C. early HCC と overt HCC 間での各染色体領域ごとに Fisher's exact test を行い、p-value をグラフで示す。



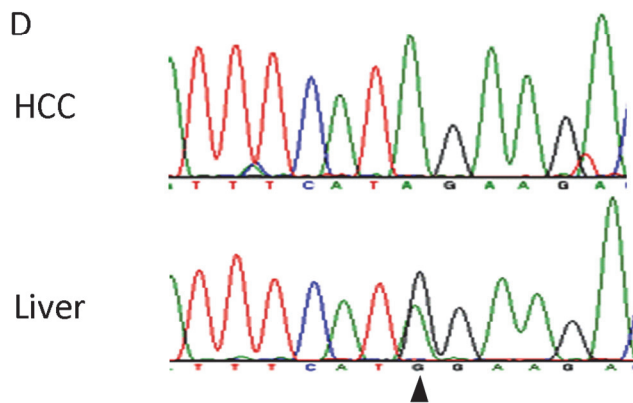
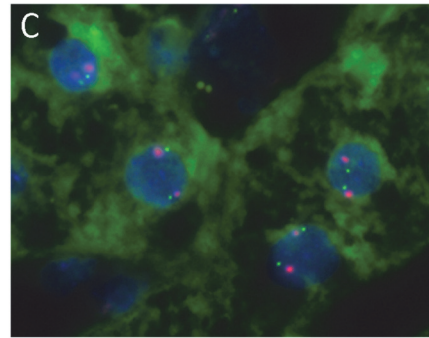
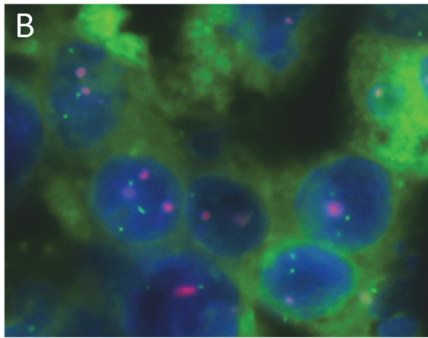
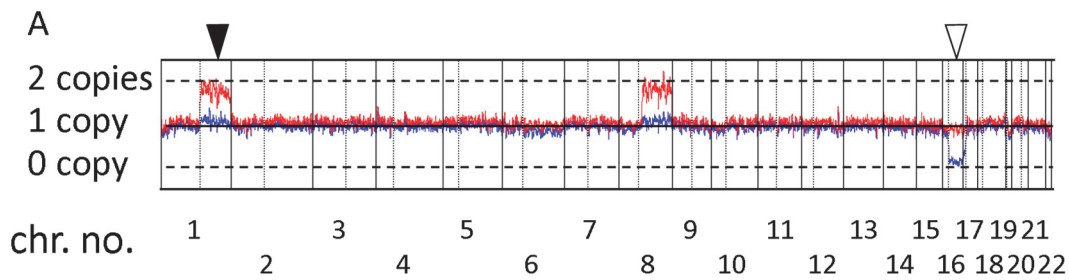


図1-5. 患者13 (early HCC) の対立遺伝子不均衡の検証。A. 1q および 8q のゲイン、16q および 17p アームの LOH を示す GIM。黒矢印は BAC クローン (1q21 については RP11-462C5) の位置を示し、白矢印は SNP 遺伝子座 (17p13.1 については rs10491091) の位置を示す。B,C. 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション分析は、肝がん細胞 (B) では 1q21 を表す 3 つの異なるシグナルを示したが、対応する背景肝 (C) では 2 組のシグナルを示した。緑、RP11-338C15 (1q21、ATF3)、オレンジ色、CEP1。D. rs10491091 のダイレクトシーケンシング法による SNP 塩基の LOH 解析 (A/G) は、HCC では 17p の LOH を示したが、同一患者から得られた背景肝では 17p のヘテロ接合性が保持されていた (矢印の部分、rs10491091)。

## 肝細胞がんの進行におけるゲノム不均衡領域の同定

肝細胞がんの進行における段階的な染色体異常を同定するために、NIN サンプルの外側結節の染色体変化と内側結節の染色体変化を比較した (図 1 - 3 C)。外側結節で見つかった染色体異常はすべて内側結節でも観察され、後者が前者から生じたものであることが示唆された (図 1 - 4 A)。

GIM 解析により、外側結節 5 個と内側結節 7 個の間で、15 個の染色体の増加と 10 個の染色体の LOH が確認された (図 1 - 4 A)。NIN で同定されたこれらの染色体座を独立変数として用いて、14 の early HCC と 25 の overt HCC について決定木解析を行った (図 1 - 6、図 1 - 7)。決定木解析では、進行中の 5q11.1-35.3、8q11.1-24.3、4q11-34.3、8p11.21-23.3 の染色体異常の組み合わせを特徴的な属性として抽出し、early HCC と overt HCC を再帰的に分類することができた (図 1 - 7 A)。HCC の進行に関連して決定木解析により染色体異常を推定したところ、5 倍のクロスバリデーションにより early HCC と overt HCC の分類精度は 86.8%であった。

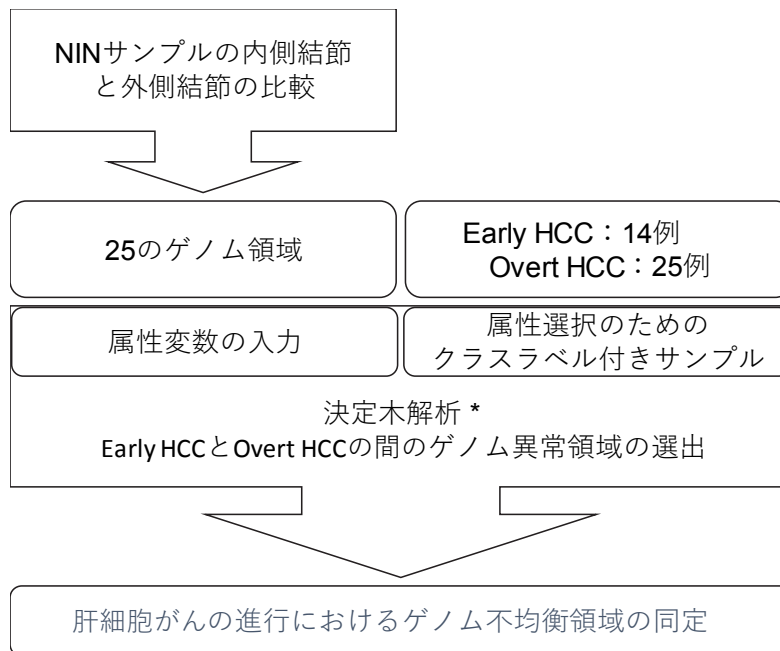


図 1 - 6. HCC 進行に関連するゲノム不均衡領域の同定フローチャート

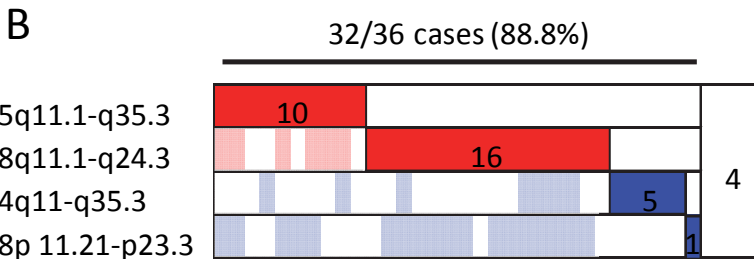
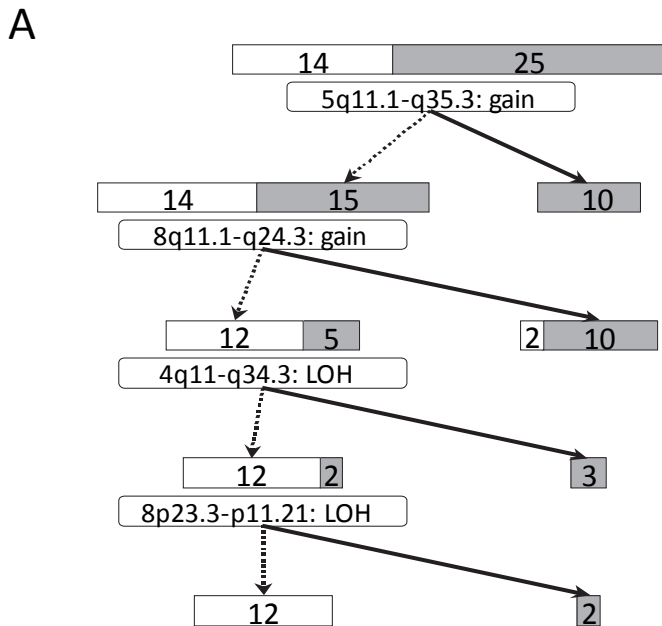


図 1 - 7. 決定木解析によるゲノム不均衡領域の同定結果

NIN 症例の out ⇒ in で染色体変異の認められた 20 領域について、early HCC と overt HCC 間の決定木解析を行い、5q11.1-35.3(gain), 8q11.1-24.3(gain), 4q11-34.3(LOH), 8p11.21-23.3(LOH) の 4 領域が選出された。(5-fold cross validation により 86.8%の正答率)

白枠 : early HCC、網掛 : overt HCC、各枠内の数字は症例数

Early HCC および overt HCC の分類のための決定木解析。A. 全 38 サンプル (early HCC 14 例と overt HCC 25 例) を初期データセットとして使用した。再帰的な分割が、overt HCC の濃縮されたグループを抽出するに従い、選出されたすべての特徴は、early HCC と overt HCC を区別する独立因子となる。例えば、サンプルの最初の分割では、5q11.1-35.3 の染色体増加により 14 個の early HCC と 25 個の overt HCC のサンプルから 10 個の overt HCC のサンプルが抽出される。各分割における early HCC および overt HCC のサンプル数は、それぞれ白と灰色のボックスで示す。分類に用いるコピー数変化が認められる場合は実線、変化がない場合は破線で示す。B. 先の研究でコピー数解析された独立の overt HCC 36 症例コホートのうち、32 症例 (89%) は、決定木解析によって抽出された 4 つの領域のうち 1 つ以上の染色体異常を有していた。列と行は、それぞれ組織サンプルと染色体領域を表し、各領域の染色体増加を赤、LOH を青で示す。

## 1-5 考察

early HCC では細胞異型はほとんど見られないが、本研究結果では early HCC のすべての症例にゲノムコピー数変化があることを示している。特に early HCC では 1q21.3-44 ゲインおよび 1p36.21-36.32 と 17p13.1-13.3 の LOH が高頻度に観察されたが、1p アームを有する 1 例を除くすべてのバックグラウンド肝組織では、FISH および SNP ベースの LOH 解析ではこれらの領域に変化は認められなかった。今回の研究で背景肝の 1q および 17p アームの染色体異常が認められなかったことは、肝硬変性肝や異形成性結節では 1q および 17p アームの対立遺伝子の変化は稀であるというこれまでの報告と一致している(7)(8)(9)。即ち、early HCC における 1q gain、1p LOH、17p LOH の染色体変化ががん化の開始に重要であると仮定できる。特に 1p には *ARID1A* や *MTOR*、17p には *TP53* などの広く知られた重要ながん抑制遺伝子が局在していることから、再現性をもって観察されるゲノムコピー数変化領域は、肝細胞がんの発がんや進展過程に大きく寄与していることが強く示唆される。

本研究では、腫瘍進行のモデルとして NIN を用いた。その結果、NIN サンプルの内側結節と外側結節を比較することで、肝細胞がんの脱分化に伴う連続的な染色体変化を同定することができた。このような染色体異常を一般化するために、再帰的分割解析を用いて決定木を作成したところ、5q11.1-35.3 と 8q11.1-24.3 で染色体増加、4q11-34.3 と 8p11.21-23.3 で LOH が認められ、高い分類精度で肝細胞がん進行の原因となる染色体座を絞り込むことができた。(図 1-8)

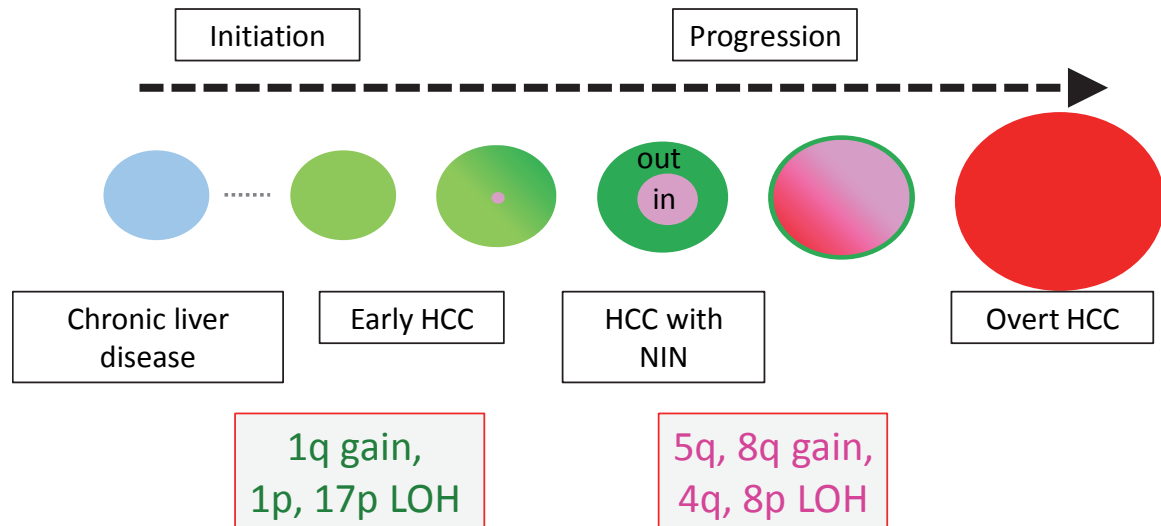


図1-8. 肝細胞がんの発がんと進展に関連する染色体のゲノムコピー数変化領域

決定木解析で同定されたこれら4つの染色体異常に加えて、フィッシャーの正確確率検定により、early HCC と overt HCC の間に有意差を持つ6つの染色体座が明らかになった ( $p < 0.05$ )。しかし、一変量解析ではこれらの染色体異常の関係を検出することはできず(10)、5q、8q、4q、8pの4つの染色体異常が独立して発生しており ( $p < 0.0001$  [ $\chi^2$  検定])、肝細胞がんの進行における遺伝的不均一性の高さを反映していることがわかった(11)。さらに、10K アレイを用いた先の研究(2)では、これら4つの領域を overt HCC の独立したセットに適用したところ、overt HCC の36症例のうち32症例(89%)の腫瘍が overt HCC として判定され、5q と 8q のゲインと 4q と 8p の LOH は、early HCC から overt HCC に進行したことで高頻度に発生していることが示唆された。

以上、NIN, early HCC, overt HCC について GIM 解析を行い肝細胞がんにおける染色体コピー数変化の全容を明らかにし、再帰的分割解析により肝細胞がんの発生と進行に関与する染色体の変化領域を絞り込むことで、肝細胞がんの進行に寄与するゲノム変化領域を示した。

しかしながら、染色体変化領域は単一遺伝子に比べて大きく、腫瘍細胞が獲得する生物学な性質を

分子・遺伝子レベルで理解するには、更なる詳細な測定が必要である。

## 2 章. 統合的オミクス解析による、肝細胞がんの進展に関する研究

### 2-1 背景

マイクロアレイという解析技術のブレークスルーは生物学の研究スタイルをデータ駆動型へと大きく変えたが、次世代シーケンサーの登場はさらなる衝撃で、その技術革新は 2008 年からの僅か 3 年で 100 倍のコスト低下とスループット改善をもたらし、個々の研究室レベルでがんゲノム配列解析が可能となった。同時に生命科学は大型計算機を駆使する情報科学へと変貌した。国立がんセンターとの共同研究で行った 1 症例の肝細胞がん全ゲノム解析(12)は、解析を始めた 2009 年から論文発表まで 2 年を要したが、その 2 年後の 2014 年には肝がん 500 症例の全エクソン解析について報告を行った(13)。全エクソン解析から、*TERT*のプロモーター変異が肝がん症例の 7 割と最も高頻度に異常が見られ、次いで *TP53* と Wnt シグナル伝達経路の遺伝子(*CTNNB1*, *AXIN1*)の変異がそれぞれ 3 割程度の頻度で見られた。他に、代謝酵素(*CYP2E1*, *ADH1B*)、クロマチンリモデリング因子(*ARID1A*, *ARID2*, *BRD7*)、および mTOR 経路の遺伝子(*TSC1*, *TSC2*)の変異が有意に認められた。大規模ゲノム解析プロジェクトでは複数のバイオインフォマティシャンが分担して解析を行うことが一般的であるが、著者は *TERT* 遺伝子の解析を担当し、プロモーター突然変異、遺伝子座の局所増幅、B 型肝炎ウイルスのゲノム組み込み、および *TERT* と別遺伝子の融合遺伝子が相互排他的に観察された。(13)

### 2-2 目的

1 章で解析した early HCC および overt HCC について全エクソン解析、DNA メチル化、トラン

スクリプトーム解析を統合的に行うことで、肝細胞がんの発生と進行、すなわち慢性肝疾患から early HCC、更に overt HCC への進展に関連するゲノム変化の特徴を明らかにすることを目的とする。

## 2-3 材料と方法

### 材料

本研究は、日本大学消化器外科で肝切除術を受けた肝硬変患者 160 名を対象とし、参加者から書面によるインフォームドコンセントを得て、日本大学の機関審査委員会の承認（プロトコール番号：131）を得て実施した（表 2-1）。すべての臨床調査はヘルシンキ宣言の原則に従って実施された。early HCC は、International Consensus Group for Hepatocellular Neoplasia (14)によって定義された基準に従って組織学的に決定された；52 症例の early HCC および 108 症例の overt HCC は、それぞれ 2 人の病理医によって early HCC または overt HCC と独立して診断された。HCC 160 サンプルに加えて、無作為に選ばれた 31 個の非がん部の背景肝サンプルを遺伝子発現解析およびメチル化解析のために使用した。手術標本は、肝臓切除後すぐに小片に切断し、液体窒素中でスナップ冷凍し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。



表 2 - 1 . 肝細胞がん症例の臨床的特徴

	Early HCC (n = 52)	Overt HCC (n = 108)	p value
Age, years (range)	70 (45-81)	68 (32-83)	0.137
Sex, male, n (%)	35 (67.3)	79 (73.1)	0.460
Viral hepatitis, n (%)			
non-B non-C	5 (9.6)	14 (12.9)	0.058
HB	7 (13.4)	31 (28.7)	
HC	40 (76.9)	63 (58.3)	
<i>Pathology</i>			
Differentiation grade, n(%)			
Very well	52 (100)	0	
Well	0	14 (12.9)	< 0.001
Moderate	0	86 (79.6)	
Poorly	0	8 (7.4)	
Background liver, n (%)			
Normal liver	0	2 (1.8)	
Chronic hepatitis	24 (46.1)	65 (60.1)	0.141
Cirrhosis	28 (53.8)	41 (37.9)	
Tumor size, n (%)			
$\leq 2.0$ cm	35 (67.3)	27 (25.0)	
2.1-5.0 cm	16 (30.7)	60 (55.5)	< 0.001
5.0 cm<	1 (1.9)	21 (19.4)	
Vascular invasion, n (%)			
Positive	0	36 (33.3)	< 0.001
Negative	52 (100)	72 (66.6)	

連続変数は、中央値と範囲で示した。HCC、肝細胞がん；HB、B型肝炎ウイルス感染症、HC、C型肝炎ウイルス感染症

## 方法

### DNAおよびRNA抽出物

QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) と TRizol (Invitrogen) は、それぞれゲノム DNA とトータル RNA を単離するために、メーカーのプロトコルに従って使用した。ゲノム DNA とトータル RNA 濃度は、それぞれ Qubit (Life Technologies) と NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) を使用して dsDNA BR アッセイによって決定された。

### DNAおよびRNAシーケンシング

抽出された  $1\mu\text{g}$  のゲノム DNA または total RNA は、メーカー手順書に従いシーケンスライブラリを作成し、Illumina HiSeq 2000/2500 (Illumina) を用いて配列解析を行った。Exome 解析は、以下の手順で行った。肝細胞がんの凍結手術検体の腫瘍部および隣接非がん部の組織から抽出したゲノム DNA を、メーカープロトコルに従って測定を実施した。すなわち、Covaris SS Ultrasonicator を使用して断片化し、Agilent SureSelect V4/V5 (Agilent Technologies) または HGSC VCRome 2.1 design1 (42 Mb; NimbleGen) を用いて Exon キャプチャ法により Exon 部分を濃縮した。各サンプルは、100-bp ペアエンドリードとして配列解析された。遺伝子発現量解析および遺伝子融合イベントを調べるために、RNA シーケンスを行った。TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (イルミナ) を用いて RNA 配列ライブラリを調製し、Exome と同様にメーカープロトコルに従い 100-bp ペアエンドリードとして配列解析された。

## Exome による変異検出

Exome 配列データは、以前の解析同様に体細胞変異と染色体異常を同定するために使用した(13) ; すなわち、Burrows-Wheeler Aligner と Novoalign ソフトウェアを使用して、NGS リードをヒト参照ゲノム (UCSC hg19) にアラインメントした。PCR 重複を除去した後、SRMA(15)を使用して局所的なリアラインメントすることで変異検出精度を改善した。体細胞変異の同定は、油谷研究室で上田宏生氏により開発された karkinos (<http://github.com/genome-rcast/karkinos>) を使用した。このプログラムでは、体細胞突然変異の変異アレル頻度を推定腫瘍含有率によって補正し、経験的アルゴリズムおよびフィッシャー正確検定検定などの統計値でフィルタリングし、腫瘍リード深度 > 4 および変異アレル頻度 > 0.12 を用いて、マッピング品質の低いリードおよび方向に偏ったリードを除去した。同一遺伝子上での体細胞変異の頻出度を見積もるための初期確率は、二項確率式、遺伝子長、およびバックグラウンド突然変異率を用いて計算した ; FDR は既報にある通りシミュレーションを用いて計算した(16)。

## ゲノムコピー数解析

上田氏の開発した karkinos を用いて Exome のリファレンスゲノムへのマッピング結果からゲノムコピー数変化の検出を行った。すなわち、ヒトゲノム配列 (UCSC hg19) にマップした Exome の read-depth について腫瘍と正常組織の比を算出し、read 数に関する正規化と GC 含有量のバイアスを調整した後、複素ガウスモデルを用いたウェーブレット解析を用いてコピー数ピークを推定した。計算されたガウスモデルを用いて隠れマルコフモデルを構築し、コピー数ピークを絶対整数

のコピー数としてアノテーションした。染色体異常の有無については、その染色体腕の30%以上の領域でコピー数変化を認めたら、その染色体腕のコピー数異常があると判定した。

## 遺伝子発現解析

上田氏の開発した **finemap** ソフトウェアにより、RNA-seq から遺伝子発現値を算出した。すなわち RNA-seq から得られた配列を、**Burrows-Wheeler Aligner** を用いて、ヒト参照ゲノム (UCSC hg19) とトランスクリプトームデータベース (UCSC gene) にそれぞれマッピングした後、cDNA 座標をゲノム位置に変換し、参照ゲノム配列との最小編集距離を比較することにより、cDNA またはゲノムマッピングのいずれかから最適なマッピング結果を選択した。次いで、局所的な再アライメントを、より小さい **k-mer** サイズ ( $k = 11$ ) の内製の配列解析アルゴリズムを用いて行う。最後に、ストランドを区別した **1kbp** 当たりのフラグメントマッピング値 (FPKM) を、各 UCSC 遺伝子について算出した。バッチ情報および患者背景は、表 2-2 に示した。

## 融合遺伝子の逆転写 PCR

TERT 融合遺伝子の転写は、逆転写 PCR (RT-PCR) ; **FastStartTaqPolymerase(Roche)**を用い、RT-PCR には、 $95^{\circ}$  で30秒間の変性、 $60^{\circ}$  または $56^{\circ}$  で30秒間のアニーリング、 $72^{\circ}$  で1分間の伸長というパラメータを用いた。RT-PCR に使用したプライマーは、**SLC12A7-TERT** 融合用のフォワードプライマー、**5' -GATCGGTGAATGTCGGAGAC-3'** とリバースプライマー、**5' -TACACACTCATCAGCCAGTG-3'**、融合用のフォワードプライマー、**5' -TAGTGGGCTTTGGACCTCAC-3'** とリバースプライマー、**5' -AAAGACCTGAGCAGCTCGAC-**

3' である。

## IHC

HCC 細胞中の TERT を検出するために、TERT 融合遺伝子を有する腫瘍サンプルを、メーカープロトコルに従って、自動免疫組織化学染色法 (Dako) を用いて IHC に供した。HCC ホルマリン固定パラフィン包埋標本の切片を抗 TERT 抗体 (Lifespan BioScience 社) でインキュベートした。

## DNA メチル化プロファイリング

メチル化状態は、以前に記載されているように、HumanMethylation450 BeadChip (イルミナ) を用いて分析した (21)。簡単に言えば、500 ng のゲノム DNA を、EZ DNA メチル化キット (Zymo リサーチ) を用いてビスルファイト変換した。変換された DNA を増幅し、断片化し、BeadChip にハイブリダイズした。メチル化および非メチル化 DNA の生の信号強度を BeadArray Scanner (イルミナ) を用いて測定した。カラーバイアス補正、シグナル強度のバックグラウンド減算、および Genome Studio (Illumina) 上でのアレイ間正規化を行った後、各 CpG の生のメチル化値を  $\beta = M / (M + U + 100)$  として定義した。ここで M および U はそれぞれメチル化プローブおよび非メチル化プローブの強度であった。

## クラスタリング解析

階層的クラスタリング解析は Cluster 3.0(17) を用いて行った。RNA-seq から得られた遺伝子発現データは前処理として S.D.>2.0 で絞り込みを行い、サンプル・遺伝子両方向について距離パラメ

ータを Pearson Correlation で Average linkage 法で階層的クラスタリングを行った。

Infinium450K から得られた DNA メチル化プロファイルデータについては、常染色体の CpG プロープについて S.D.> 0.225 で絞り込みを行い、距離パラメータに Euclidean を用いて Average linkage 法で階層的クラスタリングを行った。

非負値行列分解 (Non-Negative Matrix Factorization; NMF) は、GenePattern の NMFConsensus コンポーネントを用いて解析した。

## 統計解析

early HCC および overt HCC 群から収集したデータの統計的有意性を評価するために、ピアソンのカイ二乗検定、スチューデントの t 検定、およびウィルコクソンの順位和検定を使用した。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて作成し、log-rank 検定で比較した。統計的有意性は  $p < 0.05$  とした。

## シーケンスデータ

Exome, RNA-seq の配列データおよび DNA メチル化データは、Japanese Genotype-Phenotype Archive (JGA, <http://trace.ddbj.nig.ac.jp/jga>) にアクセス番号 JGAS00000000233 で登録されている。

## 2-4 結果

### 患者／サンプル情報とシーケンス解析統計

患者／サンプル情報とシーケンス解析統計情報を表 2-2 に示す。

### 発現プロファイル、ゲノムコピー数、主な遺伝子変異

Early HCC、overt HCC および背景肝（図 2-1 A）の RNA-seq から得られた遺伝子発現値について階層的クラスタリングを行った結果、大きく 3 群に分かれた（図 2-1 B）。overt HCC では、CTNNB1 遺伝子と TP53 遺伝子の変異により、Wnt 標的遺伝子と細胞周期関連遺伝子がそれぞれ濃縮されていた。SNP アレイを用いた我々のこれまでのデータ(18)と一致するように、コピー数解析により、early HCC の染色体異常は overt HCC のそれよりも有意に小さいことが示された ( $p < 0.001$ ; 図 2-1 C)。同様に、腫瘍あたりの突然変異イベントおよび融合イベントの数は、overt HCC で有意に多かったのに対し ( $p < 0.001$ ; 図 2-3)、塩基置換パタンの分布は 2 つの HCC タイプ間で有意差は認められなかった (Fisher's 正確確率検定、 $p = 0.946$ )。

表2-2. 患者／サンプル情報とシーケンス解析統計情報

Histology	sample ID	Age	Gender	Liver	Hepatitis	Clinical information			NGS library prep kit			Statistics (RNAseq)			Statistics (k-ome)			Statistics (RNAseq)			Exome result					
						Tumor size	Vascular invasion	Tumor differentiation	Exome capture kit	RNAseq kit	Exome capture kit	mapped reads (exome_T)	duplicate (%) (exome_T)	total reads (exome_T)	mapped reads (exome_T)	duplicate (%) (exome_T)	total reads (exome_T)	mapped reads (exome_T)	duplicate (%) (exome_T)	total reads (exome_T)	mapped reads (exome_T)	duplicate (%) (exome_T)	total reads (exome_T)	mapped reads (exome_T)	duplicate (%) (exome_T)	tumor content
early	7	77	F	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	152,097,022	151,225,532	29	149,160,376	147,979,494	31	116,455,178	113,244,031	97.2%	103,928,703	96.9%	107,975,680	103,928,703	96.9%	0.81	2.01	98
early	27	65	M	CH	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	168,848,380	167,708,649	23	191,196,612	189,840,475	45	92,090,000	90,288,251	97.9%	92,090,000	90,288,251	97.9%	0.75	2.08	83		
early	35	75	M	LC	C	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	184,135,884	183,110,922	34	180,645,348	179,512,869	40	84,720,938	82,780,006	97.8%	84,720,938	82,780,006	97.8%	0.75	2.00	40		
early	49	68	F	LC	B	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	143,782,864	142,707,564	22	182,414,114	180,944,039	27	97,896,964	95,492,901	97.8%	97,896,964	95,492,901	97.8%	0.65	2.02	47		
early	50	60	M	CH	C	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	153,708,930	152,707,564	22	161,005,912	160,046,695	20	106,963,902	104,064,911	97.3%	106,963,902	104,064,911	97.3%	0.73	2.04	224		
early	54	63	M	CH	C	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	155,631,214	154,761,585	31	144,155,512	143,263,275	34	106,157,872	103,165,342	97.2%	106,157,872	103,165,342	97.2%	-	2.00	37		
early	58	67	F	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	147,733,200	146,978,433	27	174,111,046	173,079,949	33	90,592,588	88,998,468	97.8%	90,592,588	88,998,468	97.8%	-	2.00	81		
early	65	70	M	LC	C	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	112,068,100	111,471,727	15	158,425,220	157,645,490	16	98,527,444	95,996,779	96.8%	98,527,444	95,996,779	96.8%	-	2.00	11		
early	94	74	F	LC	C	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	168,857,040	167,967,019	30	185,125,220	183,925,709	22	91,984,978	88,851,845	96.8%	91,984,978	88,851,845	96.8%	0.67	4.11	66		
early	131	59	M	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	167,034,544	166,125,971	44	186,110,548	185,225,709	31	109,420,455	106,341,189	96.8%	109,420,455	106,341,189	96.8%	0.51	3.70	28		
early	167	56	M	LC	B	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	133,604,930	132,838,245	33	128,198,734	127,686,181	27	89,856,086	87,566,539	97.6%	89,856,086	87,566,539	97.6%	0.64	2.09	25		
early	172	53	F	CH	B	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	92,222,058	92,357,635	17	127,225,488	127,205,147	28	89,856,086	87,566,539	97.6%	89,856,086	87,566,539	97.6%	0.48	2.10	50		
early	199	79	F	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	153,708,788	153,182,464	25	171,603,086	171,160,696	28	103,606,018	100,578,275	97.1%	103,606,018	100,578,275	97.1%	-	2.00	17		
early	200	51	M	CH	B	2	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	146,158,202	145,977,680	28	157,061,314	152,134,667	30	115,893,112	112,592,136	97.1%	115,893,112	112,592,136	97.1%	-	2.00	7		
early	317	67	M	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	95,990,166	95,699,484	15	120,932,330	120,653,532	15	109,477,432	106,271,603	97.1%	109,477,432	106,271,603	97.1%	0.61	1.98	53		
early	325	74	M	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	81,355,424	81,063,084	7	130,413,190	129,999,577	26	115,404,700	112,583,130	97.6%	115,404,700	112,583,130	97.6%	0.82	2.04	71		
early	326	74	M	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	153,984,338	153,341,436	22	162,578,196	162,159,368	18	94,747,358	92,507,208	96.8%	94,747,358	92,507,208	96.8%	0.23	2.17	53		
early	329	55	M	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	161,324,576	160,846,833	35	157,847,810	157,137,938	23	108,500,004	105,302,401	97.3%	108,500,004	105,302,401	97.3%	0.43	2.06	100		
early	337	71	F	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	173,981,898	173,168,519	29	174,891,304	174,107,635	30	113,092,332	109,585,322	96.9%	113,092,332	109,585,322	96.9%	0.84	1.95	85		
early	351	72	F	LC	C	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	157,368,340	156,639,977	25	172,565,080	171,822,073	22	100,939,142	97,697,538	97.2%	100,939,142	97,697,538	97.2%	0.54	3.32	60		
early	352	64	M	CH	C	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	159,515,918	158,890,115	23	176,340,528	175,466,541	34	97,152,398	94,851,405	97.6%	97,152,398	94,851,405	97.6%	0.59	2.19	84		
early	362	70	M	CH	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	162,840,572	162,370,195	45	156,576,228	155,985,365	45	139,498,180	136,612,966	97.2%	139,498,180	136,612,966	97.2%	0.70	2.04	82		
early	378	58	M	CH	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	172,837,610	171,827,244	34	126,165,082	125,494,349	33	120,929,634	115,103,718	95.9%	120,929,634	115,103,718	95.9%	-	2.00	2		
early	380	65	M	LC	C	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	147,804,714	146,942,033	39	191,555,788	190,730,018	72	91,709,884	89,374,957	97.6%	91,709,884	89,374,957	97.6%	-	2.00	49		
early	394	68	M	CH	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	158,977,702	158,192,822	34	159,912,816	159,050,715	25	113,576,952	107,963,631	95.2%	113,576,952	107,963,631	95.2%	0.99	2.02	14		
early	405	70	F	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	164,437,996	163,949,009	55	155,425,438	154,652,700	18	123,088,784	125,118,313	96.9%	123,088,784	125,118,313	96.9%	0.55	2.02	43		
early	424-2	79	M	CH	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	165,710,848	164,751,473	25	183,940,490	182,938,411	30	88,995,424	85,590,186	96.8%	88,995,424	85,590,186	96.8%	0.50	2.03	49		
early	426	74	F	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	159,379,000	158,515,318	33	129,598,038	128,642,628	22	113,985,512	111,982,011	97.3%	113,985,512	111,982,011	97.3%	0.59	2.04	65		
early	434	64	M	CH	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	100,344,746	99,919,807	24	135,794,154	135,250,015	39	91,449,448	89,000,689	97.4%	91,449,448	89,000,689	97.4%	0.35	2.05	46		
early	445	68	F	LC	C	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	170,127,506	169,907,937	38	161,285,290	160,458,761	41	99,621,254	97,283,771	97.7%	99,621,254	97,283,771	97.7%	0.76	1.99	56		
early	475	78	M	CH	C	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	169,473,846	168,719,996	51	141,923,306	141,220,717	31	144,574,102	137,665,633	95.2%	144,574,102	137,665,633	95.2%	0.57	2.22	90		
early	494	66	F	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	108,075,322	107,152,922	10	138,839,508	137,863,478	96.6%	117,258,444	112,446,522	95.9%	117,258,444	112,446,522	95.9%	0.40	1.96	43		
early	500	70	M	CH	B	1	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	94,157,630	92,429,238	10	113,217,194	110,926,613	9	169,485,164	163,979,846	96.8%	169,485,164	163,979,846	96.8%	0.70	2.21	77		
early	507-1	63	F	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	144,150,620	143,997,619	25	119,769,146	119,654,850	27	108,920,438	104,074,780	96.1%	108,920,438	104,074,780	96.1%	0.57	2.05	27		
early	511	71	M	CH	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	135,229,134	134,955,434	18	132,832,884	132,827,272	32	140,363,454	134,542,146	96.1%	140,363,454	134,542,146	96.1%	0.70	2.04	59		
early	524	65	M	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	162,526,108	161,728,353	42	158,943,708	158,423,618	37	162,764,142	156,805,964	96.8%	162,764,142	156,805,964	96.8%	0.65	2.13	57		
early	527	74	M	CH	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	153,665,490	153,024,990	51	168,650,746	167,925,268	32	96,861,968	93,146,631	96.2%	96,861,968	93,146,631	96.2%	0.47	2.07	49		
early	534	77	M	LC	nBnC	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	167,180,946	166,570,225	37	148,721,006	148,049,510	59	134,202,180	129,742,618	96.7%	134,202,180	129,742,618	96.7%	0.51	2.10	59		
early	538	81	F	CH	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	180,954,600	180,172,045	36	163,151,896	162,612,748	46	140,582,526	136,851,737	96.6%	140,582,526	136,851,737	96.6%	0.87	4.02	47		
early	548	74	F	LC	C	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	148,646,918	148,162,966	31	159,546,536	159,316,599	36	134,624,500	129,791,835	96.4%	134,624,500	129,791,835	96.4%	0.44	2.04	36		
early	552	60	M	CH	nBnC	0	-	Very Well	StnSelect_Viplex TruSeq_Stranded_mRNA	158,633,962	157,850,833	30	150,824,938	150,126,832	39	136,649,878	132,278,824	96.8%	136,649,878	132,278,824	96.8%	0.42	4.10	147		
early	553																									







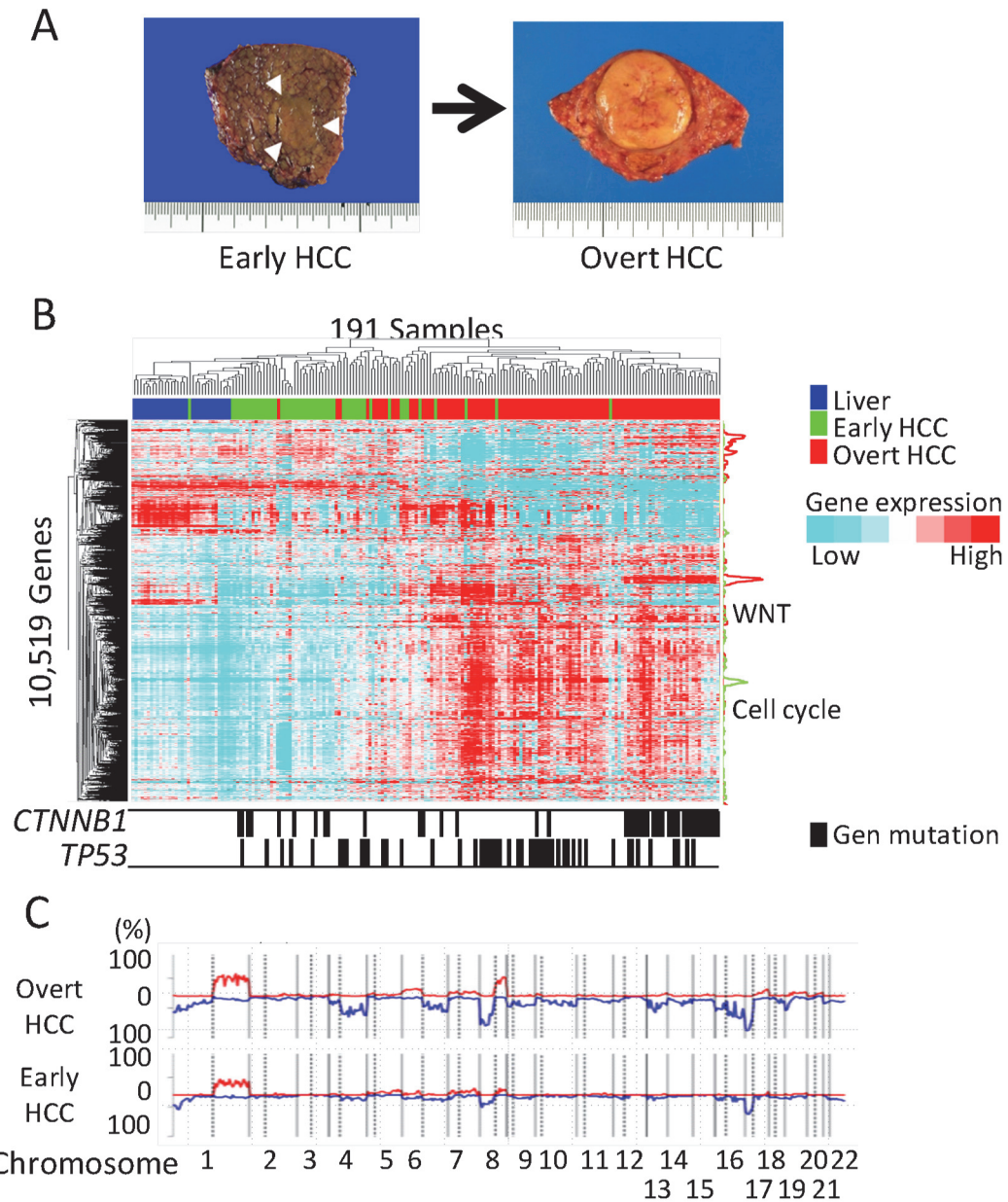


図2-1. 160例のHCCと31例の非がん肝臓サンプルで明らかになった遺伝子異常の概要。A. early HCCおよびovert HCCの肉眼的所見。白矢印はearly HCCの境界。B. 遺伝子発現の階層的クラスタリング。各遺伝子の発現レベルをサンプル間で正規化し、値を相対的な尺度で示した。右側に遺伝子カテゴリーの濃度を示し、ヒートマップの下に*CTNNB1*と*TP53*遺伝子の変異を示す。C. コピー数の変化の頻度。early HCC検体のExome配列データを用いてコピー数解析を行ったところ、1q上のコピー数増加(29.8%)と17p上のLOH(27.7%)が頻発していることがわかった。一方でovert HCC検体では、1q(41.9%)と8q(39.0%)のコピー数増加と、1p(21.9%)、4q(36.2%)、6q(23.8%)、8p(40.0%)、13q(27.6%)、16p(22.9%)、16q(33.3%)、17p(52.4%)のLOHが、それぞれ高頻度に認められた。

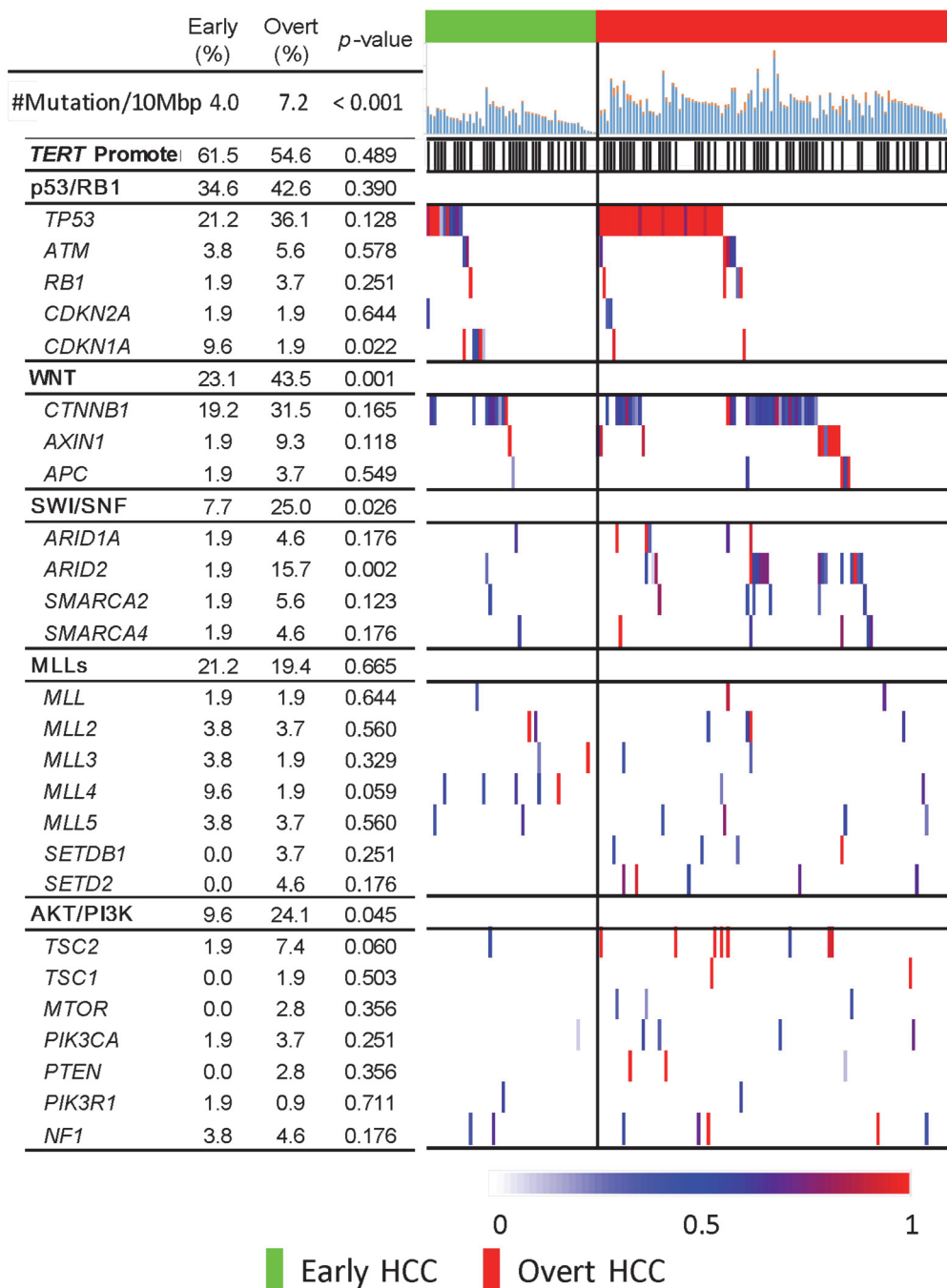


図 2-2. 有意に変化した経路のランドスケープ。変異があるサンプルに変異アレル頻度に従って色付けをしている。赤色は変異配列の割合が 1 に近い、即ちがん細胞由来の殆どの配列に変異が認められる。青色は半分ほどの配列で変異が認められることから、例えば染色体 2 本のうち 1 本で変異が認められることが示唆される。上部にはサンプル毎の 10 百万 DNA 塩基あたりの突然変異数（青：1 塩基置換、橙：短配列挿入欠失）を示す。

p value は early HCC と overt HCC の比較における  $\chi^2$  乗検定による。

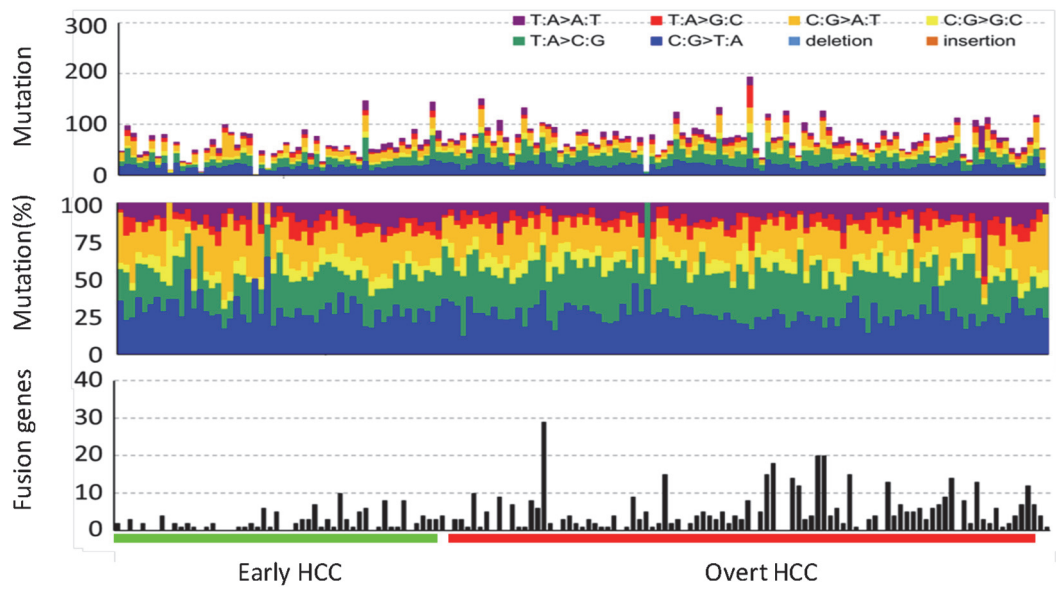


図 2-3. 腫瘍あたりの突然変異イベントおよび融合イベントの数

## HCC の進展に伴う遺伝子変異

突然変異解析の結果、HCC サンプルでは、TERT プロモーターに加えて、5つの経路（p53/RB、Wnt、MLLs、SWI/SNF、AKT/PI3K と表記）が頻繁に変化していることがわかった（図2-2）。CTNNB1 の変異は両群で共通していたが、Wnt 経路遺伝子の変異は、early HCC よりも overt HCC で有意に多かった（ $p = 0.014$ ）。また、p53/RB 経路とヒストンメチラーゼ遺伝子も両群で高頻度に変異していた。逆に、SWI/SNF 複合体遺伝子（ $p = 0.026$ ）および7つの AKT/PI3K 遺伝子（ $p = 0.045$ ）の変異は、overt HCC でより高頻度であった。最も注目すべきは、ARID2 変異が overt HCC で有意に高頻度であった点である（ $p = 0.002$ ）。

## 染色体コピー数変化による early HCC/overt HCC の判定

本章の Exome ゲノム解析を実施した early HCC 52 症例、overt HCC 108 症例について、第1章の SNP アレイ解析結果に対する決定木解析で同定した染色体コピー数変化 4 領域を用いて、early /overt の判定を行った。Early HCC 52 例中 39 例（75%）が early HCC と判定され、また overt HCC 108 症例中 94 例（75%）が overt HCC と判定され、いずれの病理分類についても同程度の判定精度であったが、第1章で検討した別コホートでの判定精度（89%）よりは低い結果となった。また、ゲノムコピー数異常に基づく early HCC / overt HCC の判定と CTNNB1, TP53 変異の間には関連は見られなかった（図2-4）。5q 増幅に注目すると、第1章の overt HCC 25 症例では高頻度（約 40%）に認められたのに対して、第2章で解析した 108 例の overt HCC では頻度が低く（約 2%）、2つのコホート間で乖離が大きかった。TCGA プロジェクトの PanCancer データにおける 33 種のがん種の報告では(19)、染色体 arm レベルのコピー数異常の解析において、5q 増幅を認めるがん種は肝細胞がんと淡明細胞型腎細胞がんの 2 種類のみであり（図2-4B）、第1章で

検出された 5q 増幅とは矛盾しない結果となった。一方、TCGA 肝がんコホート (TCGA-LIHC) (20)のゲノムコピー数プロファイルでは、1q、8q 増幅に比べると 5q 増幅の頻度は低くなっていた。

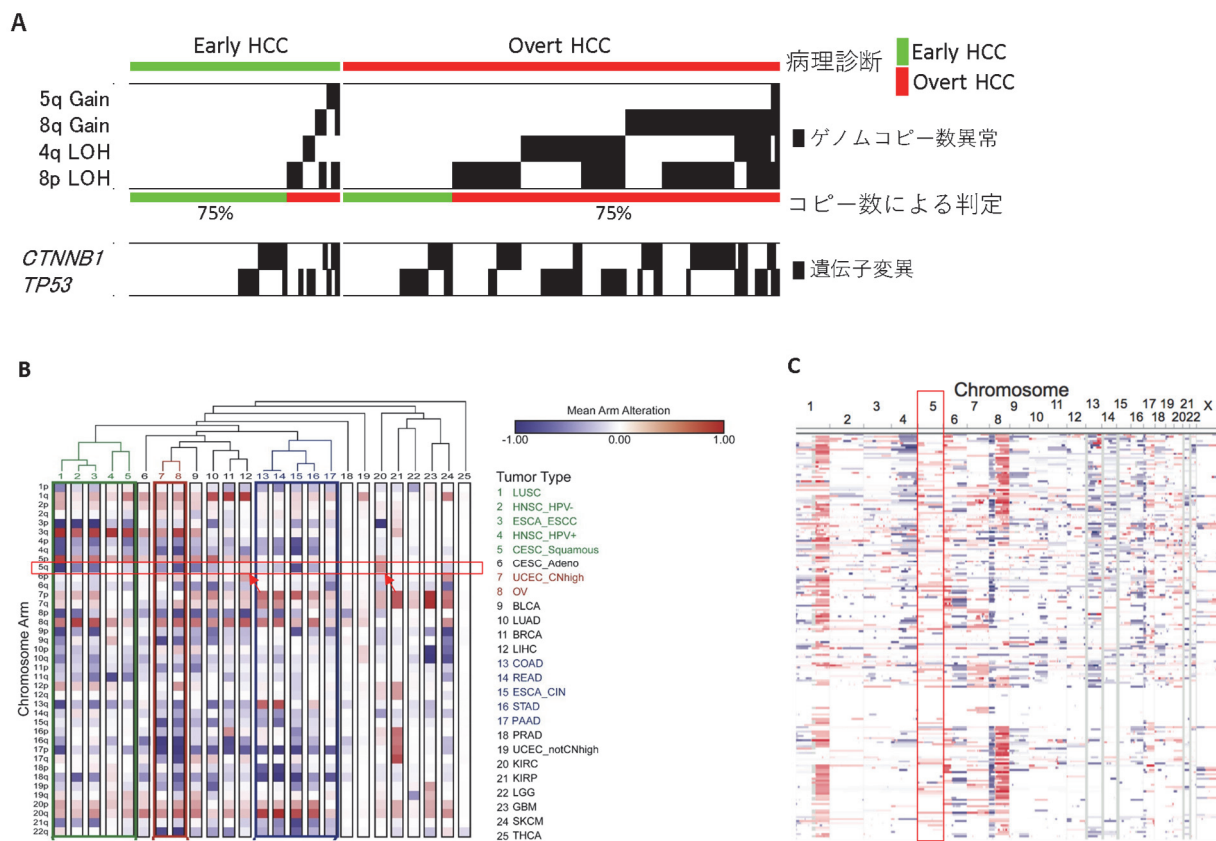


図 2-4. 染色体コピー数変化 4 領域による、Exome コピー数解析結果に基づく early HCC と overt HCC の判別結果. A. 第 2 章の Exome ゲノム解析を実施した early HCC 52 症例、overt HCC 108 症例について、第 1 章の SNP アレイ解析結果に対する決定木解析で同定した染色体コピー数変化 4 領域を用いて、early /overt の判定を行った。臨床診断で early HCC であった 52 例中 39 例 (75%) がゲノムコピー数から early HCC と判定され、また overt HCC 108 症例中 94 例 (75%) が overt HCC と判定された。B. PanCancer で解析された 33 種のがん種のゲノムコピー数プロファイル (ref. Figure 4 に赤枠を追加) 5q 増幅を認めたのは #12. 肝臓がん (Liver Cancer; LIHC) と #20. 淡明細胞型腎細胞がん (Renal Clear Cell Carcinoma; KIRC) のみであった (赤矢印)。C. TCGA-LIHC のゲノムコピー数プロファイル。(ref. Figure S2 に赤枠を追加)



## Wnt 標的遺伝子の活性化

HCC における遺伝子発現と変異の関係を調べるために統合的解析を行った。まず 160 サンプルの HCC の発現データについて非負値行列分解 (NMF) によるクラスタリングを行ったところ、3 群への分類が最も安定した (図 2-5 A)。各群の特徴を調べるため、Gene Set Enrichment Analysis(21) に用いられる MSigDB に登録されている遺伝子セットを検索したところ、"CHIANG\_LIVER\_CANCER\_SUBCLASS\_CTNNB1\_UP (M16496); CTNNB1\_UP" と "CHIANG\_LIVER\_CANCER\_SUBCLASS\_PROLIFERATION\_UP (M3268); PROLIF\_UP" が見いだされた。PROLIF\_UP と CTNNB1\_UP クラスタは、それぞれ *TP53* ( $p < 0.001$ ) と *CTNNB1* ( $p < 0.001$ ) の遺伝子変異を持つ症例が濃縮されていた (図 2-5 B)。一方、early HCC サンプルのほとんどは OTHERS クラスタに含まれていた (94.2%;  $p < 0.001$ ) (図 2-5 C、図 2-6 A)。注目すべきことに、early HCC における *CTNNB1* (13.7%) および *TP53* (18.7%) 遺伝子の高頻度な変異にもかかわらず、CTNNB1\_UP および PROLIF\_UP 遺伝子セットは発現亢進していなかった。Wnt シグナルの下流である CTNNB1\_UP のうち RNA-seq で測定された 154 遺伝子は、*CTNNB1* 遺伝子の変異の有無にかかわらず、early HCC では活性化されなかった。これらの遺伝子群の DNA メチル化について調べたところ、*CTNNB1* 変異を有する overt HCC 群においてのみメチル化レベルが脱メチル化している CpG 部位 (4.9%) が観察された。一方、Wnt 標的の 154 遺伝子に関連する CpG 部位の 35.8% の CpG サイトでは *CTNNB1* 変異の有無やがんの進行度に関係なく脱メチル化状態が維持されており、殆どの CpG 部位においてメチル化は変化していなかった。また、*CTNNB1* 遺伝子の変異アミノ酸の位置は、early HCC と overt HCC いずれも hotspot として知られる exon3 に集中しており、差がなかった (図 2-5 D)。代表的な例として、CpG 部位のメチル

化状態と *GLUL* 遺伝子の Wnt の状態を示した (図 2-5 E)。さらに、この遺伝子群は、*AXIN1* 変異を有する検体では発現亢進しておらず、*CTNNB1* 標的遺伝子が *AXIN1* 標的遺伝子とは異なることが示された(22)。

*CTNNB1* 変異を持つ early HCC における  $\beta$ -カテニンの核内局在を確認するために、ホルマリオン固定パラフィン埋込試料を用いて IHC 試験を行った。免疫染色の結果、*CTNNB1* 変異を有する overt HCC では、15 検体 (44.1%) の核内で強い免疫活性を示した。一方、*CTNNB1* 変異を有する early HCC では、がん細胞の核内では  $\beta$  カテニン免疫活性を示さなかった (図 2-6 C)。さらに、細胞膜上で  $\beta$  カテニンを結合する *CDH1* は、*CTNNB1* 変異を有する overt HCC サンプルでは、early HCC サンプルと比較して有意に発現が低下していた ( $p = 0.004$ ; 図 2-6 D)。*CDH1* 遺伝子の発現の低下は、early HCC ( $p = 0.027$ ) および overt HCC ( $p < 0.001$ ) サンプルの両方において、エンハンサー領域の DNA メチル化と関連していた (図 2-6 E) ことから、*CTNNB1* 標的遺伝子が活性化されなかったのは、early HCC における *CDH1* 遺伝子の正常な発現による核内の異常な  $\beta$ -カテニン蓄積の欠如のためであることが示唆された(23)。更に *CDH1* 発現レベルの低下と *CDH1* の座位する 16q の LOH、*TP53* 変異、*CTNNB1* 変異の有無の関連性を調べたところ、*CTNNB1* 変異で *CDH1* 発現低下傾向が認められたことに加え、*TP53* 変異と 16p LOH が両方とも検出された症例で *CDH1* 発現レベルが著明に低くなっていることが観察された。ただし、*TP53* だけ、あるいは 16qLOH どちらか一方のみ検出されたサンプルでは *CDH1* の発現低下は顕著ではなかった (図 2-6 F)。既報の免疫関連遺伝子マーカー(24)、及び肝細胞分化/幹細胞マーカー(25)の遺伝子発現と *CTNNB1* 変異の関係を比較するために、図 2-6 A と同じ症例の並び順で、各マーカー遺伝子発現をヒートマップで図示した。細胞障害活性マーカー (*GZMA*、*PRF1*)、

T細胞マーカーの *CD8*、*CD4* は、overt HCC の *CTNNB1* 変異症例では既報と同様に発現低下していた (図 2-6 G) が、一方、early HCC の *CTNNB1* 変異症例では背景肝 (非がん部) に比べるとやや発現が低い傾向にあるものの、サンプル間のばらつきが大きいため有意性の評価はできず、バルク組織での RNA-seq 解析であることもあり、顕著な発現低下までは認められなかった。同様に、制御性 T 細胞 (Treg) マーカー *FOXP3* や、M2 マクロファージのマーカーである *CD163*、*MRC1* も、背景肝 (非がん部組織) で高発現であることと対照的に、early HCC ではやや発現低下し、overt HCC では顕著に発現が低くなっていた。肝細胞の分化指標として *ALB*、*AFP*、*AFM* の発現をみると、*ALB* の発現量は overt HCC では顕著に発現低下している一方、early HCC では発現保たれており、組織学的病理象で超高分化であることとも整合していた。逆に *AFP* は early HCC では発現が低く保たれているが、overt HCC ではこう発現を呈するようになっている。幹細胞マーカーについても、*EpCAM*、*PROM1* (CD133)、*THY1* (CD90) は *CTNNB1* 変異のある overt HCC では顕著に発現抑制されているのに対して、early HCC では発現低下傾向にあるもののサンプル間のバラツキにより評価困難であった。*ALDH1*、*LGR5* は Wnt/catenin の下流であり、*CTNNB1* 変異のある overt HCC 症例で顕著に高発現を示した。

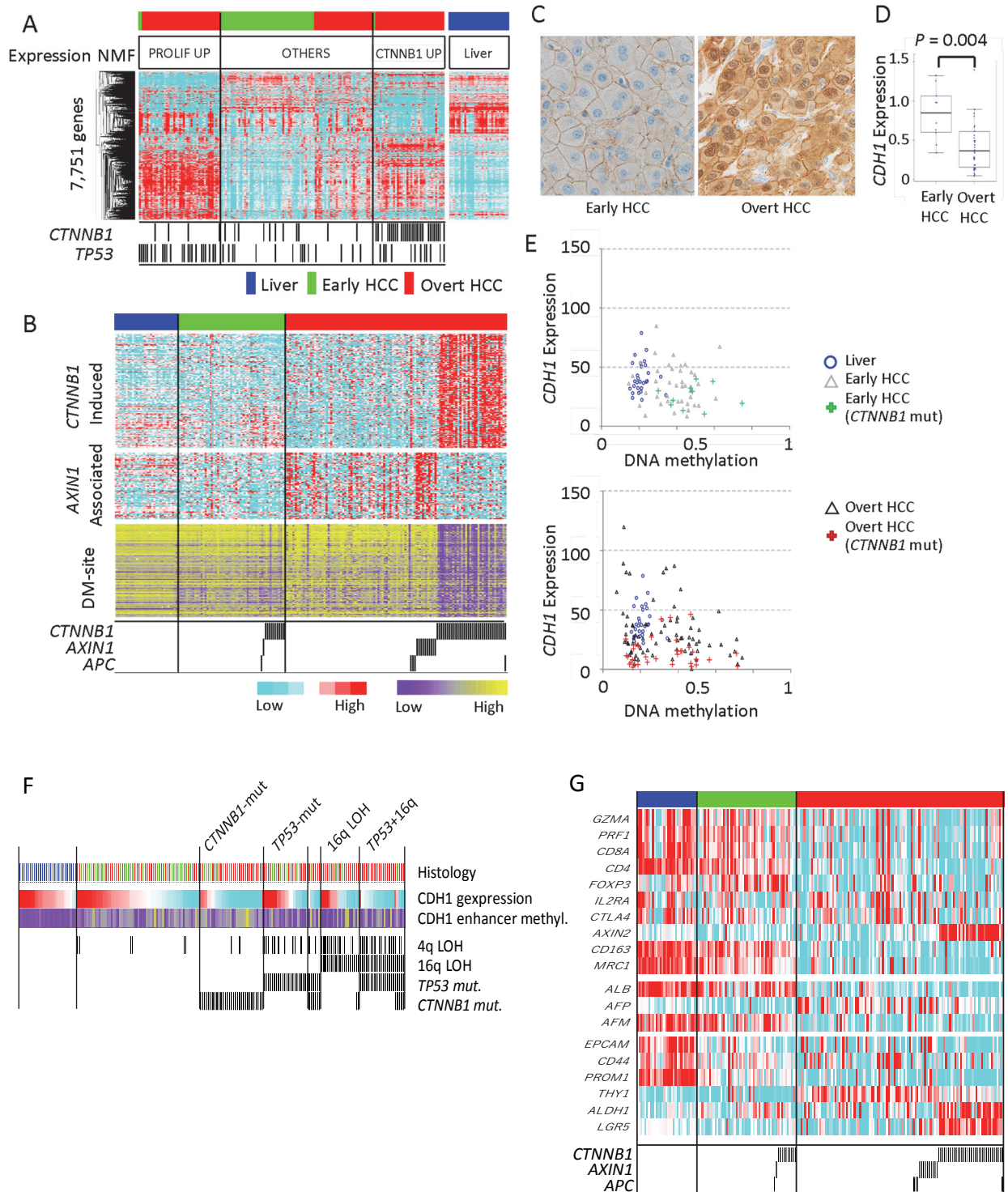


図 2 - 6. WNT/ $\beta$  カテニン関連遺伝子の遺伝子発現プロファイル。A. 160 例の HCC サンプルの遺伝子発現プロファイルの非負値行列分解と *CTNNB1* と *TP53* 遺伝子変異。 *CTNNB1* 変異は CTNNB1\_UP 群に、 *TP53* 変異は PROLIF\_UP 群に、それぞれ濃縮している。(次頁へ)

(前頁からつづき)

B. WNT 標的遺伝子セット CTNNB1\_UP 群の 154 遺伝子の発現プロファイル(上)と *AXIN1* 変異症例で発現亢進する遺伝子群 (69 遺伝子 ; 中)、*CTNNB1* 変異のあり・なし各サンプル群間の平均  $\beta$  値の差が 0.2 以上 (Differentially Methylated; DM) の CpG 部位の DNA メチル化プロファイル (下)。WNT 経路に関連する 3 遺伝子の変異の有無をヒートマップの下に示した。

C. *CTNNB1* 遺伝子変異を有する HCC サンプルの  $\beta$ -カテニン局在の免疫組織化学染色。overt HCC では核内で  $\beta$  カテニンの強い染色を示したが、early HCC では核内の染色像は観察されなかった。

D. *CTNNB1* 遺伝子変異を有する early HCC および overt HCC サンプルの *CDH1* 発現。*CDH1* は overt HCC で有意に発現低下している ( $p = 0.004$ )。

E. エンハンサー領域のメチル化と *CDH1* 遺伝子発現の関係。エンハンサー領域のメチル化に応じて *CDH1* の発現低下傾向が認められる。

F. *CTNNB1* 変異、*TP53* 変異、16q LOH の 3 つのイベントの有無と *CDH1* 発現レベルの関連。*CTNNB1* 変異で *CDH1* 発現低下傾向が認められるのに加えて、*TP53* 変異と 16p LOH が両方観察される症例でも発現レベルが低くなっている。

G. *CTNNB1* 変異と免疫関連遺伝子の発現、及び肝細胞分化/幹細胞マーカーの遺伝子発現。細胞障害性 T 細胞のマーカー (*GZMA*, *PRF1*)、T 細胞マーカーの *CD8*, *CD4*、制御性 T 細胞関連マーカーの *FOXP3*, *IL2RA*(CD25), *CTLA4*、Wnt/catenin 経路の代表として *AXIN1*、M2 Macrophage マーカーの *CD163*, *MRC1* の発現プロファイル。肝細胞の分化指標として *ALB*, *AFP*, *AFM*、幹細胞マーカーとして *EpCAM*, *CD44*, *PROM1*(CD133), *THY1*(CD90), *ALDH1*, *LGR5* の発現プロファイルを示す。

## p53/RB 経路下流の細胞周期遺伝子の活性化

early HCC でも overt HCC と同様に 17p 欠失と *TP53* 遺伝子変異が両方検出される症例がにもかかわらず、p53/RB 経路下流の細胞周期関連遺伝子 (p53 抑制遺伝子(26)) の発現亢進は、4q および 16q 欠失が early HCC に比べて overt HCC 群で高頻度に認められた ( $p < 0.001$ ) (図 2 - 7 A および B)。染色体 4q35.1 に局在する *IRF2* および 16q23.1 の *WWOX* の局所的ホモ接合欠失が少数例ではあるが検出され、腫瘍抑制遺伝子の候補と考えられた (図 2 - 8)。一方、p53 誘導遺伝子は、*TP53* 遺伝子変異を有する early HCC ( $p < 0.001$ ) および overt HCC ( $p < 0.001$ ) サンプルの両方で発現が相対的に低下傾向にあった (図 2 - 7 C)。

このように、*CTNNB1* と *TP53* 遺伝子は early HCC で既に体細胞変異が高頻度に検出されるにもかかわらず、overt HCC では Wnt 経路と p53 経路下流の細胞周期関連遺伝子が活性化されたが、バルク組織の early HCC の遺伝子発現解析では明らかな発現亢進は認められなかった。注目すべき点としては、HCC の進展に伴い、*CDH1* 遺伝子の発現抑制、あるいは 4q と 16q の染色体欠失は、それぞれ Wnt 経路あるいは p53/RB 経路の下流遺伝子の転写活性化と関連していた。

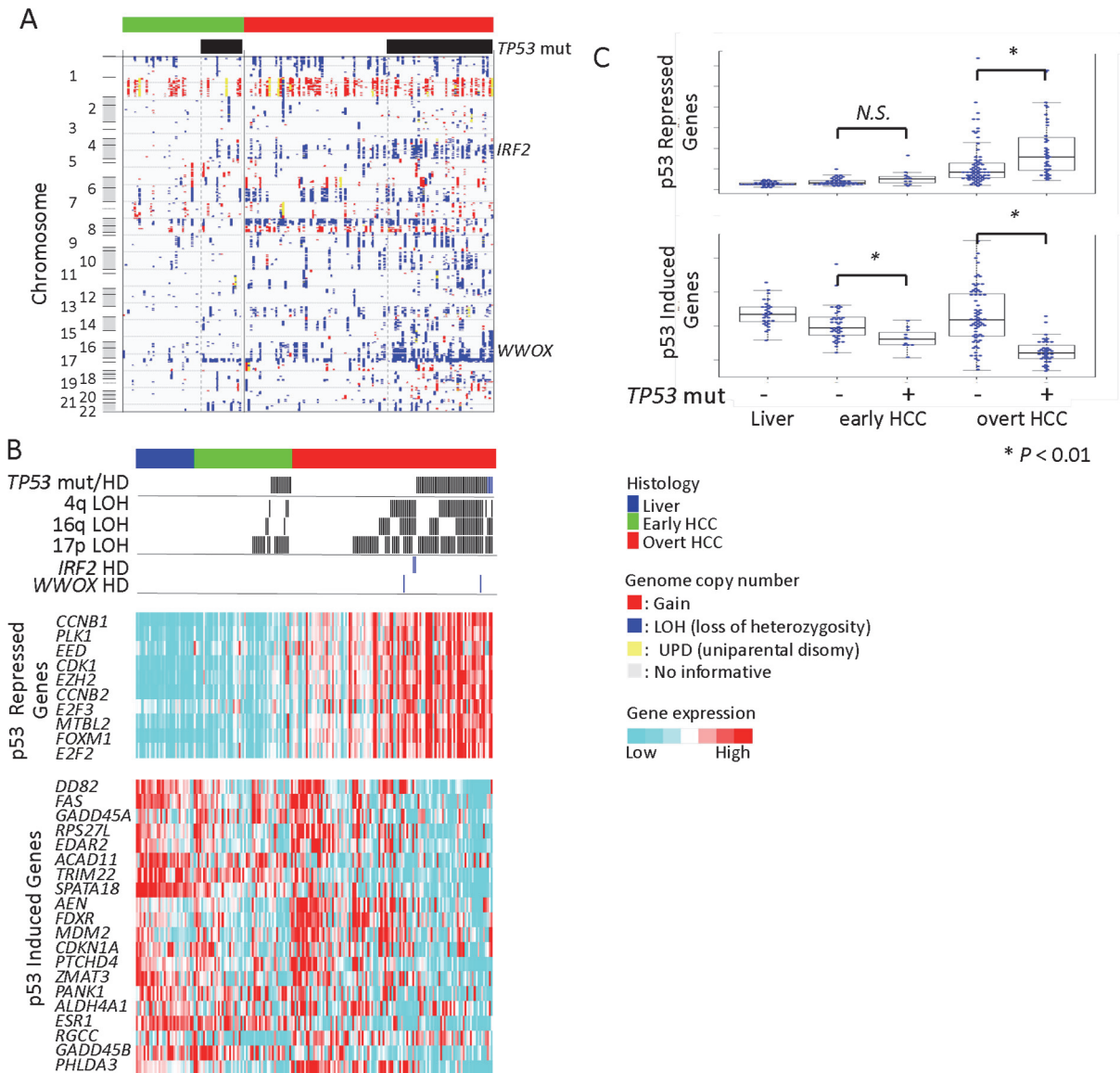


図 2-7. p53/RB1 経路の下流遺伝子の発現。

A. *TP53* 遺伝子変異に関連する染色体異常。染色体部位と標本は 赤枠はコピー数増加、青枠は LOH、黄枠は一親多型、灰色は保持、白は非情報的であることを示す。

B. 4q および 16q の有意な染色体異常に応じた *TP53* 変異と遺伝子発現異常 (上)。下、発現の p53 経路下流遺伝子の発現を拡大して示した。

C. p53 経路の下流遺伝子の発現のボックスプロット。*TP53* 遺伝子変異では、early HCC では p53 抑制遺伝子の発現が低下したが、*TP53* 遺伝子変異では early HCC では p53 抑制遺伝子の発現は変化しなかった。

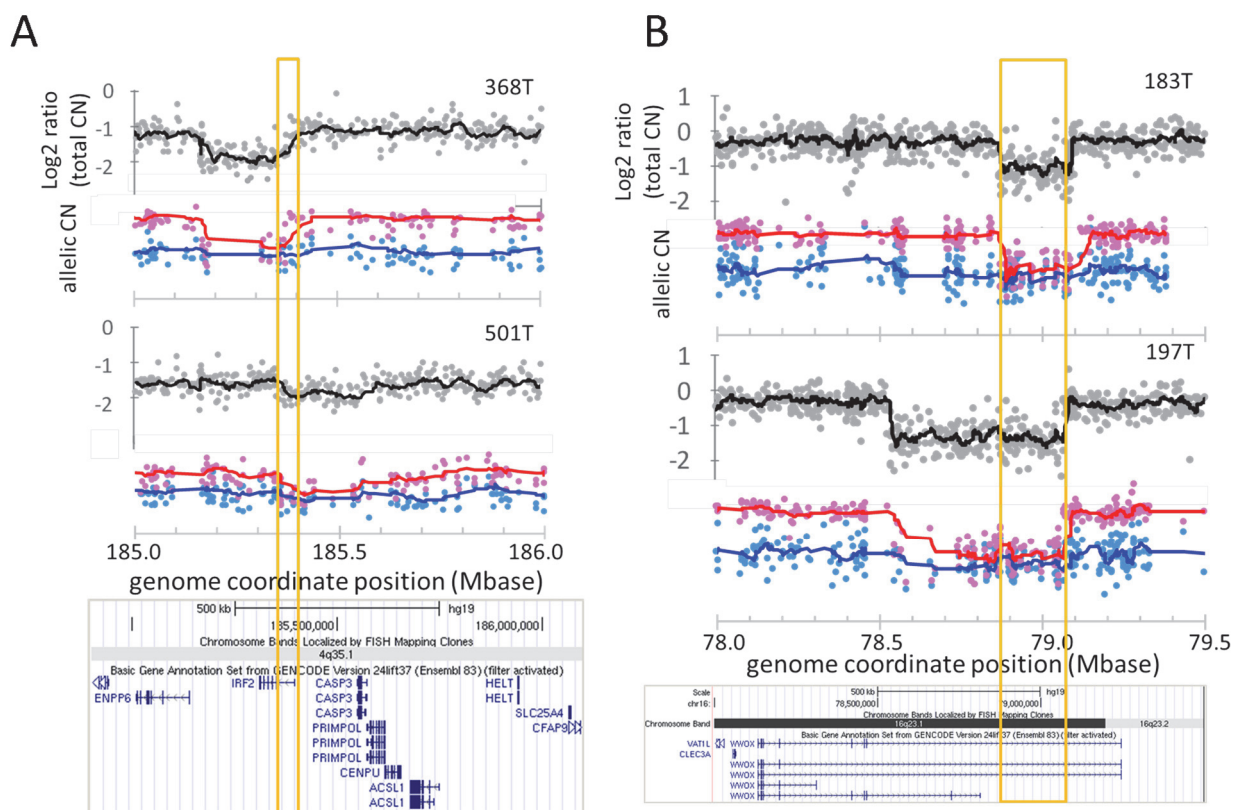


図2-8. アレル別コピー数解析で検出された4qおよび16qにおけるホモ接合欠失候補領域。  
 A. 症例#368と#501、ならびに症例#305と#442は、それぞれ4q35.1或いは4q35.2のホモ接合欠失を有していた。前者は腫瘍抑制遺伝子と示唆される *IRF2* を含み (左図下)、後者は *FAT1* を含む。  
 B. 症例#183および#197は、*WWOX* を含む16q23.1にホモ欠損を有していた (右図下)。2症例で共通してホモ欠失している領域を黄枠で示した。



## **TERT 遺伝子の異常な過剰発現**

*TERT*は、early HCC と overt HCC の両方の HCC サンプルにおいて最も高頻度で変異が検出された遺伝子で、発現亢進が顕著であった（図 2-9）。RNA-seq データから融合遺伝子を解析したところ、3 タイプ、5 症例で *TERT*の融合遺伝子が検出され、RT-PCR での検証実験で確認された。

*SLC12A7-TERT* の融合遺伝子が 2 症例で（図 2-10A、B）、*TERT* と 10q25.2 遺伝子座 t(5;10)(p15;q25)との間の転座が 2 症例（図 2-10C、D）、更に *TERT*と *PIK3R1* との間の転座が 1 症例で検出された（図 2-10E）。加えて、*TERT*プロモーター変異（ATG 開始部位から上流 124bp または 146bp）、*TERT*がコードされる 5p15.33 での局所増加（図 2-10F）、および *TERT*プロモーター近傍への B 型肝炎ウイルス（Hepatitis B virus; HBV）DNA 挿入（図 2-10G）は、early HCC、overt HCC のいずれの群でも高頻度に認められ、殆ど排他的に存在することから、様々なメカニズムによるゲノム異常により *TERT*発現亢進が獲得されることは HCC の発生に極めて重要な役割であることが強く示唆された。特に局所ゲノムコピー数増加、融合遺伝子、及び HBV ゲノム挿入を認める HCC 症例においては *TERT*遺伝子が極めて高発現であった。少なくとも 1 つ以上の *TERT*異常が検出された症例は、early HCC で 52 例中 44 症例（84.6%）、overt HCC で 108 例中 80 症例（74.0%）、全体としては 160 例中 124 症例（77.5%）と極めて高頻度に認められた。

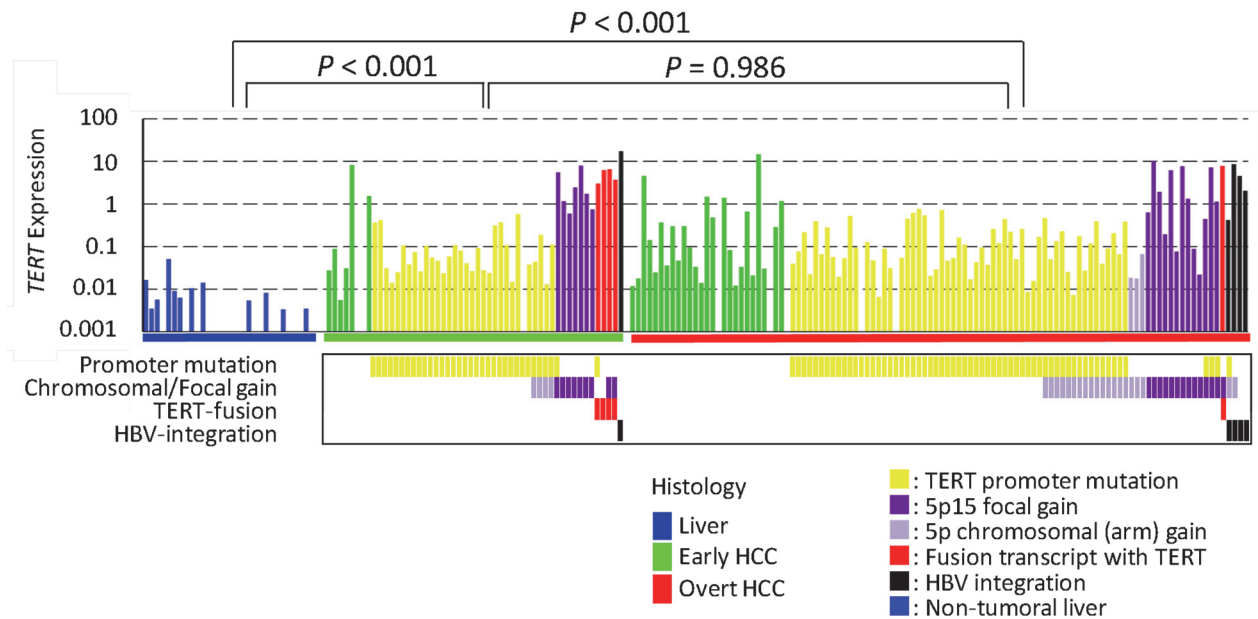


図 2-9. 腫瘍特異的な *TERT* の発現上昇と関連するゲノム異常。*TERT* の発現レベル (上図) の縦軸は、対数スケールでの *TERT* の発現レベルを表す。各 HCC サンプルについて、黄色は、*TERT* プロモーターの突然変異を示す；薄紫、5 番染色体短腕 (5p) の増加；濃い紫、5p15.33 の局所的増加；赤、*TERT* 融合遺伝子；黒、*TERT* プロモーターの近傍の B 型肝炎ウイルスのゲノム挿入；緑、特定のゲノム異常の未検出

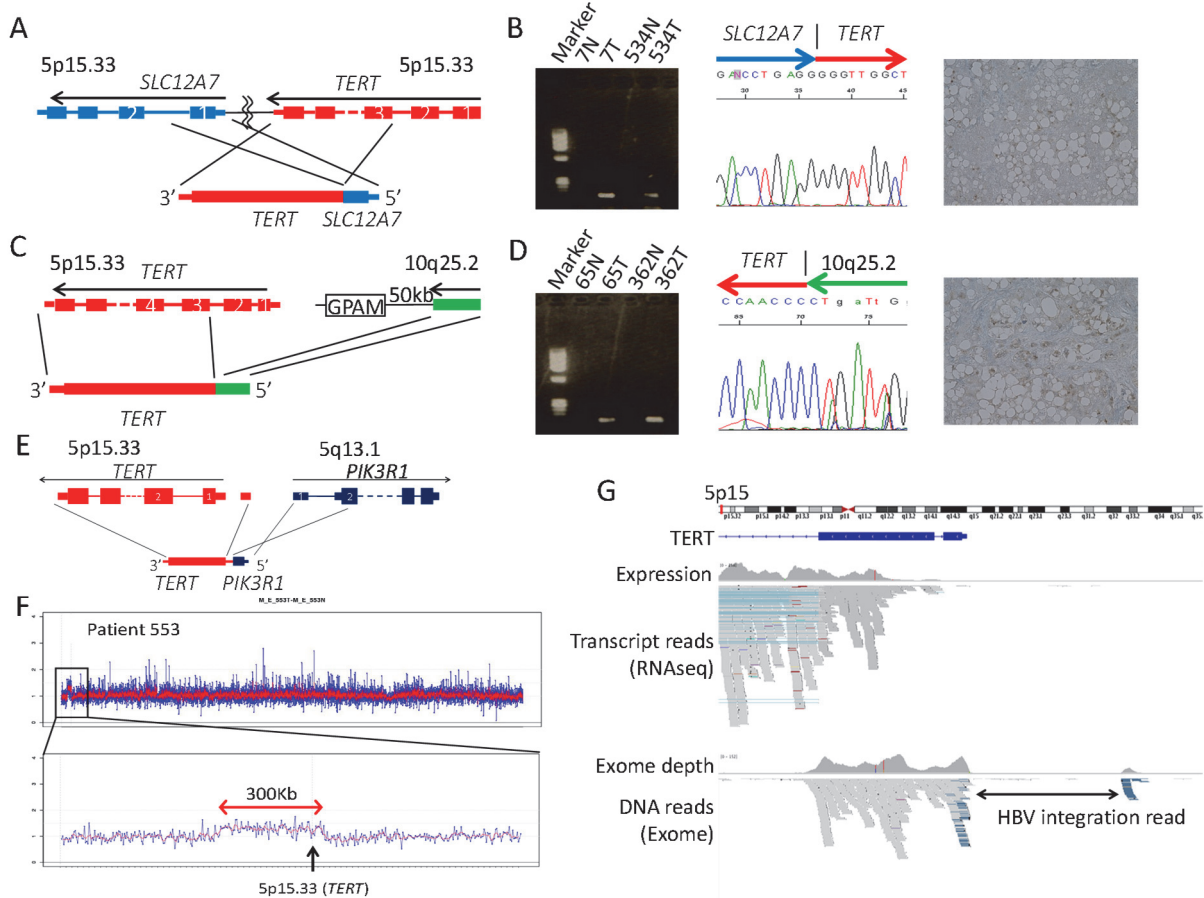


図 2-10. 腫瘍特異的な *TERT* の発現上昇と関連するゲノム異常。A. 5p における染色体  
 内ゲノム再構成の模式図。B. 腫瘍 (T) および非がん肝組織 (N) における *SLC12A7-TERT*  
 融合転写物の RT-PCR 解析。 *SLC12A7-TERT* 融合転写物を保有する症例#7 の HCC 細胞に  
 における融合転写物の配列クロマトグラフィー及び *TERT* の C 末端部分の免疫組織化学染色を  
 示す。C. 5p と 10q の間の転座の模式図と、D. 症例#65 の腫瘍 (T) および非がん肝組織 (N)  
 の融合転写物の RT-PCR 解析、配列クロマトグラフィー、及び *TERT* の C 末端部分の免疫組  
 織化学染色像。E. 5p15.33 と 5q13.1 間の染色体内逆位の模式図。F. *TERT* 近傍の 5p の染  
 色体および局所増幅。Exome 配列データを用いてコピー数解析を行ったところ、9 例 (17.3%)  
 の early HCC および 14 例 (12.9%) の overt HCC で、*TERT* 近傍の 5p15.33 での 300kbp  
 程度の領域で局所ゲノムコピー数増加が認められた ( $p=0.477$ )。下図の矢印は *TERT* 部位を  
 示す。G. B 型肝炎ウイルス (HBV) DNA の *TERT* プロモーターの近へのウイルスゲノム挿  
 入が、early HCC 1 例 (1.9%) と overt HCC 4 例 (3.7%) において検出された ( $p=0.999$ )。  
 矢印は *TERT* プロモーター付近の HBV の挿入領域を示す。上段、トランスクリプトーム配  
 列、下段、エクソーム配列。

## DNA のメチル化プロファイリングによる HCC の分類

肝細胞がん 160 サンプルの DNA メチル化プロファイルデータの非負値行列因数分解 (NMF) により、以下の G1~G4 の 4 クラスタに最も安定的に分けられた。G1、正常タイプ DNA メチル化プロファイル、G2、グローバル高メチル化、G3、ステム様メチル化、G4、CpG アイランド メチル化、の 4 つのグループに分類された (図 2 - 1 1 A)。切除病変の周辺非がん部の肝組織では、ほとんどの CpG アイランドは非メチル化状態であったが、G2 および G3 では非 CpG アイランドの脱メチル化が認められた。G1 を除いて、より多くの部位が CpG アイランド内で高メチル化されていた。G1 では *TP53* (30.7%) と Wnt 経路遺伝子 (35.8%) の遺伝子変異が頻発していた。一方、G2 では、*CTNNB1* (early HCC で 35.0%、overt HCC で 57.1%) と *TP53* (early HCC で 30.0%、overt HCC で 23.8%) の遺伝子変異が early HCC でも頻発していた。G3 では early HCC はこのグループに含まれていなかったため、HCC の発生は *de novo* であると考えられた。G3 の HCC サンプルは、*TET1* および *EZH2* 遺伝子の発現亢進および *TP53* 変異の高頻度 (48.0%) によって濃縮されていた。G4 の HCC サンプルの CpG アイランドは他のグループと比較してメチル化度が高く、*TP53* (43.4%) と *CTNNB1* (52.1%) の変異を頻繁に保有していた。B 型肝炎ウイルスによる感染症例は、G1 では 33.3% と他のグループと比較して有意に多かった ( $p=0.011$ ) が、その他の顕著な臨床的特徴は認められなかった。中央値 2.5 年 (範囲 : 0.3~10.1) の追跡期間後、G1、G2、G3、および G4 の overt HCC 患者の 3 年全生存率はそれぞれ 73.4%、93.7%、52.1%、および 71.7% であり、G2 の全生存期間は有意に長く (予後良好)、G3 の全生存期間は有意に短かった (予後不良 ;  $p=0.028$  ; 図 2 - 1 1 B)。

ゲノム異常の逐次的な変化について検証するために、内側の結節 (overt HCC) が外側の結節 (early

HCC ; 図 2 - 1 2 A) から発生した 8 つの NIN サンプルを用いて、エピジェネティックおよびトランスクリプトームの変化を調べた。NIN 8 症例の DNA メチル化プロファイル解析では、同一患者由来の outer-inner ペアの類似度 (Euclidean distance based) は 0.996~0.765 に分布し、全てのペアは 196 サンプルのクラスタリング内で最も近接して配置された (図 2 - 1 2 B, C)。一方、遺伝子発現プロファイルでは、NIN 症例における outer-inner nodule 間で発現差がみられ (図 2 - 1 2 D)、outer nodule は early HCC のクラスタに、inner nodule は overt HCC のクラスタに含まれる傾向があった。

これらのデータをまとめると、early HCC では Wnt および p53 経路のドライバー遺伝子の変異が高頻度で認められ、overt HCC ではこれらの経路の下流遺伝子が顕著に発現亢進していたが、early HCC のバルク組織での解析では overt HCC と同じ遺伝子群の発現亢進は認められず、別の標的遺伝子或いは機能があることが示唆された。すなわち、HCC の進行に伴う Wnt 経路の異常な転写活性化と p53 経路の不活性化には、DNA メチル化変化などの局所的エピゲノム異常が追加の分子イベントとして必要であることが示唆された。さらに、TERT の発現亢進は、HCC における最も頻度の高い早期イベントであった (図 2 - 1 3)。

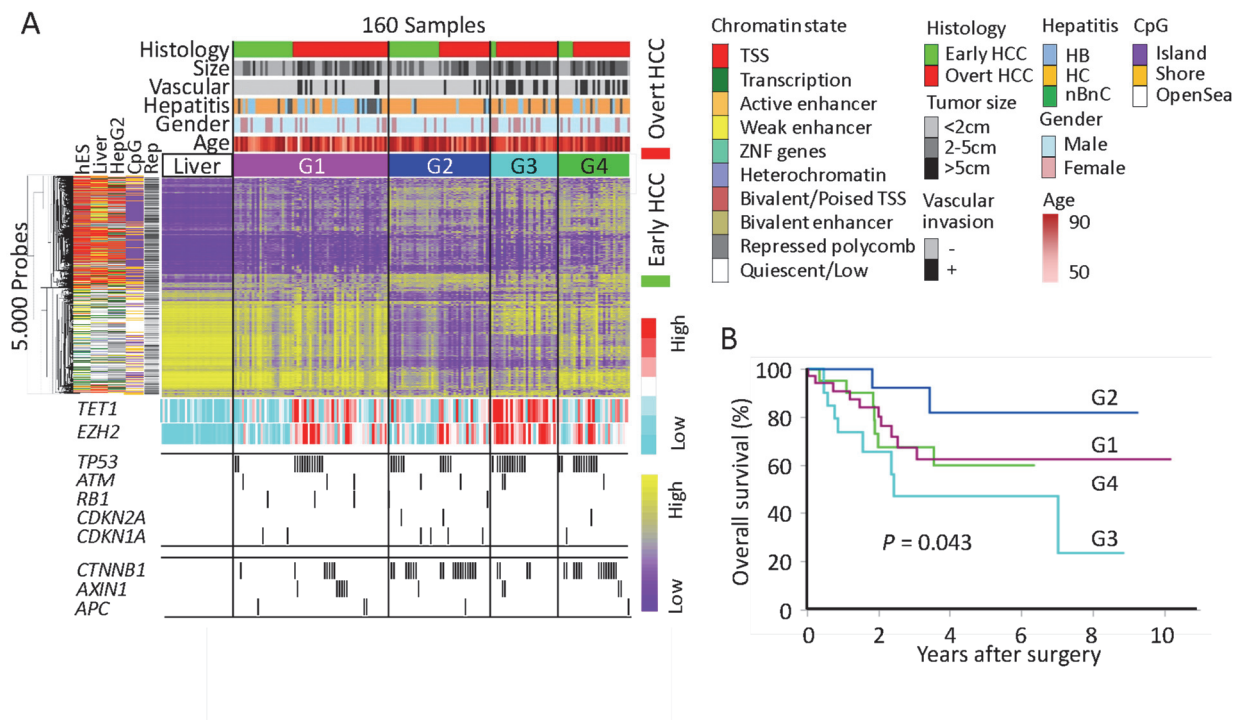


図 2-11. メチル化状況に基づく HCC の分類。A. 31 の慢性肝疾患と 160 の HCC のメチル化のランドスケープ。β 値の SD 上位 5,000 個の CpG プローブを解析に用いた。患者の特徴を上記、クロマチンの状態を左にそれぞれ示す。下、p53/RB および WNT シグナル伝達経路の遺伝子変異と TET1 および EZH2 遺伝子の発現。hES、ヒト胚性幹細胞；Rep、DNA 複製タイミング。B. overt HCC 患者 108 人の全生存期間。G3 の患者の全生存期間は有意に短く、G2 の患者の全生存期間は有意に長かった ( $p = 0.028$ )。

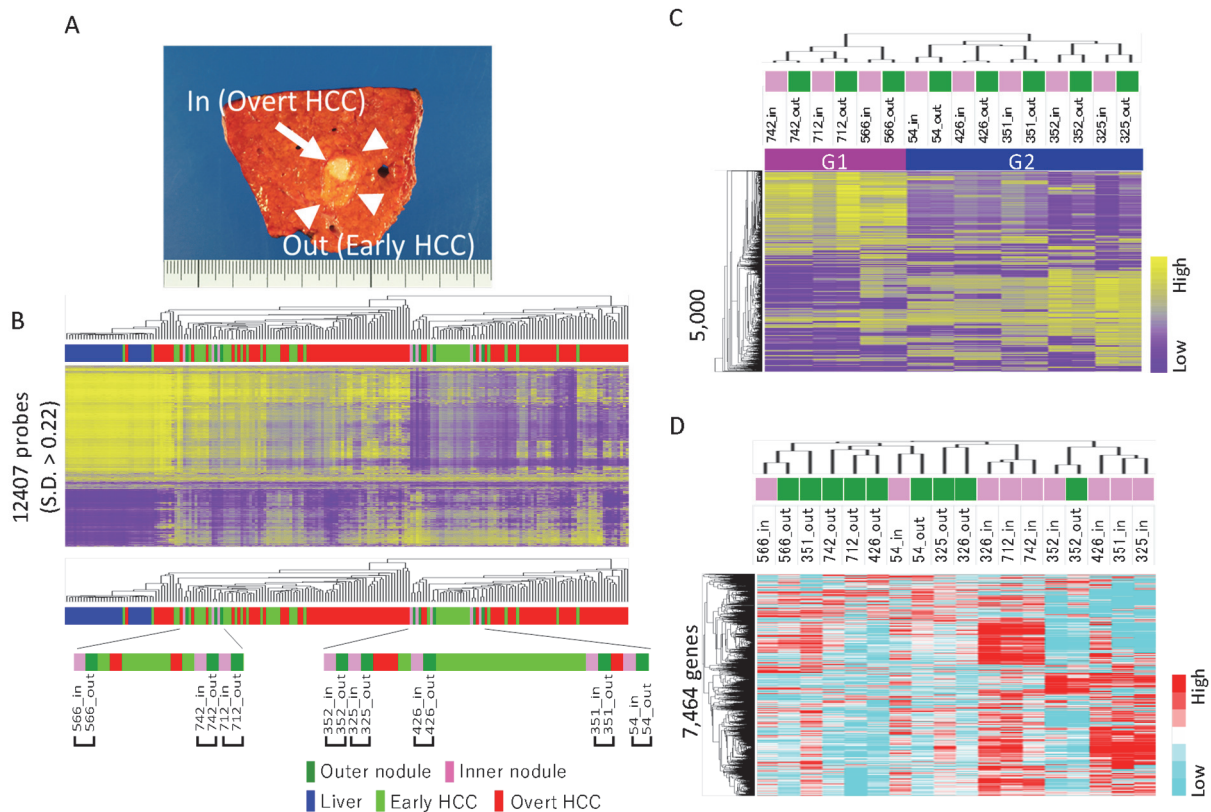


図 2-12. 結節内結節 (Nodule-in-Nodule) を呈する HCC における DNA メチル化と遺伝子発現

A. NIN サンプルの巨視的所見；外側 (矢印) および内側 (矢印) の結節は、それぞれ early HCC および overt HCC に対応する。Early HCC サンプル 52 例のうち、8 例は内側の結節を含んでおり結節内結節 (NIN) 像を示していた。B. NIN8 症例を含む HCC および非がん部の DNA メチル化の階層的クラスタリングの結果。同一患者由来の NIN のすべての症例で外側 (out) と内側 (in) 結節の DNA メチル化は隣り合ってクラスタリングされた。C. 8 組の NIN の DNA メチル化の階層的クラスタリング。各行は CpG プロブに対応し、列は異なる検体に対応している。D. 8 組の NIN の遺伝子発現の階層的クラスタリング。各遺伝子の発現レベルはサンプル間で正規化されており、値は相対的なスケールで示されている。

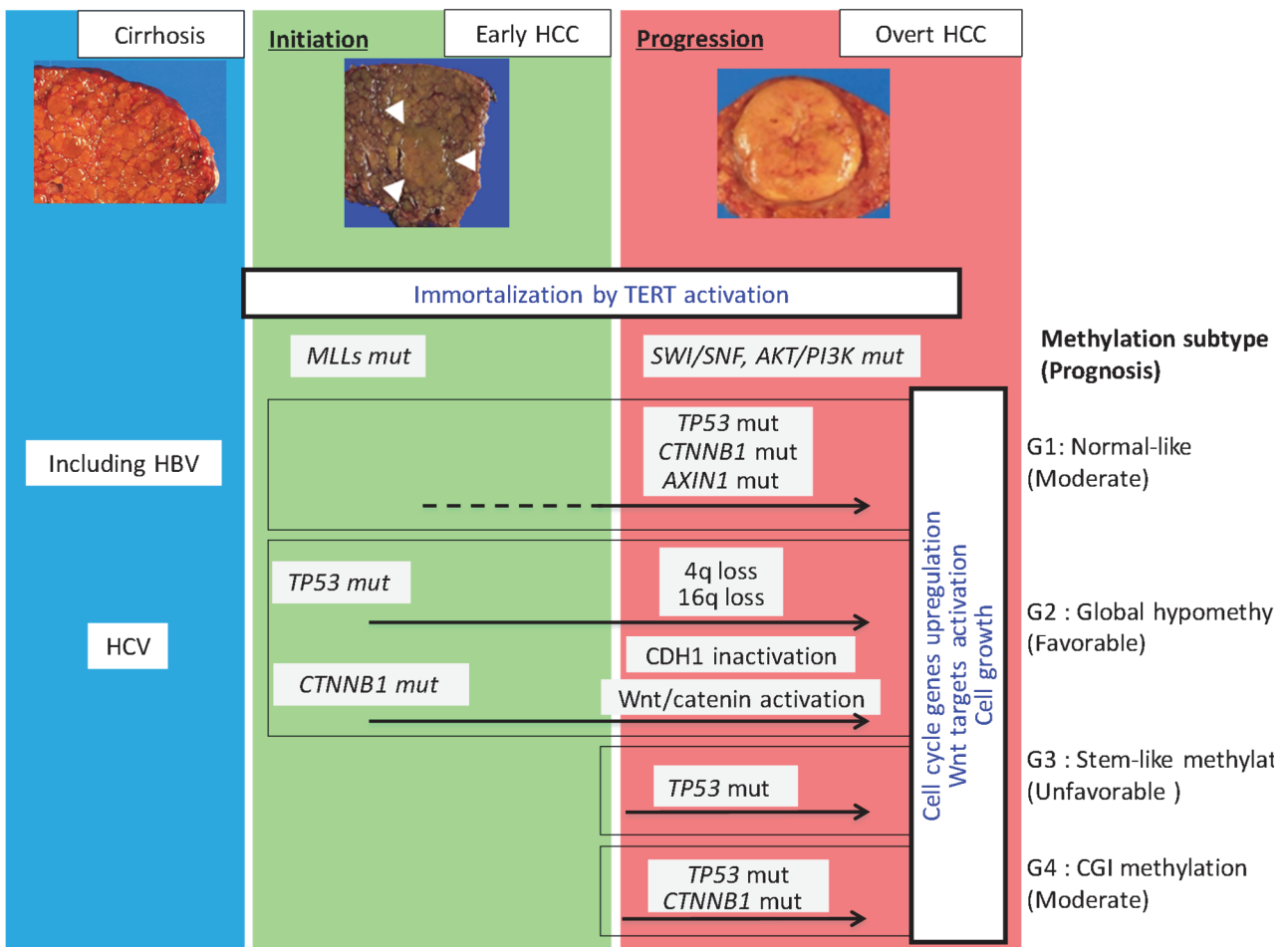


図 2 - 1 3 . 肝細胞がんの進行におけるシグネチャー異常の概念。肝がんの進行における分子異常をメチル化状態に基づいた層別化。



## 2-5 考察

遺伝子発現データからの知見は、early HCC の増殖速度の遅さや低悪性度といった臨床的特徴を反映しており(27)、幾つかの遺伝子変異が生じることで、early HCC から overt HCC への形態的変化をもたらしていると示唆された。一方で、ゲノムワイドな DNA メチル化状態は HCC の発生から進展まで維持されていた。ゲノムコピー数変化については、第 1 章の SNP アレイ解析結果に対する決定木解析で同定した染色体コピー数変化 4 領域を用いて、第 2 章のコホートについて early/overt の識別ができるか判定を行ったところ、第 1 章で別コホートで検討した結果 (86.8%) に比べて第 2 章のコホートでの正答率 (75%) が低くなっていたが、Exome 解析を行った 108 例の overt HCC のコホートで、5q 増幅の頻度が低かったことが要因となっていた。また、SNP アレイに比べ Exome では測定方法の違い (例えば、遺伝子領域に限定されること、ゲノム DNA 増幅やキャプチャによりサンプル間、領域ごとのバイアスが生じ易い、など) によりコピー数解析のノイズが多く、染色体コピー数変化の検出感度が低下した可能性もある。また、Early HCC の症例数が第 1 章の 14 例に対して第 2 章の 52 例と多くなったことで、感度が変わっていることなどが影響したと考えられる。

NGS データに基づく HCC ゲノム解析に関するこれまでの報告では、Wnt および p53/RB 経路の遺伝子変異が一般的であり(13)(28)(29)、これらのドライバー変異は early HCC でも同等の頻度で認められることが示された。大腸がん形成の多段階遺伝モデル(30)における APC 変異と同様に、overt HCC の形成には、ドライバー遺伝子の変異に加えて、段階的な遺伝子変異が必要であると考えられるが、進展に伴い変化する遺伝子発現やゲノムコピー数変化とは異なり、主要なドライバー遺伝子変異は発がんの初期段階で既に一定頻度で生じていることが示唆された。

しかしながら、early HCC では *CTNNB1* および *TP53* 遺伝子に高頻度で変異が見られるにもかかわらず、既知の Wnt 標的遺伝子および p53/RB 経路下流の標的遺伝子（細胞周期関連遺伝子）は発現亢進していない。*CTNNB1* 変異の early HCC における機能としては、幹細胞性 (Stemness) への関与、免疫回避、の2つの仮説が考えられる。まず幹細胞性については、Wnt/beta-catenin シグナルは細胞増殖、細胞分化、幹細胞維持などの多様な細胞機能に関与していることが知られており、肝細胞がんをはじめ、幾つかかのがん種において Wnt シグナルが幹細胞の維持に関連することが報告されている(31)。early HCC ではがん幹細胞において *CTNNB1* 変異が Stemness 維持に関与して活性化されるが、分化が一定程度進んだ細胞では抑制されることで、分化した細胞が大多数を占めるバルクでの RNA-seq 解析では Wnt シグナル下流遺伝子の発現亢進は全体としては検出されない、つまり幹細胞と分化細胞のエピゲノムの状態が異なるつまり不均一性をもったヘテロな細胞集団であると考えられる。HCC バルク RNA-seq 解析からは、分化後の正常肝細胞で高発現となる *ALB* などの遺伝子発現レベルは overt HCC では発現が下がっているのに対して、early HCC では高く維持されており、組織全体としての細胞マジョリティは、分子レベルでも組織学的にも高分化であると考えられた (図 2 - 6 G)。2 つ目の仮説である免疫抑制への関与について、最近、肝臓がんにおいてカテニン変異が免疫回避と関連する、あるいは Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達の活性化変異を有する HCC は、免疫チェックポイント阻害剤の効果反応が低いと報告されている(32)(24)。即ち、初期のがん細胞において *CTNNB1* が変異することより免疫細胞からの攻撃をすり抜けることで生き延びることができる可能性が示唆されている。さらに、overt HCC における *AXIN1* 変異 (図 2 - 6) も同様に免疫回避への関与の可能性が考えられる。*CTNNB1* 変異で顕著に発現亢進する遺伝子群が *AXIN1* 変異では亢進していないが、*CTNNB1* と同じ Pathway で結合

パートナーである *AXIN1* が変異する症例では、early HCC 症例における *CTNNB1* 変異と同様に免疫回避へ関連するかもしれない。本研究の遺伝子発現解析で免疫回避に関連する遺伝子が検出されない要因としては、免疫回避に関連する  $\beta$  カテニンの下流遺伝子は「免疫細胞への応答時にのみ一過性に活性化する」と仮定した場合、常に免疫細胞とがん細胞が反応している状態ではないことや、臨床組織から肝がん組織を採取する時に背景肝の非腫瘍細胞の混入を避けるためがん組織の中心部をバイオマーカー測定に用いるため、免疫細胞と相互作用する肝がん細胞は少なく、結果として免疫関連の遺伝子変動を検出されなかった可能性がある。

またその他の注目すべき点として、Wnt 経路の発現変化が、*CDH1* の転写レベルの低下および標的遺伝子の CpG アイランドの脱メチル化と関連していた(33)。細胞膜の E-カドヘリン/ $\beta$  カテニン複合体は、上皮の完全性と適切な細胞骨格構造の維持に重要な役割を果たしていることは一般的に知られているが、この複合体が破壊されると、組織内の細胞接着が損なわれるだけでなく、核内の  $\beta$  カテニンの蓄積により Wnt 経路が活性化される(23)(34)。メチル化の低下は、がん細胞における転写活性化の結果である可能性があることから(35)(36)、Wnt 標的のプロモーター領域のメチル化の低下は、overt HCC における *CDH1* の発現低下により、これらの遺伝子の過剰発現に起因していると考えられる。一方、免疫染色では、*CTNNB1* 変異を有する overt HCC では核内で強い免疫活性を示したが、early HCC では認められなかった。また、*CTNNB1* と *AXIN1* の標的遺伝子は、Wnt 経路標的の制御に関して異なり、例えば、破壊複合体の不活性化による Wnt 経路異常と  $\beta$ -カテニンの活性化による Wnt 経路異常が異なることが Feng ら(22)の実験データと一致していることが示された。

また、TP53 標的遺伝子の転写異常と、4q、16q の欠失は高頻度で共存することが観測された。4q

染色体上の *IRF2* は MDM2 と結合し MDM2 による p53 抑制阻害と拮抗するとの報告があり(37)、overt HCC 108 例中 2 症例と頻度は少ないながらも検出された *IRF2* を含むゲノム領域のホモ欠失は、以前の報告(38)と同様に *TP53* 変異と重複がなかったことから、*IRF2* が p53 の不活性化に関与している可能性が示唆された。

ポリコム抑制複合体 2 (PRC2) の酵素的構成要素であり、重要なエピジェネティック・レギュレーターである *EZH2*(39)は、overt HCC における p53 経路の下流で発現亢進した遺伝子の一つであった。*EZH2* は PRC2 のメチル化活性に関与しており、その発現の増加は様々なタイプのがんと関連している(40)(41)ことから、*TP53* に変異を持つがん細胞は、*EZH2* の発現が亢進することでがんが進行し術後の生存期間が短くなる可能性が示唆された。

*TERT* は、いくつかのメカニズムのいずれかに起因して、early HCC および overt HCC の両方において最も頻繁に活性化される遺伝子であった。*TERT* と融合遺伝子を形成する 5' パートナー遺伝子またはゲノム領域の転写はユビキタスに (肝臓および肝細胞がんで) 発現亢進していたことから、これらの異常に再構成されたプロモーターは *TERT* の実質的な発現亢進を引き起こす可能性がある。頻繁な *TERT* プロモーターの突然変異は、多様ながん種においても報告されているが(42)(43)、*TERT* 遺伝子座への B 型肝炎ウイルスの統合は、HCC に特有なものの一つである(44)(45)。5p15.33 の局所増加、遺伝子融合、B 型肝炎ウイルス挿入による *TERT* 発現亢進は、*TERT* プロモーター変異や 5p の染色体増加に比べて極めて顕著であり、ゲノム構造の変化がより強力に発現レベルが亢進されることが示唆された。

遺伝子発現プロファイリングとは対照的に、early HCC および overt HCC サンプルは、メチレーションプロファイリングによって明確に区分されなかった。これまでの報告および本研究結果から

は、HCC サンプルが、G1（正常様クラスター）を含む3－5種のエピジェネティッククラスターに分類され得ることを示した。G1 および G3 を除いて、異なるメチル化された CpG 部位の大部分は、近位プロモーター領域内に位置していた。逆に、CpG アイランドは、G2（全体的な低メチル化タイプ）および G3 の両方でメチル化レベルが低かった。予後解析においては、G2 の overt HCC 症例と比較すると、G3 では全生存率は有意に低かった。これは、G3 では *TET1* を含む幹細胞マーカーの発現が亢進していたことから、幹細胞様遺伝子セットの活性化の違いから浸潤性肝腫瘍と転移性肝腫瘍の違いが生じたためかもしれない(46)。したがって、*TET1* の発現亢進によるリプログラミングの誘導や、*EZH2* の過剰発現による PRC2 の過剰活性化は、G3 の患者の HCC の進行や予後不良に寄与する可能性がある。逆に、*CTNNB1* 遺伝子の変異は G2 でより一般的であり、*CTNNB1* 変異を有する患者の予後は比較的良好であるという以前の報告と一致していた(47)。

また、NIN サンプルの内側結節（overt HCC）と外側結節（early HCC）のメチル化プロファイルと比較することで確認されたように、メチル化状態は HCC の進行を通じてグローバルに維持されていた。これらの知見は、がんの進行において、将来の世代に遺伝するいくつかのタイプの起源のがん細胞が存在することを示唆しており、内側結節と外側結節の間の遺伝子発現プロファイルの違いは、early HCC と overt HCC の表現型を反映していることを示唆する。

## 2-6 結論

肝細胞がんの腫瘍進化を研究するため、early HCC 52 症例と overt HCC 108 例について、全エクソン解析、全トランスクリプトーム解析、DNA メチル化プロファイルの包括解析を行った。遺伝子変異プロファイルとしては、*TERT*、*CTNNB1*、*TP53* の遺伝子異常は early HCC の時点で進

行がんと同程度の高頻度で観察されたが、遺伝子発現レベルでは、early HCC は overt HCC とは別のプロファイルを示した。*CTNNB1* 変異症例の Overt HCC において観察される下流遺伝子の発現亢進は、early HCC のバルク組織の RNA-seq 解析では発現が誘導を認めず、また CTNNB1 タンパク質の核内移行も認められなかった。さらに SWI/SNF 複合体や mTOR/AKT/PI3K パスウェイの遺伝子変異は early HCC では頻度が低いことから、これらのパスウェイやエピゲノム制御の変化を伴う遺伝子発現の変化が、肝細胞がんの進展の一端を担っていることが示唆された。

## 参考文献

1. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: Lessons from large-scale biology [Internet]. Vol. 300, Science. Science; 2003 [cited 2020 Sep 27]. p. 286–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12690187/>
2. Midorikawa Y, Yamamoto S, Ishikawa S, Kamimura N, Igarashi H, Sugimura H, et al. Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene*. 2006;25(40):5581–90.
3. Midorikawa Y, Yamamoto S, Tsuji S, Kamimura N, Ishikawa S, Igarashi H, et al. Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2009 Feb;49(2):513–22.
4. Midorikawa Y, Yamamoto S, Tatsuno K, Renard-Guillet C, Tsuji S, Hayashi A, et al. Accumulation of molecular aberrations distinctive to hepatocellular carcinoma progression. *Cancer Res* [Internet]. 2020 [cited 2020 Sep 28];80(18):canres.0225.2020. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32641413/>
5. Anstee QM, Reeves HL, Kotsiliti E, Govaere O, Heikenwalder M. From NASH to HCC: current concepts and future challenges [Internet]. Vol. 16, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2020 Oct 12]. p. 411–28. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41575-019-0145-7>
6. Ishikawa S, Komura D, Tsuji S, Nishimura K, Yamamoto S, Panda B, et al. Allelic dosage analysis with genotyping microarrays. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333(4):1309–14.
7. Nishida N, Fukuda Y, Kokuryu H, Sadamoto T, Isowa G, Honda K, et al. Accumulation of allelic loss on arms of chromosomes 13q, 16q and 17p in the advanced stages of human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* [Internet]. 1992 Jul 30 [cited 2020 Oct 24];51(6):862–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910510605>
8. Wong N, Lai P, Lee SW, Fan S, Pang E, Liew CT, et al. Assessment of genetic changes in hepatocellular carcinoma by comparative genomic hybridization analysis: Relationship to disease stage, tumor size, and cirrhosis. *Am J Pathol* [Internet]. 1999 [cited 2020 Oct 24];154(1):37–43. Available from: </pmc/articles/PMC1853447/?report=abstract>
9. Ho MKS, Lee JMF, Chan CKL, Ng IOL. Allelic alterations in nontumorous liver tissues and corresponding hepatocellular carcinomas from chinese patients. *Hum Pathol*. 2003 Jul 1;34(7):699–705.
10. Freedman GM, Hanlon AL, Fowble BL, Anderson PR, Nicolau N. Recursive partitioning identifies patients at high and low risk for ipsilateral tumor recurrence after breast-conserving surgery and radiation. *J Clin Oncol* [Internet]. 2002 Oct 1 [cited 2020 Oct 24];20(19):4015–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12351599/>

11. Jiang F, Desper R, Papadimitriou CH, Schäffer AA, Kallioniemi O-P, Richter J, et al. Construction of Evolutionary Tree Models for Renal Cell Carcinoma from Comparative Genomic Hybridization Data. *Cancer Res.* 2000;60(22).
12. Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, et al. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet.* 2011 May;43(5):464–9.
13. Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, et al. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014;46(12).
14. Huang K lin, Mashl RJ, Wu Y, Ritter DI, Wang J, Oh C, et al. Pathogenic Germline Variants in 10,389 Adult Cancers. *Cell.* 2018;355–70.
15. Homer N, Nelson SF. Improved variant discovery through local re-alignment of short-read next-generation sequencing data using SRMA. *Genome Biol [Internet].* 2010 Oct 8 [cited 2021 Jan 1];11(10):R99. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2010-11-10-r99>
16. Getz G, Höfling H, Mesirov JP, Golub TR, Meyerson M, Tibshirani R, et al. Comment on “The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers” [Internet]. Vol. 317, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2007 [cited 2020 Oct 24]. p. 1500–1500. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/317/5844/1500.2>
17. de Hoon MJL, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics [Internet].* 2004 Jun 12 [cited 2021 Jan 1];20(9):1453–4. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bth078>
18. Midorikawa Y, Yamamoto S, Tsuji S, Kamimura N, Ishikawa S, Igarashi H, et al. Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2009;49(2):513–22.
19. Taylor AM, Shih J, Ha G, Gao GF, Zhang X, Berger AC, et al. Genomic and Functional Approaches to Understanding Cancer Aneuploidy. *Cancer Cell [Internet].* 2018 Apr 9 [cited 2021 Apr 5];33(4):676-689.e3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.007>
20. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell.* 2017 Jun;169(7):1327-1341.e23.
21. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 2005 Oct 25 [cited 2020 Oct 24];102(43):15545–50. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506580102](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506580102)
22. Feng GJ, Cotta W, Wei XQ, Poetz O, Evans R, Jardé T, et al. Conditional disruption of Axin1 leads to development of liver tumors in mice. *Gastroenterology.* 2012;



23. Kim E, Lisby A, Ma C, Lo N, Ehmer U, Hayer KE, et al. Promotion of growth factor signaling as a critical function of  $\beta$ -catenin during HCC progression. *Nat Commun* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2020 Oct 24];10(1). Available from: [/pmc/articles/PMC6478918/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34981111/)
24. Fujita M, Yamaguchi R, Hasegawa T, Shimada S, Arihiro K, Hayashi S, et al. Classification of primary liver cancer with immunosuppression mechanisms and correlation with genomic alterations. *EBioMedicine* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2021 Mar 6];53. Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>
25. Sun JH, Luo Q, Liu LL, Song G Bin. Liver cancer stem cell markers: Progression and therapeutic implications [Internet]. Vol. 22, *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co; 2016 [cited 2021 Apr 19]. p. 3547–57. Available from: [/pmc/articles/PMC4814640/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28814640/)
26. Ally A, Balasundaram M, Carlsen R, Chuah E, Clarke A, Dhalla N, et al. Comprehensive and Integrative Genomic Characterization of Hepatocellular Carcinoma. *Cell*. 2017;169(7):1327-1341.e23.
27. Midorikawa Y, Takayama T, Shimada K, Nakayama H, Higaki T, Moriguchi M, et al. Marginal survival benefit in the treatment of early hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2020 Oct 24];58(2):306–11. Available from: <http://www.journal-of-hepatology.eu/article/S016882781200757X/fulltext>
28. Fujimoto M, Mano Y, Anai M, Yamamoto S, Fukuyo M, Aburatani H, et al. Epigenetic alteration to activate Bmp2-Smad signaling in Raf-induced senescence. *World J Biol Chem*. 2016 Feb;7(1):188–205.
29. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nat Publ Gr*. 2015;47(5).
30. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis [Internet]. Vol. 61, *Cell*. Elsevier; 1990 [cited 2020 Oct 24]. p. 759–67. Available from: <http://www.cell.com/article/009286749090186I/fulltext>
31. Wang R, Sun Q, Wang P, Liu M, Xiong S, Luo J, et al. Notch and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway play important roles in activating liver cancer stem cells. *Oncotarget* [Internet]. 2016 [cited 2021 Mar 6];7(5):5754–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26735577/>
32. Harding JJ, Nandakumar S, Armenia J, Khalil DN, Albano M, Ly M, et al. Prospective genotyping of hepatocellular carcinoma: Clinical implications of next-generation sequencing for matching patients to targeted and immune therapies. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2021 Mar 6];25(7):2116–26. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>
33. Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, et al. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat*

- Genet [Internet]. 2000 Sep [cited 2020 Oct 24];26(1):16–7. Available from: [https://www.nature.com/articles/ng0900\\_16](https://www.nature.com/articles/ng0900_16)
34. Efsthathiou JA, Liu D, Wheeler JMD, Kim HC, Beck NE, Ilyas M, et al. Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999 Mar 2 [cited 2020 Oct 24];96(5):2316–21. Available from: [/pmc/articles/PMC26781/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10551111/)
  35. Heyn H, Vidal E, Ferreira HJ, Vizoso M, Sayols S, Gomez A, et al. Epigenomic analysis detects aberrant super-enhancer DNA methylation in human cancer. *Genome Biol* [Internet]. 2016 Dec 26 [cited 2020 Oct 24];17(1):11. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-016-0879-2>
  36. Sérandour AA, Avner S, Percevault F, Demay F, Bizot M, Lucchetti-Miganeh C, et al. Epigenetic switch involved in activation of pioneer factor FOXA1-dependent enhancers. *Genome Res* [Internet]. 2011 Apr [cited 2020 Oct 24];21(4):555–65. Available from: [/pmc/articles/PMC3065703/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21411111/)
  37. Pettersson S, Kelleher M, Pion E, Wallace M, Ball KL. Role of Mdm2 acid domain interactions in recognition and ubiquitination of the transcription factor IRF-2. *Biochem J* [Internet]. 2009 Mar 15 [cited 2020 Oct 24];418(3):575–85. Available from: [/biochemj/article/418/3/575/44874/Role-of-Mdm2-acid-domain-interactions-in](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18811111/)
  38. Guichard C, Amaddeo G, Imbeaud S, Ladeiro Y, Pelletier L, Ben Maad I, et al. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2012;6(6).
  39. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* [Internet]. 2006 Feb 16 [cited 2020 Oct 24];439(7078):871–4. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature04431>
  40. Zhao Y, Ding L, Wang D, Ye Z, He Y, Ma L, et al. EZH 2 cooperates with gain - of - function p53 mutants to promote cancer growth and metastasis . *EMBO J* [Internet]. 2019 Mar [cited 2020 Oct 24];38(5). Available from: [/pmc/articles/PMC6396169/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/)
  41. Zingg D, Debbache J, Schaefer SM, Tuncer E, Frommel SC, Cheng P, et al. The epigenetic modifier EZH2 controls melanoma growth and metastasis through silencing of distinct tumour suppressors. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Jan 22 [cited 2020 Oct 24];6(1):1–17. Available from: [www.nature.com/naturecommunications](http://www.nature.com/naturecommunications)
  42. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science (80- )* [Internet]. 2013 Feb 22 [cited 2020 Oct 24];339(6122):959–61. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/339/6122/959>
  43. Rachakonda PS, Hosen I, De Verdier PJ, Fallah M, Heidenreich B, Ryk C, et al. TERT

promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Oct 22 [cited 2020 Oct 24];110(43):17426–31. Available from: [/pmc/articles/PMC3808633/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111111/)

44. Jhunjhunwala S, Jiang Z, Stawiski EW, Gnad F, Liu J, Mayba O, et al. Diverse modes of genomic alteration in hepatocellular carcinoma. *Genome Biol* [Internet]. 2014 Aug 26 [cited 2020 Oct 24];15(8):436. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0436-9>
45. Tatsuno K, Midorikawa Y, Takayama T, Yamamoto S, Nagae G, Moriyama M, et al. Impact of AAV2 and hepatitis B virus integration into genome on development of hepatocellular carcinoma in patients with prior hepatitis B virus infection. *Clin Cancer Res*. 2019;25(20):6217–27.
46. Cairo S, Armengol C, De Reyniès A, Wei Y, Thomas E, Renard CA, et al. Hepatic Stem-like Phenotype and Interplay of Wnt/ $\beta$ -Catenin and Myc Signaling in Aggressive Childhood Liver Cancer. *Cancer Cell* [Internet]. 2008 Dec 9 [cited 2020 Oct 24];14(6):471–84. Available from: <http://www.cell.com/article/S1535610808003693/fulltext>
47. Boyault S, Rickman DS, De Reyniès A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, et al. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2020 Oct 24];45(1):42–52. Available from: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.21467>

# 謝辞

まず最初に、未熟な私が最後まで本論文をまとめられたことは、ひとえに東京大学先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス分野 油谷浩幸教授に諦めずに忍耐強くご指導賜りましたお蔭様に他なりません。心より甚謝申し上げます。また外科の緑川泰先生（現日本大学医学部消化器外科）には、十余年の長きに渡り根気強く熱意のこもったご指導ご鞭撻を賜り、更に日頃より多大なるお力添えをいただきましたこと、心より感謝申し上げます。加えて、緑川先生が長年に渡り収集されている貴重な検体をご提供くださった患者様にも深謝いたします。

また本研究を進めるにあたり、以下の先生方に特に多大なる御協力を賜りましたことを深謝いたします。皆様のご協力なくては成し得なかった研究成果を、このような形でまとめさせていただく機会をいただきましたこと、心よりお礼申し上げます。

国立がん研究センター 研究所 がんゲノミクス研究分野

十時泰 先生

東京大学先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス分野

永江玄太 先生、辰野健二 先生、辻真吾 先生

米国ベイラー医科大学

David A. Wheeler 教授

そのほか、ここには挙げきれない多くの共著者の先生方へも感謝の意を表したいと思います。

最後に、日頃より私を支えてくれた妻と子供たちに感謝の気持ちを記したいと思います。

以上