

小児肝芽腫発症に關与する分化制御因子

永江 玄太

1. はじめに

がん細胞には、ゲノムの一次配列や高次構造、クロマチンを含むエピゲノム修飾状態や転写産物などに、正常細胞とは異なるさまざまな量的・質的異常が認められる。次世代シーケンサーの発達により、こうした分子異常の網羅的な解析を大量並列的に行うことが可能となり、がんゲノムアトラス (The Cancer Genome Atlas: TCGA)¹⁾ や国際がんゲノムコンソーシアム (International Cancer Genome Consortium: ICGC)²⁾ など臨床がん組織に蓄積する包括的な分子異常のプロファイルがカタログ化されてきた。新規創薬標的の探索やゲノム情報に基づいた精緻化医療 (precision medicine) への応用が期待されているが、小児にみられるような希少がんでは多数例のコホートでの解析結果がないだけでなく、成人のがんと異なる発がん機序がしばしばみられることから、その解明が十分でない。

本稿では、小児の肝悪性腫瘍で最も高頻度とされる肝芽腫 (hepatoblastoma) に焦点をあて、その包括的なゲノム・エピゲノム解析の実例³⁾ を紹介するとともに、分化制御因子の異常に伴う発がん機序について解説する。

2. 肝芽腫におけるゲノム異常および遺伝子発現異常

肝芽腫にみられる代表的なドライバー遺伝子異常として Wnt シグナルの活性化に重要な β カテニン遺伝子 (*CTNNB1*) が有名だが⁴⁾、これまでは多数例の全エクソンシーケンシング解析 (whole exome sequencing: WXS) の報告がほとんどない状況であった。そこで、筆者らは日本小児肝がんスタディグループでのコホート症例⁵⁾ (JPLT-2) 163 例

の小児肝腫瘍 (肝芽腫 154 例, 肝細胞がん 9 例) について統合的ゲノムプロファイリングを実施した。

全エクソンシーケンシング解析での体細胞変異の総数はエクソン領域で 1Mb あたり 0.52 個と非常に少ない結果であったが、*CTNNB1* や *ARID1A*, *ITPR2*, *APC* など 25 遺伝子のエクソン変異に加えて、テロメラーゼ逆転写酵素 (*TERT*) にプロモーター変異を認めた (図 1A)。この *TERT* 遺伝子は細胞不死化に必須な制御分子であるが、プロモーター変異が遺伝子発現の上昇に關連することが知られており、8 歳以上の肝芽腫に選択的に認められた。

一方、SNP アレイを用いてゲノム高次構造を解析したところ、29% の症例にゲノム不安定性を認め、染色体コピー数の増加 (1q, 2q, 20, 2p, 6p 染色体) と減少 (1p, 4q, 11q 染色体) が確認された。さらに、アリル別でコピー数解析を追加することで 34.2% の症例に染色体 11p の片親性ダイソミー (uniparental disomy: UPD) がみられた。この領域は *H19/IGF2* を含むインプリンティング領域として知られており、*IGF2* の発現上昇が腫瘍細胞の増殖に關わるとされる重要な領域であるだけでなく、肝芽腫をしばしば合併する先天性疾患 Beckwith-Wiedemann 症候群の責任遺伝子座でもある⁶⁾。

肝芽腫組織の多様な細胞学的性質を評価するために、RNA シーケンシングによる遺伝子発現の網羅的解析を実施したところ、コンセンサスクラスタリング解析により三つの遺伝子発現サブタイプ (増殖型, 間葉型, 肝細胞型) が同定された (図 1B)。増殖型遺伝子発現を示す肝芽腫は、細胞周期関連遺伝子 (*CCNB2*, *E2F1*, *MKI67*, *MYCN*) や肝がんの腫瘍マーカー AFP を有意に発現しており、高い細胞増殖活性を示唆するものである。古典的な Wnt 標的遺伝子 (*LGR5*, *TBX3*, *BMP4*, *ASCL2*, *RNF43*, *DKK1*, *SP5*, *NOTUM*, *GPC3*) の発現も高く、*CTNNB1* 変異を高頻度に有している。一方、間葉型遺伝子発現を示す肝芽腫では、T 細胞受容体やマトリックスメタロプロテアーゼ (*MMPs*)、グランザイム (*GZMs*) の発現が高く、免疫細胞の腫瘍内浸潤を示唆している。肝細胞型遺伝子発現を示す肝芽腫では、シトクロム P450 (*CYP*) や UDP グルクロン酸転移酵素 (UDP), メタロチオネインファミリー遺伝子 (*MT*) など成熟した肝細胞代謝に關連する遺伝子が高頻度で発現しており、正常の肝細胞に近い機能を有する分化度の高い腫瘍と考えられた。

東京大学先端科学技術研究センター・ゲノムサイエンス&メ
ディシン分野 (〒154-8904 東京都目黒区駒場4-6-1)

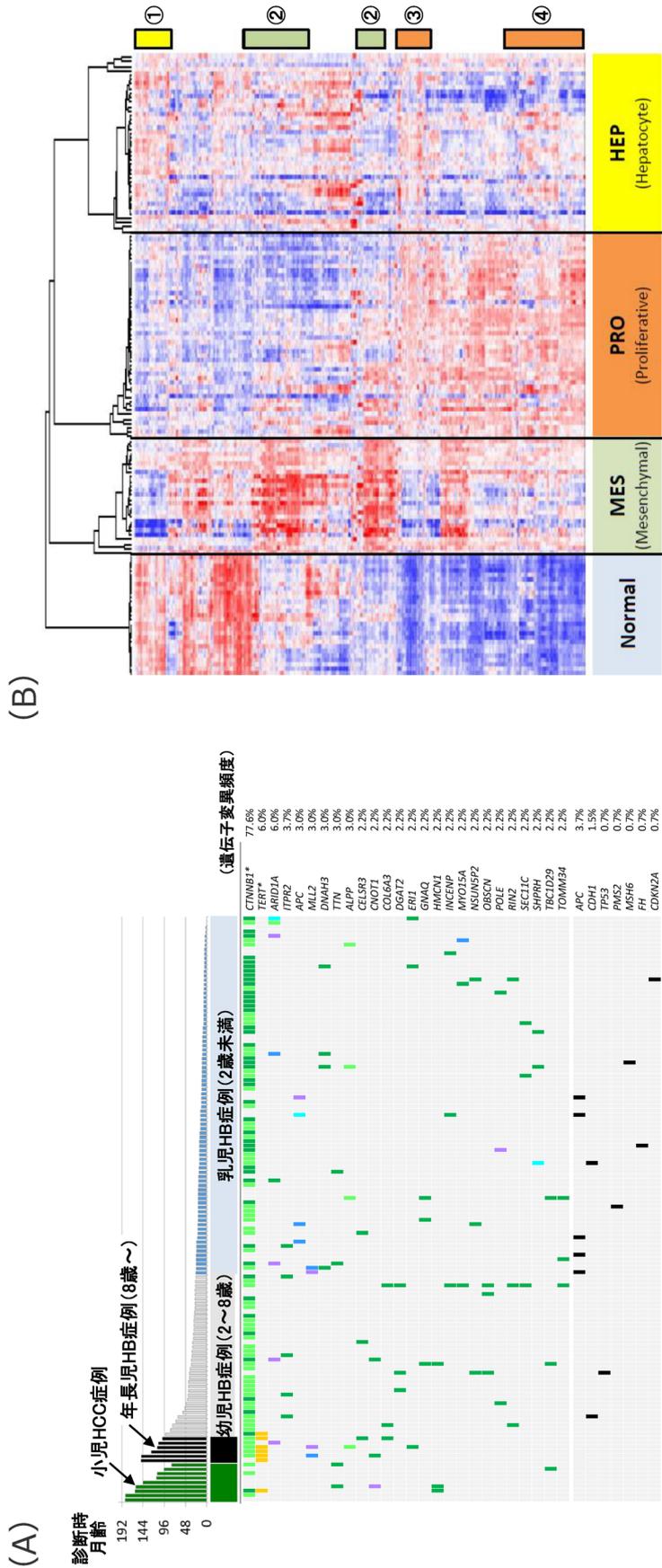
Differentiation regulatory factor related to hepatoblast carcinoma

Genta Nagae (Genome Science and Medicine Laboratory, Research Center for Advanced Science and Technology, the University of Tokyo, 4-6-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo 154-8904, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940438

© 2022 公益社団法人日本生化学会



- ① 成熟肝細胞関連遺伝子 (CYPs, UDPs, MTSs など)
- ② 免疫細胞関連遺伝子 (MMP7, TCR, CXCL1, GZMs, IGHV, CXCL5, CXCL12 など)
- ③ 古典的 Wnt シグナル標的遺伝子 (LGR5, TBX3, BMP4, ASCL2, RNFB43, DKK1, SP5, NOTUM, GPC3 など)
- ④ 細胞周期関連遺伝子 (CCNB2, E2F1, MKI67, MYCN など)

図1 肝芽腫のドライバー遺伝子変異(A)および遺伝子発現異常(B)
 (A) 77.6%の症例にCTNNB1のミスセンス変異あるいはインフレーム欠失を認めた。TERTプロモーター変異は8歳以上の症例に多くみられた。(B) 遺伝子発現パターンで分類すると、肝細胞型、増殖型、間葉型の三つのサブタイプに分かれる(文献3より引用改変)。

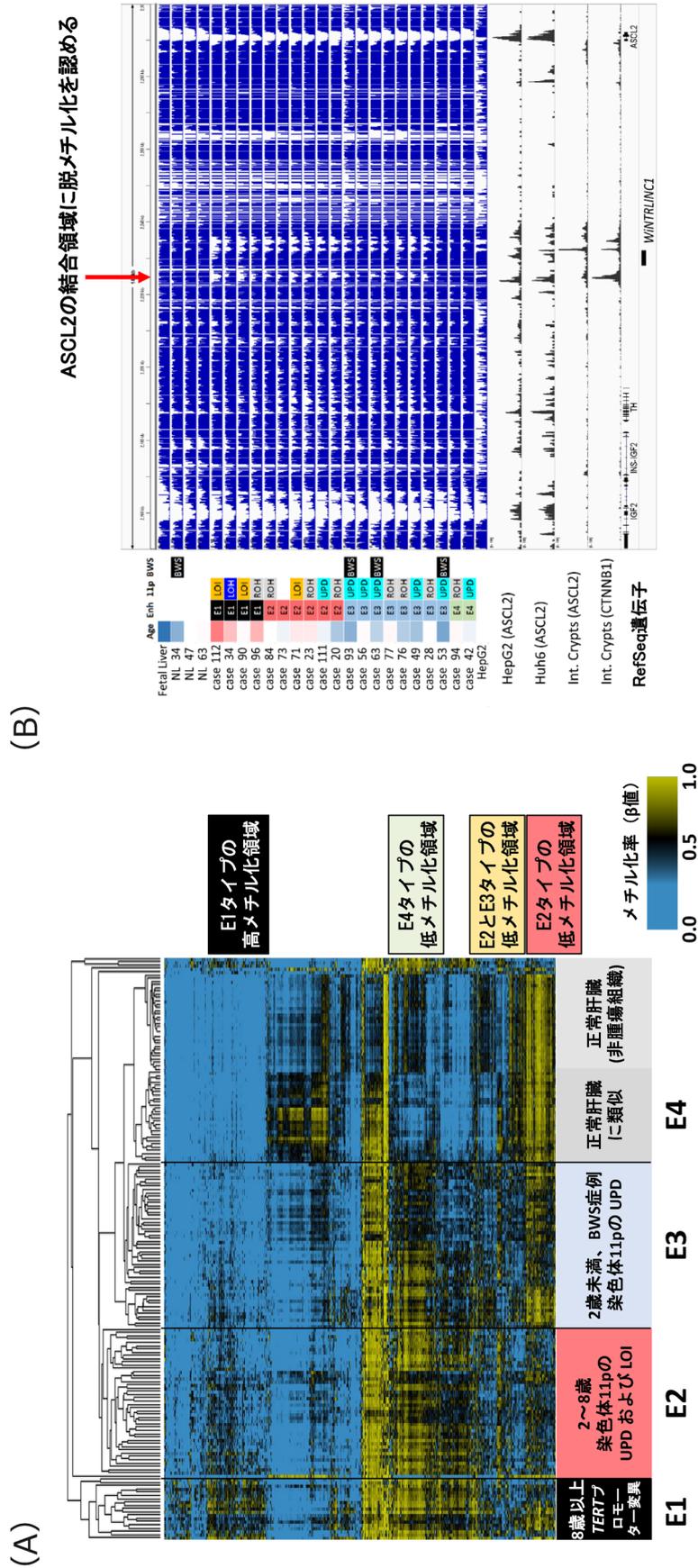


図2 肝芽腫のDNAメチル化異常(A)とASCL2の結合領域(B)
 (A)肝芽腫と正常肝臓の遺伝子発現を調節しているエンハンサー領域についてメチル化によるクラスタリング結果では、8歳以上に多いHCN-NOS型(E1)、小児型(E2)、乳児型(E3)、正常肝臓に類似した型(E4)の四つのサブタイプに分類された。(B)染色体11pのH19/IGF2遺伝子座の近傍に位置するASCL2の上流エンハンサーにCTNNB1とASCL2の結合領域が存在し、この領域は全ゲノムメチル化解析において肝芽腫特異的に脱メチル化している(文献3より引用改変)。

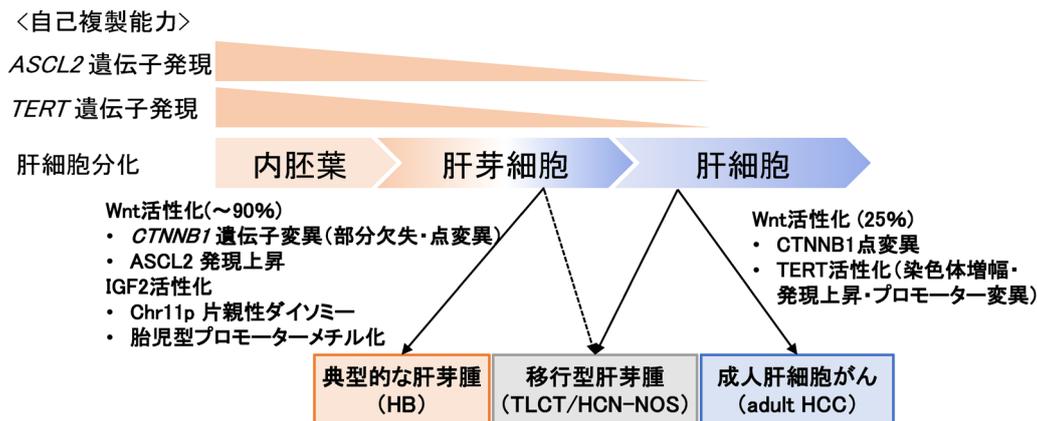


図3 小児肝がんの発生機序

典型的な肝芽腫では90%以上にWntシグナルの活性化がみられ、CTNNB1変異を高率に伴うだけでなく、ASCL2が高発現を示す。成人の肝細胞がんではCTNNB1変異は25%程度であり、TERTプロモーター変異を高率に認める。小児肝芽腫と成人肝細胞がんの移行型を示すHCN-NOSでは、CTNNB1変異およびTERTプロモーター変異を認める(文献3より引用改変)。

3. 肝芽腫におけるエピゲノム異常

上記のようなゲノム異常や遺伝子発現異常は既知の報告とよく合致するものであったが、多様な形質を示す肝芽腫の発がん機序を説明するに十分でないため、DNAメチル化を中心としたエピゲノム解析を実施した。20例の全ゲノムバイサルファイトシーケンス解析(whole genome bisulfite sequencing: WGBS)に加えて、約45万か所のCpG領域を解析できるInfinium HumanMethylation450 BeadChip(Illumina社)を用いて157例の網羅的メチル化解析を行った。

前述のH19/IGF2の遺伝子座において、H19のインプリンティング領域(母方アリルのみ発現)では非がん部肝臓ではヘミメチル化されていたが、UPDやインプリンティング異常(loss of imprinting: LOI)を認める肝芽腫では完全にメチル化されており、肝芽腫の発がん過程で父方のアリルが優先的に選択される可能性が示唆された。一方、ヒトのIGF2では少なくとも五つのプロモーターが存在し、時空間的に厳密に制御されていることが知られている⁷⁾。成人ヒト肝臓特異的プロモーターとして知られるプロモーター1(Pr1)は胎児肝では高度にメチル化されていたが、小児の非がん部肝臓では年齢依存的に低メチル化していく傾向を示した。一方、胎児組織特異的なプロモーター(Pr2)は、年齢依存的にメチル化が増加し、成人肝組織で高度なメチル化がみられた。これらの結果より、肝芽腫のIGF2プロモーターでは正常の肝細胞分化に伴うエピゲノム変化が起こらず、胎児肝の未熟細胞に由来するメチル化パターンが遷延している可能性が考えられた。

次に、肝細胞におけるエンハンサー領域に位置するCpG領域に特化したクラスター解析を実施し、肝芽腫のエンハンサーメチル化パターンが4種類(E1~E4)に分か

れることを同定した(図2A)。E1サブタイプは発症年齢が高い傾向にあり、病理組織学的にはHCN-NOS(hepatocellular neoplasia, not specified)⁸⁾が多くTERTプロモーター変異も高頻度に認めた。E2サブタイプはH19/IGF2領域のコピー数異常(UPDおよびLOI)と増殖型の遺伝子発現パターンを示し、高い分裂活性を持つ胚細胞型であることが示唆された。E4サブタイプは全体にエンハンサーメチル化異常が少ない傾向であったが、これは腫瘍含有率が低いための可能性が考えられた。

これらのサブタイプごとに特徴的なメチル化異常を解明すべく、それぞれに特異的な異常メチル化領域の周囲の配列に濃縮する転写因子のモチーフ解析を行った。E1サブタイプでの高メチル化領域はGCリッチ配列に富むことから、CpG密度が多いエンハンサー近傍が異常高メチル化の標的とされていることが示唆された。E4サブタイプにおける低メチル化領域ではETSなど血球系転写因子の認識配列が濃縮しており、免疫細胞浸潤とよく一致する結果であった。E2およびE3特異的低メチル化領域では、肝細胞分化におけるマスター制御因子(HNF4, COUP-TFs, PPAR)のDR1配列の有意な濃縮がみられ、肝細胞エンハンサーの低メチル化がE2・E3サブタイプの肝芽腫で保たれていることが示唆された。興味深いことに、E2特異的な低メチル化領域では、前述のDR1配列だけでなくE-box(Myogenin, NeuroD1など)の認識配列も濃縮していた。

4. 転写制御因子ASCL2

前述のように、E2サブタイプの肝芽腫ではE-Box型転写因子の認識配列が低メチル化していたが、ここに結合する転写因子として肝芽腫で遺伝子発現が高いASCL2

に注目した。TCGAで公開されているさまざまながん腫の遺伝子発現データベースを参照すると、意外なことにASCL2は成人の肝細胞がん(HCC)では発現レベルが非常に低いものに対して、大腸がんや胃がんなどの消化管腫瘍で高発現していることがわかった。さらに、このASCL2は*H19/IGF2*遺伝子座の近傍に位置しているだけでなく、大腸がんの9.9%、胃腺がんの2.7%にみられる局所的なゲノム増幅領域に含まれていることが判明した。この遺伝子座のoncogenicな責任遺伝子として*IGF2*が考えられてきたが、*ASCL2*の高発現もこれに加担している可能性が考えられる。

さらに、最近の報告では、内胚葉分化におけるASCL2の重要な役割が注目されている。腸上皮細胞のオルガノイドモデルで有名なCleversらのグループはヒト腸管陰窩細胞を用いてASCL2のChIP-seq解析を行い、ASCL2がそれ自身の近上流エンハンサー領域にCTNNB1とともに結合することで正のフィードバックループを形成し、これが腸管陰窩細胞の幹細胞性の維持に重要であることを示している⁹⁾。別の報告において、ここで同定されたASCL2の結合領域はWntシグナルを制御する長鎖非コードRNA(*WntRLINC1*)のプロモーターに位置することが判明し、この長鎖非コードRNAによってASCL2のプロモーター領域と物理的な近接効果が生まれ、転写を正に制御することが報告されている¹⁰⁾。

そこで、肝がん細胞株HepG2を用いてASCL2およびCTNNB1のChIP-seq実験を行い、ゲノムワイドな結合領域を解析したところ、ASCL2発現のエンハンサーとして働く*WntRLINC1*のプロモーター領域にASCL2がCTNNB1とともに結合していることが確認された(図2B)。このASCL2の結合領域は、全ゲノムバイサルファイトシーケンスにて肝芽腫特異的に脱メチル化していることから、肝芽腫の臨床組織においてもASCL2の高発現とエンハンサー領域の異常低メチル化に伴う正のフィードバックループが働いている可能性が示唆された。これらの結果を総合すると、肝芽腫ではドライバー遺伝子異常としてCTNNB1のみしか同定されていないが、肝臓の未熟な細胞にみられるASCL2高発現とエピゲノム状態の異常な遷延がWnt活性化をさらに促進している可能性が考えられる(図3)。

5. おわりに

全エクソンシーケンス、RNAシーケンス、DNAメチル化解析を中心とした統合的なゲノム・エピゲノム解析による小児肝芽腫の実際例を紹介した。一般に小児腫瘍では染色体転座などのゲノム構造異常を除くと、成人の腫瘍に比べて遺伝子変異が極端に少なくドライバー遺伝子異常をほとんど同定できない症例も少なくない¹¹⁾。一方、細胞の分化異常としての観点から考えた場合、幹細胞シグナルの

遷延や分化シグナルの破綻などのエピゲノム制御異常が発がんに関わっている可能性も考えられる。このような包括的解析によって新たな発がん機序の解明とこれを標的とした新規創薬につながることを期待したい。

文 献

- 1) Weinstein, J.N., Collisson, E.A., Mills, G.B., Shaw, K.R., Ozenberger, B.A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., & Stuart, J.M., Cancer Genome Atlas Research Network. (2013) The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat. Genet.*, **45**, 1113–1120.
- 2) Hudson, T.J., Anderson, W., Artez, A., Barker, A.D., Bell, C., Bernabé, R.R., Bhan, M.K., Calvo, F., Eerola, I., Gerhard, D.S., et al.; International Cancer Genome Consortium. (2010) International network of cancer genome projects. *Nature*, **464**, 993–998.
- 3) Nagae, G., Yamamoto, S., Fujita, M., Fujita, T., Nonaka, A., Umeda, T., Fukuda, S., Tatsuno, K., Maejima, K., Hayashi, A., et al. (2021) Genetic and epigenetic basis of hepatoblastoma diversity. *Nat. Commun.*, **12**, 5423.
- 4) Koch, A., Denkhaus, D., Albrecht, S., Leuschner, I., von Schweinitz, D., & Pietsch, T. (1999) Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene. *Cancer Res.*, **59**, 269–273.
- 5) Hiyama, E., Hishiki, T., Watanabe, K., Ida, K., Ueda, Y., Kurihara, S., Yano, M., Hoshino, K., Yokoi, A., Takama, Y., et al. (2020) Outcome and Late Complications of Hepatoblastomas Treated Using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor 2 Protocol. *J. Clin. Oncol.*, **38**, 2488–2498. doi: 10.1200/JCO.19.01067.
- 6) Samuel, D.P., Tsokos, M., & DeBaun, M.R. (1999) Hemihypertrophy and a poorly differentiated embryonal rhabdomyosarcoma of the pelvis. *Med. Pediatr. Oncol.*, **32**, 38–43.
- 7) Rotwein, P. (2018) The complex genetics of human insulin-like growth factor 2 are not reflected in public databases. *J. Biol. Chem.*, **293**, 4324–4333.
- 8) Lopez-Terrada, D., Alaggio, R., de Dávila, M.T., Czauderna, P., Hiyama, E., Katzenstein, H., Leuschner, I., Malogolowkin, M., Meyers, R., Ranganathan, S., et al.; Children's Oncology Group Liver Tumor Committee. (2014) Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium. *Mod. Pathol.*, **27**, 472–491.
- 9) Schuijers, J., Junker, J.P., Mokry, M., Hatzis, P., Koo, B.K., Sasselli, V., van der Flier, L.G., Cuppen, E., van Oudenaarden, A., & Clevers, H. (2015) Ascl2 acts as an R-spondin/Wnt-responsive switch to control stemness in intestinal crypts. *Cell Stem Cell*, **16**, 158–170.
- 10) Giakountis, A., Moulos, P., Zarkou, V., Oikonomou, C., Harokopos, V., Hatzigeorgiou, A.G., Reczko, M., & Hatzis, P. (2016) A Positive Regulatory Loop between a Wnt-Regulated Non-coding RNA and ASCL2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. *Cell Rep.*, **15**, 2588–2596.
- 11) Grobner, S.N., Worst, B.C., Weischenfeldt, J., Buchhalter, I., Kleinheinz, K., Rudneva, V.A., Johann, P.D., Balasubramanian, G.P., Segura-Wang, M., Brabetz, S., et al.; ICGC PedBrainSeq Project; ICGC MMML-Seq Project. (2018) The landscape of genomic alterations across childhood cancers. *Nature*, **555**, 321–327.

著者寸描

●永江 玄太 (ながえ げんた)



東京大学先端科学技術研究センター・ゲノムサイエンス&メディシン分野特任准教授。医学博士（2008年，東京大学大学院医学系研究科）。

■略歴 佐賀県に生る。2000年東京大学医学部卒業。東京大学医学部附属病院、自治医科大学附属病院などでの臨床研修を経て、東京大学先端科学技術研究センターにて、がんエピゲノム研究に従事。

20年より現職。

■研究テーマと抱負 がんの統合的ゲノム解析やシングルセル解析，空間的トランスクリプトーム解析，ロングリードシーケンス解析などに取り組みながら，分子生物学・疾患医科学・データ解析をうまく融合させた新しいサイエンスを目指しています。

■ウェブサイト https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/research/people/staff-nagae_genta.html

■趣味 スポーツ観戦。