

Title	日米における非アルコール性脂肪性肝炎のゲノム網羅的DNAメチル化解析
Sub Title	Genome-wide DNA methylation analysis of metabolic dysfunction associated steatohepatitis in Japanese and American cohorts
Author	藏本, 純子(Kuramoto, Junko)
Publisher	
Publication year	2025
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2024.)
JaLC DOI	
Abstract	非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の日米のヒトの220組織検体のエピゲノム解析において、主成分分析では、NASH組織は正常肝組織と異なるDNAメチル化プロファイルを示し、NASHの中でも日本人、米国人検体は異なる傾向が伺えた.NASHのDNAメチル化異常が発現異常に帰結する可能性のある候補がん関連遺伝子を日米の症例でそれぞれ同定したところ、日米に共通してB3GNT3, MOSC1, FUT4遺伝子が同定された.他方で、日米間で異なる候補がん関連遺伝子が複数同定され、人種・生活習慣の相違に基づくと思われるNASH由来肝細胞がん発生過程の分子基盤の多様性が明らかになった. In an epigenomic analysis of 220 liver tissue samples from Japanese and American cohorts with nonalcoholic steatohepatitis (NASH), principal component analysis revealed that NASH samples exhibited DNA methylation profiles distinct from those of normal liver tissue. Furthermore, Japanese and American NASH samples showed divergent methylation patterns, suggesting population-specific differences. Candidate cancer-related genes potentially regulated by aberrant methylation were identified separately in each cohort. Among them, B3GNT3, MOSC1, and FUT4 were commonly altered in both populations. In contrast, several distinct candidate genes were uniquely identified in either Japanese or American samples, highlighting the molecular heterogeneity of NASH-related hepatocarcinogenesis likely driven by differences in genetic background and lifestyle factors.
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2022～2024 課題番号：22K15415 研究分野：エピゲノム解析
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K15415seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 7 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2024

課題番号：22K15415

研究課題名（和文）日米における非アルコール性脂肪性肝炎のゲノム網羅的DNAメチル化解析

研究課題名（英文）Genome-wide DNA methylation analysis of metabolic dysfunction associated steatohepatitis in Japanese and American cohorts

研究代表者

藏本 純子（KURAMOTO, Junko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：60571677

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）の日米のヒトの220組織検体のエピゲノム解析において、主成分分析では、NASH組織は正常肝組織と異なるDNAメチル化プロファイルを示し、NASHの中でも日本人、米国人検体は異なる傾向が同えた。NASHのDNAメチル化異常が発現異常に帰結する可能性のある候補がん関連遺伝子を日米の症例でそれぞれ同定したところ、日米に共通してB3GNT3、MOSCI、FUT4遺伝子が同定された。他方で、日米間で異なる候補がん関連遺伝子が複数同定され、人種・生活習慣の相違に基づくと思われるNASH由来肝細胞がん発生過程の分子基盤の多様性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、NASH由来肝臓がんにおけるDNAメチル化プロファイルの人種差に着目した初の網羅的解析であり、日米コホート間で異なる、エピジェネティックに制御されたNASH由来肝臓がんに関連するがん関連遺伝子が明らかとなった。今後、これらのエピジェネティックに制御された遺伝子の機能的役割や治療的意義を明らかにする為のさらなる機能解析、臨床的検証が必要であるが、本研究の知見は、NASH由来肝細胞がんに対する普遍的で強固な創薬標的候補の同定とコンパニオン診断マーカーの開発の基盤となる知見を提供すると共に、民族別に最適化された治療標的や診断マーカーの開発にも貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In an epigenomic analysis of 220 liver tissue samples from Japanese and American cohorts with nonalcoholic steatohepatitis (NASH), principal component analysis revealed that NASH samples exhibited DNA methylation profiles distinct from those of normal liver tissue. Furthermore, Japanese and American NASH samples showed divergent methylation patterns, suggesting population-specific differences. Candidate cancer-related genes potentially regulated by aberrant methylation were identified separately in each cohort. Among them, B3GNT3, MOSCI, and FUT4 were commonly altered in both populations. In contrast, several distinct candidate genes were uniquely identified in either Japanese or American samples, highlighting the molecular heterogeneity of NASH-related hepatocarcinogenesis likely driven by differences in genetic background and lifestyle factors.

研究分野：エピゲノム解析

キーワード：非アルコール性脂肪性肝炎 非アルコール性脂肪性肝炎由来肝細胞がん ゲノム網羅的DNAメチル化解析
候補がん関連遺伝子 人種特異的 遺伝要因 環境因子

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的に高脂肪食による肥満、糖尿病等の罹患率の上昇に伴い、非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis [NASH]) を前がん状態とした肝細胞がん症例が急増しており注目されている (JAMA, 323:1175, 2020 [review] 等)。従来日本では、肝細胞がんの発生率が高く、その 90% 程度は、B 型・C 型肝炎ウイルス感染に基づく慢性肝炎・肝硬変を背景として発生していた。しかし近年、肝炎ウイルス感染の既往が明らかな肝細胞がん症例が急増し (Hepatol Res, 51:19, 2021 等)、NASH 由来肝細胞がんがその多くを占めている可能性がある。このように、世界的に NASH を前がん状態とした肝細胞がん症例が増加しているにも関わらず、NASH の概念と定義は分子生物学的、病理組織学的に未だ確立途上にあるのが現状である。

申請者が所属する研究室では、年来行ってきた多数の組織検体を用いたメチローム解析で、発がん要因特異的な異常 DNA メチル化プロファイルが、前がん段階から諸臓器に成立することを示してきた (Cancer sci, 101:36, 2010 [review] 等)。本研究の先行研究では、日本人の正常肝組織 55 検体、NASH 組織 113 検体、NASH 由来肝細胞がん組織 22 検体、肝炎ウイルス陽性肝細胞がん症例の非がん肝組織 37 検体・肝細胞がん組織 37 検体のメチローム解析により、NASH 特異的 DNA メチル化異常を示し、NASH 特異的 DNA メチル化プロファイルは NASH 由来肝細胞がんに継承されることを明らかにした (Carcinogenesis, 38:261, 2017)。さらに、NASH 特異的 DNA メチル化異常は、いくつかのがん関連遺伝子の発現異常を介して多段階発がんに寄与することを示した (J Cancer Res Clin Oncol, 10:2461, 2020)。一方で、世界中で NASH 由来肝細胞がんの発生率は上昇しているものの、NASH 由来肝細胞がんの肝細胞がん全体に占める割合は、日本を含めたアジア諸国では欧米諸国と比較すると低いといわれている (Hepatol Res, 42:368, 2012, J Gastroenterol, 46:1230, 2011 等)。この違いの理由の一つとして、人種間における遺伝素因や環境因子によるエピジェネティック異常の差が関与している可能性が強く示唆されるものの、それらに関する報告は未だみられず十分な新規性があり必須の研究課題であると考えられる。

そこで本研究では、申請者の留学先であったユタ大学ハンツマンがん研究所の Evason 研究室とのさらなる国際共同研究を推進すべく、同研究所より米国人の NASH 臨床検体の FFPE 組織の供与を受けることで、人種特異的な DNA メチル化プロファイルを誘導する日米の遺伝素因や環境因子の差異を同定し、NASH や NASH 由来肝細胞がんの発生機序の解明をおこなうという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、近年増加し肝細胞がんの前がん状態として着目されている NASH の日米のヒトの臨床検体のエピジェネティック解析結果を比較し、日米それぞれに特異的に NASH 由来肝発がんに関与する重要ながん関連遺伝子・環境要因・遺伝素因を明らかにし、異なる背景要因のもとでの発がん経路の多様性の実態を示す。さらには、日米に共通の NASH 由来肝発がんに関与している遺伝子を抽出し、強固な創薬標的候補の同定とコンパニオン診断マーカーの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 組織検体

国立がん研究センター中央病院において肝部分切除術が施行された、肝炎ウイルス感染・慢性肝炎・肝硬変症を有さない大腸がん肝転移症例より得られた正常肝組織 (NLT) 36 検体、肝細胞がん症例より得られた NASH の組織所見を呈する非がん肝組織 (J-NASH-W) 26 検体、同一症例より得られた NASH 由来肝細胞がん組織 (J-T) 26 検体、四谷メディカルキューブにおいて重度肥満患者に対し十分な説明と同意の上でラップバンド術中に施行した肝生検標本のうち、NASH の組織所見を呈する肝組織 (J-NASH-O) 91 検体、米国のユタ大学ハンツマンがん研究所における肝部分切除検体あるいは肝移植患者の摘出肝より、肝細胞がんを発症していない NASH の組織所見を呈する肝組織 (A-NASH-O) 20 検体、肝細胞がん症例より得られた NASH の組織所見を呈する非がん肝組織 (A-NASH-W) 11 検体、NASH 由来肝細胞がん組織 (A-T) 10 検体、計 220 検体をゲノム網羅的 DNA メチル化解析に供した。

(2) Infinium 解析

日本人の症例については、凍結組織切片からフェノール・クロロホルム法と透析により高分子量 DNA を抽出した。米国人の FFPE 組織については、NASH 症例の肝組織、NASH 由来肝細胞がん症例のがん組織および非がん肝組織から、それぞれ GeneRead DNA FFPE Kit (QIAGEN 社) を用いてゲノム DNA を抽出した。日米の検体より抽出されたゲノム DNA 500ng を、EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Irvine, CA) を使用してバイサルファイト変換した。FFPE 組織より抽出された DNA は分解されているため、バイサルファイト変換後、Infinium HD FFPE Restore Kit (Illumina 社) を用いて DNA を増幅可能な状態まで修復した。485,915 CpG 部位の DNA メチル化状態を、Infinium Human Methylation 450K Bead Chip (Illumina, San Diego, CA) を用いて、1 塩基解像度で評価した。蛍光強度を iScan リーダー (Illumina) で読み取り、GenomeStudio メチル化ソフトウェア (Illumina) を用い、各 CpG 部位のメチル化率 (β 値 [メチル化プローブと非メチル化プローブの蛍光強度の合計に対するメチル化プローブの蛍光強度比])

を求めた。

(3)リアルタイム定量逆転写 PCR (RT-qPCR) 解析

凍結肝組織から TRIzol 試薬を用いて RNA を抽出し、J-NASH-W および J-T の 26 対検体ならびに Infinium アッセイ後に組織残量が十分であった 28NLT 検体を対象に RT-qPCR 解析を行った。J-MASH-091 検体は組織残量が不十分であり RNA 抽出は実施できなかった。A-MASH-013 例、A-MASH-W6 例、A-T5 例については FFPE 試料から RNeasy FFPE Kit を用いて RNA を抽出した。cDNA 合成には SuperScript IV とランダムプライマーを使用し、*B3GNT5*, *MOSCI*, *FUT4*, *ZNF611*, *SAMD10*, *LIME1*, *SHC1*, *FGFR2*, *TRIB3*, *STAT5A* の発現量を SYBR Green 法により定量した。*GAPDH* を内源性コントロールとして用いた。

(4)ヒト肝細胞がん株を用いた DNA 脱メチル化剤 5-aza-dC 処理実験

ヒト肝細胞がん株である PLC/PRF/5、JHH-7、HLE、Hep3B の培養は、各細胞株に適した培地に 10% FBS を添加し、5% CO₂、37°C の条件下で行った。各細胞を 3.0×10^4 cells/mL で播種後、1 μ M の 5-aza-2'-deoxycytidine(5-aza-dC)を添加し、72 時間培養後に DNA と RNA を抽出した。

(5)統計解析

Infinium アッセイでは、信頼性の低いプローブ (検出率 90%未満)、性染色体上のプローブ、SNP の影響があるプローブ、欠損値の多いプローブなどを除去し最終的に 468,767 プローブを解析対象とした。主成分分析 (PCA) によりメチル化パターンを可視化し、群間比較は Welch の t 検定 (Bonferroni 補正あり) を用いた。段階的な発がんにおけるメチル化変化は Jonckheere-Terpstra 検定により評価した。ROC 解析では Youden index を用いて判別精度を評価した。統計的有意差は $P < 0.05$ と定義した。Reactome によるパスウェイ解析では $FDR < 0.25$ を有意とした。DNA メチル化率と mRNA 量の相関解析においては、 $R < -0.3$ かつ $P < 0.05$ のとき有意な逆相関があるとみなした。全ての統計解析は R および RStudio で実施した。

4. 研究成果

(1)日米の NASH 組織検体の DNA メチル化プロファイル

有効全 468,767 プローブの DNA メチル化率を用い、全 220 検体の主成分分析をおこなった結果を図 1 に示す。

第 1 主成分は肝細胞がん組織 J-T・U-T と非がん肝組織 NLT・J-NASH-O・J-NASH-W・A-NASH-O・A-NASH-W を分けているが、肝細胞がん J-T・U-T の DNA メチル化プロファイルの多様性 (heterogeneity) は非がん肝組織に比して顕著であり、コピー数異常やエピゲノム制御遺伝子の変異等が蓄積した可能性が考慮された。

次に第 2 主成分に注目すると、日米の NASH 検体である

J-NASH-O・J-NASH-W・A-NASH-O・A-NASH-W は、正常肝組織 NLT とは明らかに異なる DNA メチル化プロファイルを示し、日本人 NASH 検体 J-NASH-O・J-NASH-W は米国人 NASH 検体 A-NASH-O・A-NASH-W とは異なる領域に分布しており、日米で異なる NASH 特異的 DNA メチル化プロファイルが明らかとなった。さらに、日本人の J-NASH-O と J-NASH-W、米国人の A-NASH-O と A-NASH-W とでは、それぞれ異なる傾向が伺え、肝細胞がんの発症の有無でも DNA メチル化プロファイルが異なると考えられた。

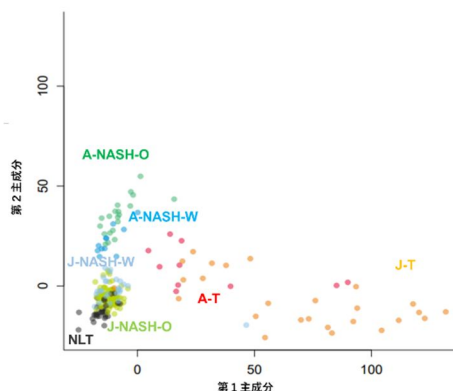


図1 全220組織検体のDNAメチル化率を用いた主成分分析

(2)日米における NASH 特異的 DNA メチル化異常が NASH 由来肝細胞がん継承され、DNA メチル化異常が発現異常に帰結する可能性のある遺伝子の同定

① 日本人の解析

日本人の NASH 特異的 DNA メチル化異常が NASH 由来肝細胞がん継承され、その DNA メチル化異常が発現異常に帰結する可能性のある遺伝子を同定するために用いたフローチャートを図 2 に示す。はじめに、J-NASH-W 検体と正常肝組織 NLT との間で DNA メチル化率に有意な差異のある (ボンフェロニー補正後 $P < 0.05$, $|\Delta \beta_{J-NASH-W-NLT}| > 0.1$)、6,168 プローブを同定した。次に、6,168 プローブに対して、正常肝組織 NLT から NASH 由来肝細胞がん J-T へ向けて順行性・方向性に DNA メチル化異常が継承されているプローブをヨンクヒールタプストラ傾向性検定にて抽出したところ (ボンフェロニー補正後に $P < 0.05$)、4,285 プローブ存在した。さらに、正常肝組織 NLT と J-NASH-W を見分けるための受信者動作特性 (ROC) 解析をおこなったところ、曲線下面積 (AUC) > 0.95 を示す 650 プローブを同定した。その DNA メチル化異常が mRNA 発現異常に帰結する可能性のある CpG 部位を同定する目的で、遺伝子の転写制御に重要な、転写開始点近傍の CpG アイランド・アイランドショア・アイランドシェルフに存在するプローブに絞り込んだところ、

米国人コホートでは、*SHC1*, *FGFR2*, *TRIB3* の mRNA 発現が⁸, NLT から A-MASH-O、A-MASH-W、A-T サンプルにかけて段階的に変化し統計的に有意であった (*SHC1*: $P = 8.99 \times 10^{-4}$, *FGFR2*: $P =$

7.77×10^{-7} , *TRIB3*: $P = 0.0114$, J-T 傾向検定). 一方で、*STAT5A* は有意な発現変化を示さず ($P = 0.0729$) 解析から除外した. *SHC1*, *FGFR2*, *TRIB3* 遺伝子の発現変化はいずれも DNA メチル化の変化と一致していた (*SHC1*(cg16254756: $P = 9.49 \times 10^{-9}$), *FGFR2*(cg11430259: $P = 3.93 \times 10^{-10}$), *TRIB3*(cg15799353: $P = 4.68 \times 10^{-7}$), JT 傾向検定}. 以上より, *SHC1*, *FGFR2*, *TRIB3* は米国人コホートにおけるがん関連遺伝子と考えられた.

各遺伝子の mRNA 発現レベルを図 3 に示す.

(4)がん関連遺伝子における DNA メチル化依存的な転写制御の有無の検討

日米両コホートで共通する強固ながん関連遺伝子 *B3GNT5*, *FUT4*, *MOSC1*, 日本人コホートに特異的ながん関連遺伝子 *ZNF611*, *SAMD10*, 米国人コホートに特異的ながん関連遺伝子 *SHC1*, *FGFR2*, *TRIB3* の DNA メチル化状態に関連した転写制御の詳細をさらに明らかにするために, それぞれの遺伝子の mRNA 発現量の低い 2 種類の肝細胞がん株を選定し, 5-aza-dC (脱メチル化剤)処理後に Infinium アッセイおよび定量 RT-PCR 解析を実施した. その結果, いずれの遺伝子においても, DNA メチル化レベルの低下と mRNA 発現レベルの上昇が確認された. 以上より, これらの遺伝子の mRNA 発現が DNA メチル化によって制御されていることが明らかとなった(代表的な遺伝子の結果のみ図 4 に抜粋して記載).

(5)研究結果を踏まえた考察(得られた成果の国内外における位置づけとインパクト,今後の展望)

本研究は, NASH 由来肝発がんにおける DNA メチル化プロファイルの人種差に着目した初の網羅的解析であり, 日米コホート間で同定されたがん関連遺伝子の違いは, 背景にある遺伝的・環境的多様性がエピゲノム制御に影響を与えている可能性を示唆している. 米国人コホートで特異的に同定された *SHC1*, *FGFR2*, *TRIB3* は, いずれもがんにおける増殖や浸潤に関与する成長因子関連シグナル経路に関与しており, 特に *SHC1* は *IGF1R/FGFR* から下流の *MAPK* や *PI3K/Akt* 経路を活性化するアダプタータンパク質であり, 複数のがんで予後不良因子とされている (Front. Genet, 13: 817118, 2022 等). *FGFR2* は受容体型チロシンキナーゼで, 乳がんや胆管がんでの異常が報告されており分子標的薬の開発も進んでいる (Clin. Cancer Res, 22:259, 2016 等). *TRIB3* は *AKT/mTOR* や *MAPK* 経路を介して腫瘍の進展を促すキナーゼであり, *HCC* や腎がんにおいて腫瘍促進的役割を果たすことが知られている (Int J Biol Sci, 15:587, 2019). これらの遺伝子における低メチル化と発現亢進は, 米国人コホートにおいて特有の肝発がん機構が存在することを示唆する. 一方で, 日本人コホートで特異的に認められた *ZNF611* は *MSI-H* 型大腸がんで中心的ハブ遺伝子とされ, 転写制御を担うジンクフィンガータンパク質である (Curr Opin Struct Biol, 11:39, 2001). *SAMD10* は RNA-タンパク質間相互作用に関与する SAM ドメインを有し, 転写後制御に関わると言われている (Nat. Struct. Biol, 10:614, 2003). 両者の低メチル化と発現上昇は, 日本人における固有の転写ネットワーク異常を示唆している. さらに, 日米両コホートに共通して同定された *B3GNT5*, *FUT4*, *MOSC1* は, がんにおける糖鎖修飾や代謝調節に関与し, *B3GNT5* は神経膠腫で発現上昇 (CNS Neurosci Ther, 11:1147, 2020), *FUT4* は *HCC* 細胞株で発現上昇が報告されている (Cell Death Dis, 4:e923, 2013). *MOSC1* は非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease [NAFLD]) の発症に抑制的に関与すると言われているミトコンドリア関連因子であり (PLoS Genet, 17:e1009503, 2021), 本研究では高メチル化と発現低下を示し, NAFLD/NASH の病態進行に関与していると考えられる. 以上のように, 各遺伝子のメチル化異常と発現変動は, NASH や NASH 由来肝発がんにおける人種特異的かつ普遍的な病態機構の両面を反映しており, 強固な創薬標的候補の同定とコンパニオン診断マーカーの開発の基盤となる重要な知見を提供すると考える.

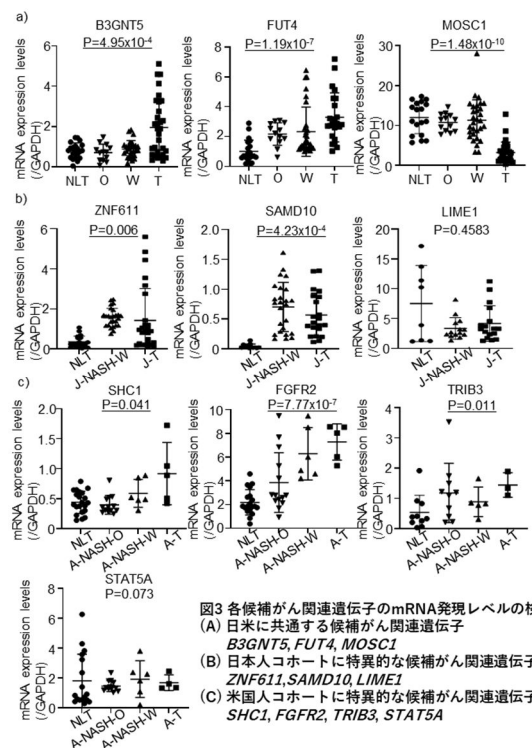


図3 各候補がん関連遺伝子のmRNA発現レベルの検証
(A) 日米に共通する候補がん関連遺伝子
B3GNT5, *FUT4*, *MOSC1*
(B) 日本人コホートに特異的な候補がん関連遺伝子
ZNF611, *SAMD10*, *LIME1*
(C) 米国人コホートに特異的な候補がん関連遺伝子
SHC1, *FGFR2*, *TRIB3*, *STAT5A*

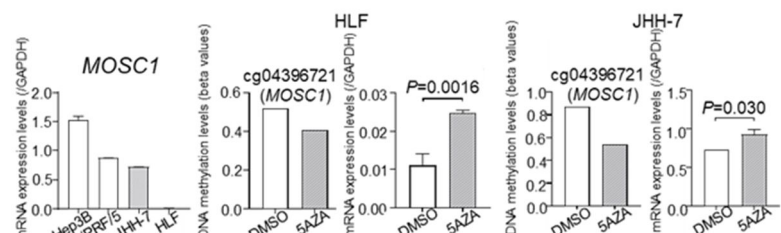


図4 *MOSC1* におけるDNAメチル化依存的な転写制御の有無の検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藏本純子，新井恵吏，藤本真央，田迎，牧内里美，津田昇，安田和基，平岡伸介，吉田輝彦，金井弥栄.
2. 発表標題 日米の非アルコール性脂肪性肝炎由来肝細胞がんにおけるゲノム網羅的DNAメチル化解析.
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藏本純子
2. 発表標題 病理組織検体のオミックス解析に基づく肝細胞がんの本態解明と臨床応用.
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藏本純子，新井恵吏，藤本真央，田迎，牧内里美，津田昇，安田和基，平岡伸介，吉田輝彦，金井弥栄.
2. 発表標題 日米の非アルコール性脂肪性肝炎由来肝細胞がんにおけるゲノム網羅的DNAメチル化解析.
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ユタ大学ハンツマンがん研究所			