

2011/908/A

厚生労働科学研究費補助金
がん臨床研究事業

肝癌発症リスク予測システムに基づいた慢性C型肝炎に
対する個別化医療の導入及びゲノム創薬への取り組み
(H23-がん臨床-一般-015)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：松田 浩一
平成24年（2012）年5月

厚生労働科学研究費補助金
がん臨床研究事業

肝癌発症リスク予測システムに基づいた慢性C型肝炎に
対する個別化医療の導入及びゲノム創薬への取り組み
(H23-がん臨床-一般-015)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：松田 浩一
平成 24 年 (2012) 年 5 月

目次

I. 統括研究報告書	
肝癌発症リスク予測システムに基づいた慢性C型肝炎に対する 個別化医療の導入及びゲノム創薬への取り組み-----	1
(東京大学医科学研究所、シーケンス技術開発分野 松田 浩一) (資料) 別紙1 研究体制図	
II. 分担研究報告	
1. 発癌リスクの解析、MICAを用いた癌治療薬開発に向けた検討-----	9
(東京大学医科学研究所、ゲノムシーケンス解析分野 谷川 千津)	
2. 血清・DNAの採取、臨床情報の収集・管理-----	12
(東京大学医科学研究所、疾患 ユニット 加藤直也)	
3. 個別化医療の実施、血清・DNAの採取、臨床情報の収集・管理-----	14
(東京大学医学部附属病院・消化器内科学 小池 和彦)	
4. 臨床情報の収集・整理、発癌関連因子の検討-----	20
(国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター 溝上 雅史)	
5. 発癌関連因子の検討-----	24
(東京大学大学院医学系研究科、人類遺伝学 徳永 勝士)	
6. 発癌予測システムの構築、統計解析全般-----	28
(理化学研究所ゲノム医科学研究センター 高橋 篤)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	31
IV. 研究成果の刊行物、別刷-----	43

I. 統括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書（平成23年度）

肝癌発症リスク予測システムに基づいた慢性C型肝炎に対する個別化医療の
導入及びゲノム創薬への取り組み

研究代表者：松田 浩一 東京大学医科学研究所 シークエンス技術開発分野 准教授

研究要旨：癌による死亡原因の第4位である肝癌の約70%がHCVの感染に起因している。最近我々はHCV陽性肝癌の疾患感受性遺伝子としてMICAを同定した。これらの知見を元に、本研究では①慢性C型肝炎患者に対する発癌リスク予測システムの構築②リスクに応じた治療方法選択による個別化医療の実現（介入試験）③MICAの活性化による肝癌予防法・治療薬の開発を目的とする。

今年度は、具体的に以下の4つを行った。

①共同研究施設においてHCV関連疾患患者のDNA、血清及び臨床情報の収集。②肝癌発症予測遺伝子の探索。健康人約3000人、慢性C型肝炎患者1600名、HCV陽性肝硬変患者800名、HCV陽性肝癌患者約700人について約60万箇所のSNPの遺伝子型決定し、相関解析により新規の予後因子を探索。

③HBV陽性肝癌の発症関連因子の探索 SNP rs2596542のHBV陽性肝癌での臨床的意義の検討

④MICA遺伝子多型の機能解析。MICAのプロモータ領域内で発現量に影響するSNPの同定を試みた。またこのSNPと血清MICA値や発癌リスクとの関連を検討した。

今年度の成果として、①東京大学医科学研究所、東京大学消化器内科、国立国際医療センター3施設あわせて慢性C型肝炎患者7000名、HCV陽性肝癌患者1500名のサンプルを収集した。②MICAの遺伝子多型(rs2596542)がHCV陽性肝癌の発症リスクを2倍高める事、また高リスク群では低リスク群と比べ血中MICA濃度が低くなる(0 vs 68.5 pg/ml)事を明らかとした。さらに、HCV陽性肝硬変に対する相関解析を行った結果、MHC領域の3つの遺伝子多型が独立して肝硬変の発症リスクと関連することを明らかとした。③rs2596542がHBV陽性肝癌の発症リスクにも関与すること、分泌型MICAが高値の肝癌症例は予後が不良となることも明らかとした。④MICAのプロモーター解析の結果、アレル特異的な転写因子SP1の結合を明らかとした。

今回の解析によって、HCV陽性肝癌の発症と関連する複数の遺伝因子を同定した。これらの知見を元に、HCVキャリアーの予後予測システムの構築を目指す。MICAはHCV陽性肝癌、HBV陽性肝癌共に高発現していることから、MICAに対する抗体を用いることによって、抗腫瘍効果が期待できると考えられる。今後、monoclonal抗体の作成と抗腫瘍活性の検討を進めていく予定である。

研究分担者

谷川 千津 東京大学医科学研究所 ゲノムシーケンス解析分野 博士研究員

加藤 直也 東京大学医科学研究所 疾患制御ゲノム医学ユニット 特任准教授

小池 和彦 東京大学医学部附属病院 消化器内科学 教授

溝上 雅史 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター センター長

徳永 勝士 東京大学大学院医学系研究科 人類遺伝学分野 教授

高橋 篤 理化学研究所 ゲノム医科学研究センター 統計解析チーム チームリーダー

A. 研究目的

肝癌は癌による死亡原因の第4位で、その内約70%がHCVの感染に起因している。HCVに暴露後約70%の症例は慢性肝炎を発症しさらに肝硬変・肝癌となるが、肝障害が軽微で推移する患者も多く個人差が大きいのが特徴である。最近我々はMHC class I 相同分子である *MICA* の遺伝子多型がHCV陽性肝癌の発症リスクを2倍高める事、また高リスク群であるAAタイプではGGタイプより血中MICA濃度が低くなる(0 vs 68.5 pg/ml)事を明らかとした(ref. 1)。Natural killer (NK)細胞はNKG2D受容体を介してMICAを高発現する腫瘍細胞・ウイルス感染細胞を認識し、殺細胞効果を発揮する。AAタイプではMICAの発現が低下する事によりNK細胞の監視機構から逃れ、その結果肝癌の発症リスクが上昇すると考えられる。以上の研究成果より、血中MICAが肝癌発症リスクのバイオマーカーとなる事、さらにはNKG2D-MICA経路の活性化が発癌予防につながる可能性が示された。

本研究では、これまでの知見を元に以下の3項目を解析する事を目的とする。

1. 慢性C型肝炎患者における発癌リスク予測システムの構築と検証 (H23)
2. リスクに応じた治療方法選択による個別化医療の実現 (介入試験) (H24-25)
3. MICAの活性化による肝癌予防法・治療薬の開発 (ゲノム創薬) (H23-25)

B. 研究方法

本研究では、具体的に以下の3つを行った。

1-1. 比較対照研究による肝癌発症リスク予測システムの構築 (H23)

対象：慢性C型肝炎/HCV陽性肝癌症例：東京大学医科学研究所 (2000例/700例)、東

京大学消化器内科 (900例/800例)、国立国際医療センター国府台病院 (500例/300例)。上記の症例を用いて、慢性C型肝炎とHCV陽性肝癌の2群間で発癌リスクに関する因子を検討する。臨床情報の整理は小池、加藤、溝上が行い、遺伝子多型・血中MICAの測定は松田、谷川、加藤、徳永が担当、統計解析を高橋が担当する。この結果を基にリスク予測システムを加藤、高橋が構築する。

以下は解析対象とする項目のリストである。

遺伝子多型：MICA, IL28B, PNPLA3, HLA-DRB1, CSMD1

血液生化学検査：血中MICA, 血小板値, GOT, GPT, Alb

ウイルス因子：ウイルス型、ウイルス量、ウイルス変異

性別、年齢、飲酒量、BMI、肝弾性値

1-2. 前向きコホートによるリスク予測システムの検証 (H23)

上記の予測システムを用いて、東京大学病院・東京大学医科学研究所病院を新規受診もしくは通院中の慢性C型肝炎患者に対し上記の因子の測定とリスク予測を行う(肝炎900症例)。臨床情報の収集と整理は小池・加藤が、遺伝子解析とリスク診断を加藤、松田が担当する。慢性C型肝炎に対する治療は3剤併用療法を基本とし、肝機能関連検査と超音波を主体とした肝癌スクリーニングを定期的に行う。また血中MICA濃度の測定は6ヶ月ごとに行う。現在東京大学病院では肝炎集団から毎年約60人の新規肝癌患者が発生しており、十分な統計

精度を持ってリスク予測システムの有用性が評価可能と考えられる。

3-1. 慢性肝炎・肝癌患者における MICA の制御機構と生理的機能の解析 (H23-24)

MICA の HCV 関連疾患における生理的意義について、分子生物学的な手法により以下の項目を検討する。解析は谷川、松田が担当する。

1. HCV 感染による MICA の発現誘導機構の解明と遺伝子多型の影響を検討する。
2. In vitro における膜型及び血中 MICA の NK 活性に与える影響を検討する。
3. MICA の活性化による肝癌治療・予防法の開発に向けて、MICA の発現を誘導可能な天然化合物をスクリーニングする。

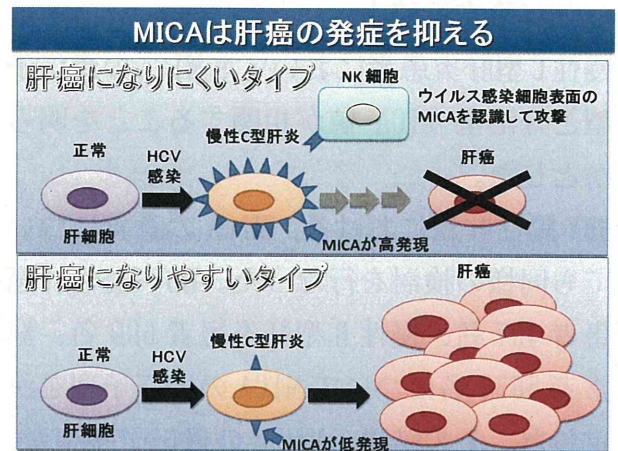
(倫理面への配慮)

本研究に参加される患者の方は全員インフォームドコンセントを取得済みであり、また研究計画は各医療機関において倫理審査委員会の承認済みである。

C. 研究結果

1) 個別化医療の実現へ向けた研究としては、現在協力医療機関において、慢性 C 型肝炎患者、HCV 陽性肝癌患者の DNA、血清の収集と臨床情報の整理をすすめている。これまで東京大学医科学研究所、東京大学消化器内科、国立国際医療センター3 施設あわせて慢性 C 型肝炎患者 6000 名、HCV 陽性肝癌患者 1500 名のサンプルを収集した。上記のサンプルを用いて MICA 遺伝子上の SNP rs2596542 が HCV 陽性肝癌の疾患関連因子であることが明らかとなった。SNP rs2596542 が GG 型を持つ人に比べ、AA 型を

持つ人では約 1.8 倍肝癌の発症リスクが高くなった。また rs2596542 は HCV 感染の慢性化には関与しなかった事より、慢性 C 型肝炎患者にとって有用な予後予測因子となると考えられた。さらに肝癌の発症リスクが高い AA タイプの人では、血中の MICA 濃度が低くなる事から、MICA の発現低下が肝癌発症にとって高リスクとなることが示された。



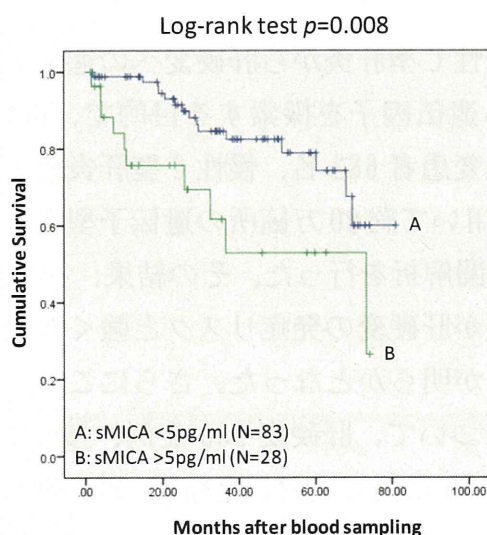
また MICA 以外の新たな肝癌発症のバイオマーカーを探索する目的で、欧米人で肝疾患や様々な癌との関連が報告された遺伝子多型約 300 について日本人症例（肝癌約 1500 症例、健常人約 20000 人）で検討した。その結果有意な関連を示す SNP は存在しなかった。

さらに慢性 C 型肝炎から肝硬変への進展と関連する遺伝因子を探索する目的で、HCV 陽性肝硬変患者 682 名、慢性 C 型肝炎患者 943 名を用いて約 60 万箇所の遺伝子型を決定し、相関解析を行った。その結果、10 箇所の SNP が肝硬変の発症リスクと強く関連することが明らかとなった。さらにこれらの SNP について、肝硬変 936 症例、慢性 C 型肝炎 3786 症例で検討した結果、MHC 領域

上の 5 SNP が強い関連を示した。またこれまで肝障害、肝組織の線維化との関連が報告されている HLA 遺伝子についても検討を進めた所、複数の HLA アレルが肝硬変のリスクとなることが明らかとなった。多変量解析の結果、最終的に 3 つの遺伝子多型が肝硬変の発症リスクと独立して関連することを明らかとし、これらの遺伝子多型を用いた肝硬変発症リスク予測システムを構築した (論文投稿中)。

慢性 C 型肝炎患者においても MICA の遺伝子型と分泌型 MICA 値が相関することを明らかとした。

HBV 陽性肝癌における、MICA の意義についても同様の検討を行なった。HBV-陽性肝癌患者 407 名、慢性 B 型肝炎患者 699 名、健康者 5657 名について MICA の遺伝子型を決定した。その結果、MICA の遺伝子多型が、HBV 陽性肝癌の発症リスクにも関与することを明らかとした。また HCV 陽性肝癌患者と同様、MICA の遺伝子型と血清 MICA 値とは相関を示した。さらに分泌型 MICA が高値の肝癌症例では予後が不良となることも明らかとした (論文投稿中)。



慢性 B 型肝炎の新規疾患感受性遺伝子として HLA-DQ を同定した (Hmarek et al)。中国人で HBV 陽性肝癌との関連が報告された KIF1B について、日本人 HBV 陽性肝癌症例では関連が無いことを明らかとした (論文投稿中)。

2) さらにゲノム創薬へ向けた研究として、MICA の創薬ターゲットとしての検証を進めている。

遺伝子多型の MICA の発現調節機構の解明をまず進めている。MICA のプロモーターの解析の結果、アレル特異的な転写因子の結合が示唆された。また Heat shock 等のストレス刺激によって、MICA の発現量が上昇することが明らかとなった (論文準備中)。

D. 考察

これらの成果により、慢性 C 型肝炎の予後とかかわる複数の新規遺伝因子が明らかとなった。これらの遺伝因子を組み合わせることによって発癌予測システムの構築が可能となってきた。

これらの成果を元に、MICA の発現調節機構の解明と、慢性 C 型肝炎、肝癌患者において MICA の活性化を介した治療法の開発を目指して。

各種癌細胞株での MICA の発現量と遺伝子型の相関を検討した結果、MICA の発現量と遺伝子型が、HCV 陽性肝癌患者と同様の関連を示した。

E. 結論

今回の解析によって、MICA を含む複数の遺伝子多型が HCV 陽性肝癌の発症と関連することが示された。さらに HCV 陽性肝癌だけでなく慢性 C 型肝炎患者において、

MICA の遺伝子多型と分泌型 MICA 値が関連を示したことより、MICA の測定でも慢性 C 型肝炎患者の予後予測が可能となる事が示唆された。今後は MHC 慢性 C 型肝炎患者において分泌型 MICA の測定を進め、肝癌発症との関係を検討する。また分泌型 MICA 値と MICA 遺伝子型のどちらが有用な予後因子となるかについて、多変量解析を元に検討する。

さらに HBV 陽性肝癌の発症リスクにも MICA の遺伝子多型が関与すること、また分泌型 MICA が高値の症例では、予後不良であることが明らかとなり、MICA が HBV 関連疾患の予測因子となる事が示された。MICA は HCV 陽性肝癌、HBV 陽性肝癌共に高発現していることから、MICA に対する抗体を用いることによって、分泌型 MICA の中和活性、及び膜型 MICA に対する ADCC 活性を介して、抗腫瘍効果が期待できると考えられる。今後、monoclonal 抗体の作成と抗腫瘍活性の検討を進めていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. J.C. Chambers, W. Zhang, J. Sehmi, X. Li, M.N. Wass, P. Van der Harst, H. Holm, S. Sanna, M. Kavousi, S.E. Baumeister, L.J. Coin, G. Deng, C. Gieger, N.L. Heard-Costa, J.J. Hottenga, B. Kuhnel, V. Kumar, V. Lagou, L. Liang, J. Luan, P.M. Vidal, I. Mateo Leach, P.F. O'Reilly, J.F. Peden, N. Rahmioglu, P. Soininen, E.K. Speliotes, X. Yuan, G. Thorleifsson, B.Z. Alizadeh, L.D. Atwood, I.B. Borecki, M.J.

Brown, P. Charoen, F. Cucca, D. Das, E.J. de Geus, A.L. Dixon, A. Doring, G. Ehret, G.I. Eyjolfsson, M. Farrall, N.G. Forouhi, N. Friedrich, W. Goessling, D.F. Gudbjartsson, T.B. Harris, A.L. Hartikainen, S. Heath, G.M. Hirschfield, A. Hofman, G. Homuth, E. Hypponen, H.L. Janssen, T. Johnson, A.J. Kangas, I.P. Kema, J.P. Kuhn, S. Lai, M. Lathrop, M.M. Lerch, Y. Li, T.J. Liang, J.P. Lin, R.J. Loos, N.G. Martin, M.F. Moffatt, G.W. Montgomery, P.B. Munroe, K. Musunuru, Y. Nakamura, C.J. O'Donnell, I. Olafsson, B.W. Penninx, A. Pouta, B.P. Prins, I. Prokopenko, R. Puls, A. Ruukonen, M.J. Savolainen, D. Schlessinger, J.N. Schouten, U. Seedorf, S. Sen-Chowdhry, K.A. Siminovitch, J.H. Smit, T.D. Spector, W. Tan, T.M. Teslovich, T. Tukiainen, A.G. Uitterlinden, M.M. Van der Klauw, R.S. Vasani, C. Wallace, H. Wallaschofski, H.E. Wichmann, G. Willemsen, P. Wurtz, C. Xu, L.M. Yerges-Armstrong, G.R. Abecasis, K.R. Ahmadi, D.I. Boomsma, M. Caulfield, W.O. Cookson, C.M. van Duijn, P. Froguel, **K. Matsuda**, M.I. McCarthy, C. Meisinger, V. Mooser, K.H. Pietilainen, G. Schumann, H. Snieder, M.J. Sternberg, R.P. Stolk, H.C. Thomas, U. Thorsteinsdottir, M. Uda, G. Waeber, N.J. Wareham, D.M. Waterworth, H. Watkins, J.B. Whitfield, J.C. Witteman, B.H. Wolffenbuttel, C.S. Fox, M. Ala-Korpela, K. Stefansson, P. Vollenweider, H. Volzke, E.E. Schadt, J. Scott, M.R. Jarvelin, P. Elliott, J.S. Kooner,

Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nature genetics* 43 (2011) 1131-1138.

2. J. Li, D. Yang, Y. He, M. Wang, Z. Wen, L. Liu, J. Yao, **K. Matsuda**, Y. Nakamura, J. Yu, X. Jiang, S. Sun, Q. Liu, Q. Song, M. Chen, H. Yang, F. Tang, X. Hu, J. Wang, Y. Chang, X. He, Y. Chen, J. Lin, Associations of HLA-DP variants with hepatitis B virus infection in southern and northern Han Chinese populations: a multicenter case-control study. *PloS one* 6 (2011) e24221.

3. Y.J. Kim, M.J. Go, C. Hu, C.B. Hong, Y.K. Kim, J.Y. Lee, J.Y. Hwang, J.H. Oh, D.J. Kim, N.H. Kim, S. Kim, E.J. Hong, J.H. Kim, H. Min, Y. Kim, R. Zhang, W. Jia, Y. Okada, A. Takahashi, M. Kubo, T. Tanaka, N. Kamatani, **K. Matsuda**, T. Park, B. Oh, K. Kimm, D. Kang, C. Shin, N.H. Cho, H.L. Kim, B.G. Han, Y.S. Cho, Large-scale genome-wide association studies in east Asians identify new genetic loci influencing metabolic traits. *Nature genetics* 43 (2011) 990-995.

4. V. Kumar, N. Kato, Y. Urabe, A. Takahashi, R. Muroyama, N. Hosono, M. Otsuka, R. Tateishi, M. Omata, H. Nakagawa, K. Koike, N. Kamatani, M. Kubo, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nature genetics* 43 (2011) 455-458.

5. H. Mbarek, H. Ochi, Y. Urabe, V. Kumar,

M. Kubo, N. Hosono, A. Takahashi, Y. Kamatani, D. Miki, H. Abe, T. Tsunoda, N. Kamatani, K. Chayama, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, A genome-wide association study of chronic hepatitis B identified novel risk locus in a Japanese population. *Human molecular genetics*. 20 (2011) 3884-3892.

2. 学会発表

1) Genome Wide Association Study of HCV-induced Hepatocellular carcinoma. Koichi Matsuda, Vinod Kumar, Yusuke Nakamura 102th American association of cancer research. Orland, USA 2011

2) A genome-wide association study identified novel susceptible loci for HCV-induced Liver cirrhosis.

Yuji Urabe, Koichi Matsuda, Naoya Kato, Kazuaki Chayama, Yusuke Nakamura 第70回 日本癌学会 学術総会 名古屋 2011.

3) Genome-wide association study identifies *MICA* variant as a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma Koichi Matsuda, Vinod Kumar, Yusuke Nakamura 第56回 日本人類遺伝学会 幕張 2011.

4) A genome-wide association study identified novel susceptible loci for HCV-induced Liver cirrhosis.

Yuji Urabe, Koichi Matsuda, Naoya Kato, Kazuaki Chayama, Yusuke Nakamura, 第56回 日本人類遺伝学会 幕張 2011.

5) A Genome-Wide Association Study of Chronic Hepatitis B Identified Novel Risk Locus in a Japanese Population Hamdi Mbarek, Hidenori Ochi, Yuji Urabe, Yusuke Nakamura, Koichi Matsuda 第56回 日本人類遺伝学会 幕張 2011.

6) Impact of genetic variations on disease

susceptibility and various quantitative traits. Koichi Matsuda The 18th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research Shanghai, 2011.

7) 癌における個別化医療の現状と今後の展望
松田浩一 第61回日本体質学会 東京, 2011

8) ゲノムワイド関連解析による癌感受性遺伝子の探索 松田浩一 文科省がん支援活動・厚労省対がん 10 周年研究合同公開シンポジウム 東京 2012

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

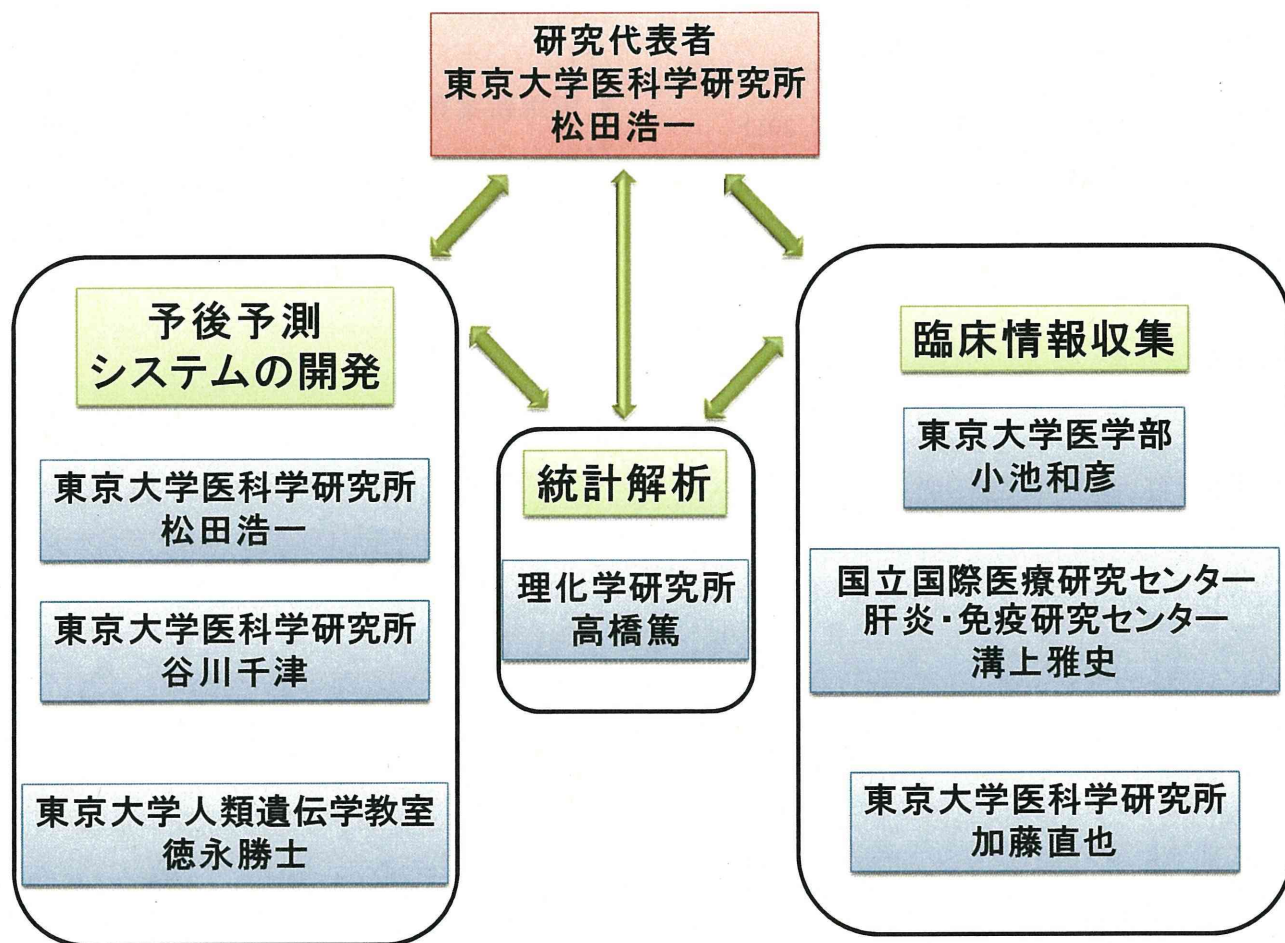
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別紙1 組織図



II. 分担研究報告

肝癌発症リスク予測システムに基づいた慢性C型肝炎に対する個別化医療の導入及びゲノム創薬への取り組み

分担研究者: 谷川 千津 東京大学医科学研究所 ゲノムシーケンス解析 博士研究員

分担研究課題: 発癌リスクの解析、MICA を用いた癌治療薬開発に向けた検討

研究要旨: 遺伝子多型のデータベースの整備と一度に多量のSNP情報を比較的安価にかつ正確に決定できる技術の進歩によって、2007年以降全ゲノム関連解析は疾患感受性遺伝子探索のスタンダードな手法となっている。これまで多数の感受性遺伝子が同定されているにも関わらず、その多くはどのような機序によって疾患リスクを高めるかは明らかになっていない。最近我々はHCV陽性肝癌の疾患感受性遺伝子としてMICAを同定した。また病気になりやすい遺伝子型を持つ肝癌患者では、血液中のMICAを値が高値となる事が明らかとなった。これらの知見を元に、本研究では遺伝子多型によるMICAの発現制御機構の解明と、MICAの活性化による肝癌予防法・治療薬の開発を目的とする。

今年度は、具体的に以下の2つの解析を行った。

①MICA遺伝子多型の機能解析。MICAのプロモーター領域内で機能的なSNPの同定を試みた。またこのSNPと血清MICA値や発癌リスクとの関連を検討した。②HBV陽性肝癌におけるSNP rs2596542の臨床的意義の検討を進めた。

今年度の成果として、①MICAのプロモーター解析の結果、アレル特異的な転写因子SP1の結合を明らかとした。②rs2596542がHBV陽性肝癌の発症リスクにも関与すること、また分泌型MICAが高値の肝癌症例は予後が不良となることも明らかとした。MICAはHCV陽性肝癌、HBV陽性肝癌共に高発現していることから、MICAに対する抗体を用いることによって、抗腫瘍効果が期待できると考えられる。今後、monoclonal抗体の作成と抗腫瘍活性の検討を進めていく予定である。

A. 研究目的

本研究では、MICA の遺伝子多型が肝癌の発症リスクを制御する機序について、分子生物学的なアプローチによって解析を行う。また MICA 遺伝子多型の HBV 陽性肝癌における意義についても検討する。最終的には MICA を標的としたゲノム創薬を目指す。

B. 研究方法

オーダーメイド医療実現化プロジェクトによって収集された、HCV・HBV 関連疾患患者の遺伝子解析結果を元に、機能的な SNP

の同定を試みた。まず MICA 遺伝子周辺領域について Imputation 解析を行うことで、強く関連を示す SNP を抽出した。さらに上位の候補 SNP について EMSA, CHIP アッセイを行い、アレル特異的に結合する転写因子の探索を進めた。また HBV 陽性肝癌における MICA の SNP 及び分泌型 MICA の臨床的意義についても検証した。

（倫理面への配慮）

本研究に参加される患者の方は全員インフォームドコンセントを取得済みであり、ま

た研究計画は各医療機関において倫理審査委員会の承認済みである。

C. 研究結果

Imputation 解析の結果、MICA 遺伝子領域周辺に約 100 箇所の強い関連を示す SNP が存在することが明らかとなった。しかしながら分泌型 MICA 値及び疾患リスクと相関を示す coding 領域の SNP が存在しなかった事から、転写制御領域の SNP に着目して検証を進めた。強い関連を示した 15 NSP について EMSA を行った所、転写開始点 2.8kb 上流の SNP がアレル特異的な転写因子の結合を示した。さらに CHIP アッセイを行った結果、SP1 が protective アレル特異的に結合し、更に転写を活性化することが明らかとなった。

また HBV 陽性肝癌でも、MICA の SNP が相関を示すこと、また分泌型 MICA が高値の肝癌症例では、予後が不良となる事が明らかとなった。

H. 考察

肝癌の低リスク群は血中の MICA の値が高値を示したことから、膜上で発現した MICA が免疫細胞を活性化することで疾患予防的に働くことが示唆された。

また HBV 陽性肝癌では、血中の MICA 値と MICA 遺伝子型との関係は HCV 陽性肝癌と同様の結果を示したが、リスクアレルが逆転していた。膜型の MMP が HBV 感染者では高発現している事が報告されている事より、膜上での切断によって、癌抑制的に働く膜型 MICA より oncogenic な働きを示す分泌型 MICA 優位となり、その結果リスクアレルの逆転現象が生じていると考えられる。

I. 結論

我々の解析によって、MICA の遺伝子多型がどのような機序で発癌リスクを制御するかが明らかとなった。また低リスク群は血中の MICA の値が高値を示したことから、膜上で発現した MICA が免疫細胞を活性化することで疾患予防的に働くことが示唆された。また HBV 陽性肝癌でも、MICA の SNP が相関を示すこと、また分泌型 MICA が高値の肝癌症例では、予後が不良となる事が明らかとなった。MICA に対する抗体を用いることで、分泌型 MICA の oncogenic な機能をブロック、また膜型 MICA に対する ADCC 活性を介して、治療薬となりうる可能性が示された。今後のこれらの成果を元に、抗体薬の開発を目指す予定である。

J. 研究発表

3. 論文発表

1. R. Cui, Y. Okada, S.G. Jang, J.L. Ku, J.G. Park, Y. Kamatani, N. Hosono, T. Tsunoda, V. Kumar, **C. Tanikawa**, N. Kamatani, R. Yamada, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda, Common variant in 6q26-q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population. *Gut* 60 (2011) 799-805.
2. V. Kumar, K. Matsuo, A. Takahashi, N. Hosono, T. Tsunoda, N. Kamatani, S.Y. Kong, H. Nakagawa, R. Cui, **C. Tanikawa**, M. Seto, Y. Morishima, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda, Common variants on 14q32 and 13q12 are associated with DLBCL susceptibility. *Journal of human genetics* 56 (2011) 436-439.
3. Y. Urabe, **C. Tanikawa**, A. Takahashi, Y. Okada, T. Morizono, T. Tsunoda, N. Kamatani, K. Kohri, K. Chayama, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda,

A genome-wide association study of nephrolithiasis in the Japanese population identifies novel susceptible loci at 5q35.3, 7p14.3 and 13q14.1.

PLoS genetics 8 (2012) e1002541.

4. **C. Tanikawa**, Y. Urabe, K. Matsuo, M. Kubo, A. Takahashi, H. Ito, K. Tajima, N. Kamatani, Y. Nakamura, K. Matsuda, A genome-wide association study identifies two susceptibility loci for duodenal ulcer in the Japanese population.

Nature genetics 44 (2012) 430-434.

5. **C. Tanikawa**, M. Espinosa, A. Suzuki, K. Masuda, K. Yamamoto, E. Tsuchiya, K. Ueda, Y. Daigo, Y. Nakamura, K. Matsuda, Regulation of histone modification and chromatin structure by the p53-PADI4 pathway. *Nature communications* 3 (2012) 676.

6. **C. Tanikawa**, H. Nakagawa, Y. Furukawa, Y. Nakamura, K. Matsuda, CLCA2 as a p53-inducible senescence mediator. *Neoplasia* 14 (2012)

141-149.

1. 学会発表

1) Functional analysis of the protein citrullination through p53/PADI4 network in carcinogenesis. Chizu Tanikawa, Koichi Matsuda, and Yusuke Nakamura 102th American association of cancer research. Orland, USA 2011

2) p53-PADI4 pathway regulates histone modification and chromatin structure Chizu Tanikawa, Koichi Matsuda, Yataro Daigo, Yusuke Nakamura 第70回 日本癌学会学術総会 名古屋 2011.

K. 知的所得権の出願・登録状況

4. 特許取得

なし

5. 実用新案登録

なし

6. その他

なし

MICA の制御機構と生理的機能の解析

分担研究者 加藤 直也 東京大学医科学研究所疾患制御ゲノム医学ユニット
特任准教授

研究要旨：

我々のグループは、慢性C型肝炎から肝臓への進展に関わるMICA遺伝子上のSNPを同定し、MICAの遺伝子型と血中MICA濃度が強く相関することを以前に報告した。この成果を基に、遺伝因子を組み合わせた肝臓の発症リスク予測システムを構築し、リスクに基づいた個別化医療の実現と、MICAを標的としたゲノム創薬に結びつける事が、本研究の課題である。この解析により、患者の予後改善や治療に伴う負担の減少、遺伝子解析に伴うコスト・時間の削減、日本発の肝臓治療薬の開発に結びつけたいと考えている。

A. 研究目的

MICA を標的としたゲノム創薬の一環として、MICA を活性化しうる化合物のスクリーニングを行う系の確立を試みた。また、血中 MICA のバイオマーカーとしての可能性を検討するため、再現性の高い血中 MICA の安定的測定法の確立を試みた。

B. 研究方法

MICA のプロモータ領域をルシフェラーゼ・レポータープラスミドにクローニングし、MICA プロモータ下ルシフェラーゼリポーター遺伝子を恒常的に発現する肝臓細胞株を樹立した。血中 MICA を安定的に測定するための ELISA の条件検討を行った。

(倫理面への配慮)

C型肝炎患者血清を用いた本解析については、東京大学の倫理委員会の承認を受けている。また、C型肝炎患者からは書面による同意を得ている。検体は匿名化され、個人情報厳格に保護される。

C. 研究結果

MICA プロモータ下ルシフェラーゼリポーター遺伝子を恒常的に発現する肝臓細胞株の樹立に成功し、MICA の発現を上昇させると報告されている「バルプロ酸+ヒドロキシウレア」の添加により、ルシフェラーゼ活性が上昇することを確認した。また、血中 MICA の測定サンプルを FBS を含む溶媒で希釈することにより、再現性の高い測定結果が得られる ELISA の測定法が確立された。

D. 考察

MICA を活性化しうる化合物のスクリーニングを行うために必要な肝臓細胞株の樹立と、バイオマーカーとなる可能性をもつ血中の MICA を再現性よく測定できる ELISA を確立することができた。これらの系の確立により、天然化合物のスクリーニングと血中 MICA の推移を検討する前準備が整ったものと考えられ、今後の解析に向けて大きく前進したものとする。

E. 結論

1) MICA 発現を亢進する化合物のハイスループットスクリーニング系を確立した。

2) 血中 MICA の ELISA による再現性に優れた測定法を確立した。

G. 研究発表

4. 論文発表

1) Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2011; 43(5): 455-458.

2) 加藤直也, 室山良介, 古渡礼恵, 大塚基之, 建石良介, 吉田晴彦, 小池和彦, 小俣政男, 中村祐輔, 松田浩一. GWAS による C 型肝炎感受性遺伝子の同定. *肝胆膵* 2011; 62 (5): 919-925.

3) 加藤直也. 座談会 肝発癌の分子機構. *The Liver Cancer Journal* 2011; 3: 15-25.

4) 加藤直也, 室山良介, 古渡礼恵, 後藤 覚, 李雯雯, 中川 良, 大塚基之, 建石良介, 吉田晴彦, 小池和彦, 小俣政男, 中村祐輔, 松田浩一. C 型肝炎の GWAS 研究: MICA SNP. C 型肝炎のすべて 2012. C 型肝炎の GWAS 研究: MICA SNP. 2011; 62 (12): 1045-1051.

5) 加藤直也, 室山良介. 新規薬剤(新規プロテアーゼ阻害薬, IFN λ など). C 型肝炎—最新治療コンセンサス. *医学のあゆみ* 2011; 239: 1175-1181.

5. 学会発表 (国際学会のみ)

1) Kato N, Kumar V, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Otsuka M, Tateishi R, Yoshida H, Omata M, Koike K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide study identifies susceptibility loci for hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver.

2011/3/30-4/3. Berlin, Germany.

2) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Koike K. IL28B ,minor allele is an independent risk factor for early-age onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011/11/4-8. San Francisco, CA, USA.

H. 知的所得権の出願・登録状況

特になし

肝癌発症リスク予測システムに基づいた慢性C型肝炎に対する個別化医療の導入及びゲノム創薬への取り組み

分担研究者： 小池 和彦 東京大学大学院医学系研究科 教授
研究協力者： 建石 良介 東京大学医学部附属病院 助教

分担研究課題：個別化医療の実施、血清・DNA の採取、臨床情報の収集・管理

研究要旨：近年特に高齢者を中心として線維化がさほど進展していないにもかかわらず、肝発癌に至る例が増加している。肝炎・線維化の程度と直接関係しない危険因子探索のために、C型肝炎・肝細胞癌患者のデータベース整備、血清・DNA検体の採取を行った。153人分のDNA検体（内、肝細胞癌例62人、非癌患者91人）、血清については、385人について611回分の検体を採取した。今後の検討に資する予定である。

A. 研究目的

わが国の肝細胞癌の約70%はC型慢性肝炎に起因すると考えられている。慢性化したC型肝炎において、肝炎の活動度は個人差が大きく、肝の炎症が軽微で感染後40年以上過ぎても、肝の線維化がほとんど進行していない例も稀ではない。一方で、近年特に高齢者を中心として線維化がさほど進展していないにもかかわらず、肝発癌に至る例が増加している。肝細胞癌は、炎症性発癌の典型例と考えられていたが、肝炎・線維化の程度と直接関係しない危険因子が存在する可能性がある。

これらの危険因子の中で遺伝的背景を持つものの詳細を明らかにするために、外来・入院患者の詳細なデータを蓄積するためのデータベースの整備とDNA検体・血清検体の採取を行う事を目的とした。

B. 研究方法

すでに肝細胞癌・慢性肝疾患について

1990年から蓄積している患者データベースについて、本年は別々に存在していたデータベースの統合を行う。血清・DNA検体のデータベースとの常時リンクも確立し、外来通院中でこれまでに検体をいただいない被験者をリストアップし、倫理委員会の承認をえたプロトコールに基づき、患者の同意を取得した後に血球の採取、保存を行なう。

（倫理面への配慮）

臨床試験の目的・方法、検査の副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した（新GCPに遵守）。

C. 研究結果

平成 22 年度末までに採取、保存されていた HCV 抗体陽性患者からの DNA 検体は 1608 人分であったが、平成 23 年度はさらに 153 例分の DNA 検体 (内、肝細胞癌例 62 人、非癌患者 91 人) を採取した。血清については、385 人について 611 回分の検体を採取した。

肝疾患統合データベース上の登録患者数は、平成 23 年度末時点で 10198 人 (内、C 型肝炎 5080 人、肝細胞癌 4043 人 [重複あり]) に達した。C 型肝炎の平均発症年齢は、2000 年の男性 68.4 歳、女性 69.0 歳から 2010 年の男性 72.0 歳、女性 73.3 歳へと高齢化が進行する一方、血小板数は、平均 9.7 万から 11.7 万へと増加していた。

L. 考察

C 型肝炎の高齢化と肝線維化が比較的軽い症例からの発癌が増加している。

M. 結論

データベースの整備とリストアップ、同意取得、検体採取のワークフローを確立することによって、効率的に検体を採取することができた。今後の研究班における解析に資される予定である。

N. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshimi A, Yamamoto G, Goto T, Koike K, Kurokawa M. Hepatocellular carcinoma in cirrhotic liver with graft-versus-host disease. **Ann Hematol** 2012 Feb 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22314841.
- 2) Inoue H, Yamazaki S, Shimizu M, Uozaki H, Goto T, Ohnishi S, Koike K. Liver injury induced by the Japanese herbal drug kamishoyosan. **Gastroenterol Hepatol (NY)** 2011;7(10):692-695. PubMed PMID: 22298964.
- 3) Goto E, Masuzaki R, Tateishi R, Kondo Y, Imamura J, Goto T, Ikeda H, Akahane M, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Value of post-vascular phase (Kupffer imaging) by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid in the detection of hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol**. 2011 Dec 27. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22200940.
- 4) Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Sato T, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Yoshida H, Omata M, Koike K. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. **Am J Gastroenterol** 2011 Dec 13. doi: 10.1038/ajg.2011.425. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22158026.
- 5) Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Shiina S, Yamashiki N, Mikami S, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Inoo S, Ohtomo K, Omata M, Yoshida H, Koike K. Characteristics of hepatocellular carcinoma nodules newly detected by computed tomography during arteriography and arterial portography: preliminary report of a randomized controlled trial. **Hepatol Int**