

201221056A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：松田 浩一  
平成 25 年（2013）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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：松田 浩一  
平成 25 年 (2013) 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----- 8  
(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----- 11  
(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----- 13  
(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----- 18  
(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----- 22  
(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----- 27  
(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----- 29

### IV. 研究成果の刊行物、別刷----- 42

## 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）  
統括研究報告書（平成 24 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10000人、慢性C型肝炎患者1600名、HCV陽性肝硬変患者1200名、HCV陽性肝癌患者約1000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。

③MICA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7600名、HCV陽性肝癌患者20500名のサンプルを収集した。②HCV陽性肝硬変の解析結果に寄って、HLA-DQ遺伝子周囲のSNP及びHLA-B多型が独立して慢性C型肝炎から肝硬変への進行リスクを高めることを明らかとした。③MICAのプロモーター解析の結果、non risk allele特異的に転写因子SP1が結合し、MICAの転写を活性化することを明らかとした。この結果より、SP-1を介した転写誘導がHCV陽性肝癌発症に防御的に作用することが示された。

今回の解析によって、慢性C型肝炎の予後と関連する複数の遺伝因子を同定した。またMICAのpromoter解析の結果、MICAの発現上昇が発癌抑制効果があることが示された。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。また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。

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 の内約70%がHCVの感染に起因している。  
肝癌は癌による死亡原因の第4位で、そ 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。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 (H23-24)
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 (H25)
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 (H23-24)

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 (6309 例/1000 例)、東京大学消化器内科 (1000 例/900 例)、国立国際医療センター国府台病院 (365 例/163 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 (H24-25)

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 1 年ごとに行う。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。

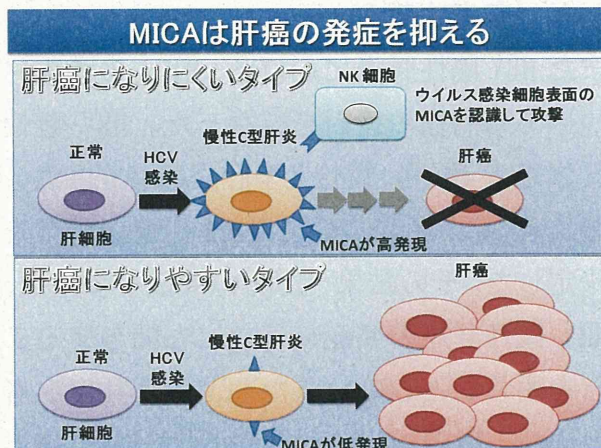
(倫理面への配慮)

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<sup>3</sup> 施設あわせて慢性 C 型肝炎患者 7600 名、HCV 陽性肝癌患者 2100 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 SNPrs2596542 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。SNPrs2596542 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。

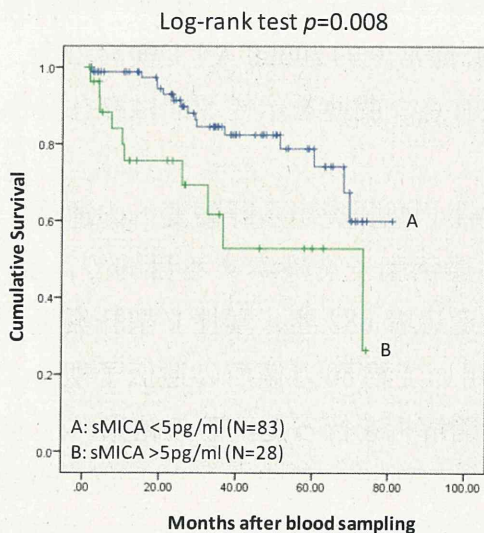


また MICA 以外の新たな肝癌発症のバイオマーカーを探索する目的で、欧米人で肝疾患や様々な癌との関連が報告された遺伝子多型約 300 について日本人症例 (肝癌約 1500 症例、健常人約 20000 人) で検討した。その結果有意な関連を示す SNP は存在しなかった。

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 (参考文献 2)。

また 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、健常者 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 (参考文献 1)。



また中国人で 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 (参考文献 8)。

また肝機能と関連を示す血小板値と関連する遺伝子多型を国際共同研究によって検討し、BAK1 多型を同定した (参考文献 5)。

2) さらにゲノム創薬へ向けた研究として、遺伝子多型の MICA の発現調節機構の解明をまず進めた。MICA のプロモーターの解析の結果、アレル特異的に転写因子 SP-1 が結合し、MICA の転写を活性化する事が示された。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 (参考文献 3)。SP-1 に対して親和性が高いアレルを持つ人では、血清 MICA 値が高く、肝癌の発症リスクが低くなることから、MICA が肝癌発症に対して予防的に働くことが示され、MICA の活性化が肝癌の治療に有用となりうる事が示された。

#### D. 考察

我々の遺伝子解析の結果、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。

現在、MICA 多型が肝癌以外の疾患発症に関与するかについても検討を進めている。MICA は様々なウイルス感染細胞や癌で発現上昇していることから、MICA を標的とした治療薬は、HCV 陽性肝癌だけでなく他の癌でも有用となると期待できる。また MICA は通常の分子標的薬とは作用機序が異なる



ため、抗癌剤と併用することで相加的な効果が期待できると考えられる。

#### 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。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. V. Kumar, P.H. Yi Lo, H. Sawai, N. Kato, A. Takahashi, Z. Deng, Y. Urabe, H. Mbarek, K. Tokunaga, Y. Tanaka, M. Sugiyama, M. Mizokami, R. Muroyama, R. Tateishi, M. Omata, K. Koike, C. Tanikawa, N. Kamatani, M. Kubo, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PloS one* 7 (2012) e44743.

2. Y. Urabe, H. Ochi, N. Kato, V. Kumar, A. Takahashi, R. Muroyama, N. Hosono, M. Otsuka, R. Tateishi, P.H. Lo, C. Tanikawa, M. Omata, K. Koike, D. Miki, H. Abe, N. Kamatani, J. Toyota, H. Kumada, M. Kubo, K. Chayama, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, A genome-wide association study of HCV-induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at the MHC region. *Journal of hepatology* 58 (2013)875-82.

3. P.H. Yi Lo, Y. Urabe, V. Kumar, C. Tanikawa, K. Koike, N. Kato, D. Miki, K. Chayama, M. Kubo, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. *PloS one* 8(2013): e61279.

4. D. Kang, H.S. Cho, G. Toyokawa, M. Kogure, Y. Yamane, Y. Iwai, S. Hayami, T. Tsunoda, H.I. Field, **K. Matsuda**, D.E. Neal, B.A. Ponder, Y. Maehara, Y. Nakamura, R. Hamamoto, The histone methyltransferase Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (WHSC1L1) is involved in human carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 52 (2013) 126-139.

5. A. Aarnink, H.J. Garchon, Y. Okada, A. Takahashi, **K. Matsuda**, M. Kubo, Y. Nakamura, A. Blancher, Comparative analysis in cynomolgus macaque identifies a novel human MHC locus controlling platelet blood counts independently of BAK1. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 11 (2013) 384-386.

6. W. Osman, Y. Okada, Y. Kamatani, M. Kubo, **K. Matsuda**, Y. Nakamura, Association of common variants in TNFRSF13B, TNFSF13, and ANXA3 with

serum levels of non-albumin protein and immunoglobulin isotypes in Japanese.

*PloS one* 7 (2012) e32683.

7. C. Tanikawa, H. Nakagawa, Y. Furukawa, Y. Nakamura, **K. Matsuda**, CLCA2 as a p53-inducible senescence mediator.

*Neoplasia* 14 (2012) 141-149.

8. H. Sawai, N. Nishida, H. Mbarek, **K. Matsuda**, Y. Mawatari, M. Yamaoka, S. Hige, J.H. Kang, K. Abe, S. Mochida, M. Watanabe, M. Kurosaki, Y. Asahina, N. Izumi, M. Honda, S. Kaneko, E. Tanaka, K. Matsuura, Y. Itoh, E. Mita, M. Korenaga, K. Hino, Y. Murawaki, Y. Hiasa, T. Ide, K. Ito, M. Sugiyama, S.H. Ahn, K.H. Han, J.Y. Park, M.F. Yuen, Y. Nakamura, Y. Tanaka, M. Mizokami, K. Tokunaga, No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC medical genetics* 13 (2012) 47.

9. 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. *Nat Genet* 44 (2012) 430-434, S431-432.

## 2. 学会発表

1. Impact of genetic variations on chronic hepatitis B and HCV-induced hepatocellular carcinoma. ISVHLD 2012 25th June 2012 (Invited speaker).

2. 遺伝子から分かる癌になりやすい体質とは 山梨県立中央病院 がん拠点病院勉強会 26th July 2012

3. Impact of genetic variations on chronic hepatitis B and HCV-induced hepatocellular carcinoma KSLM 16th Oct 2012 (Invited speaker).

4. ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の探索ー病気になりやすい体質とは?ー第2回 Diabetes and endocrinology Forum 29th Nov 2012 (招待講演)

5. 発癌関連遺伝子解析 10年のあゆみ「オーダーメイド医療実現化プロジェクト 10年間の歩みと未来への一歩」 28th Jan 2013 (Invited)

6. GWAS revealed the roles of gene-environmental interaction in carcinogenesis JCA-AACR joint symposium 25th Feb 2013 (Invited)

7. MICA variation and soluble MICA are possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma 102th AACR meeting 2nd Apr 2012

8. 「遺伝子から分かる癌になりやすい体質とは」 泌尿器疾患ゲノム解析研究会 2012. 10. 26

9. 遺伝子、生活習慣と癌について 泌尿器疾患ゲノム解析研究会 2013. 3. 9.

## G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

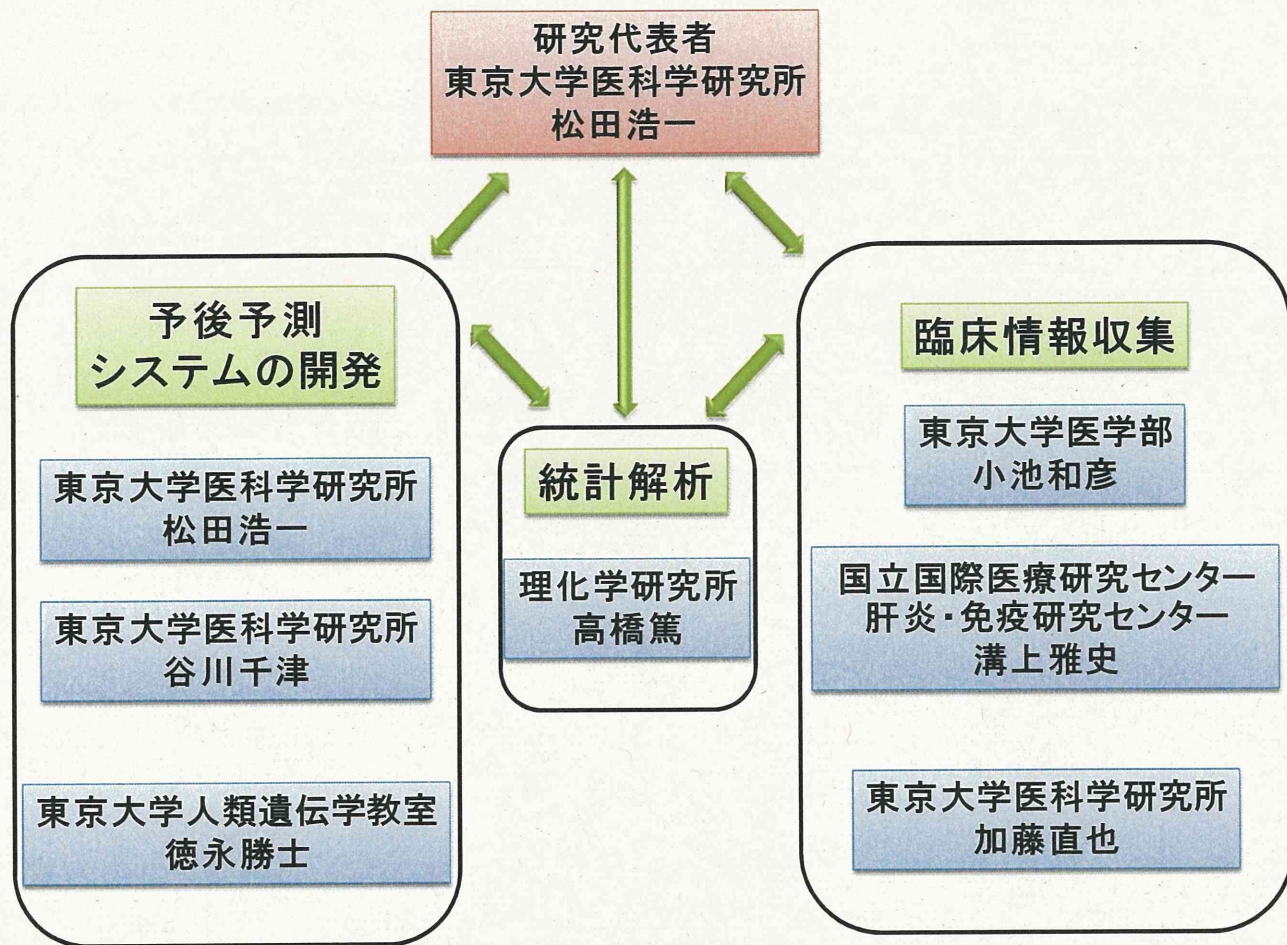
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

# 別紙1 研究体制図



## II. 分担研究報告

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

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、その多くはどの様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の臨床的な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 of 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 SNP 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

#### 2. 論文発表

1. .HY Lo, Y. Urabe, V. Kumar, **C. Tanikawa**, K. Koike, N. Kato, D. Miki, K. Chayama, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda, Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. *PloS one* 8(2013): e61279.
2. **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.
3. **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.

4. **C. Tanikawa**, H. Nakagawa, Y. Furukawa, Y. Nakamura, K. Matsuda, CLCA2 as a p53-inducible senescence mediator. *Neoplasia* 14 (2012) 141-149.

5. R. Takata, K. Matsuda, J. Sugimura, W. Obara, T. Fujioka, K. Okihara, N. Takaha, T. Miki, S. Ashida, K. Inoue, **C. Tanikawa**, T. Shuin, S. Sasaki, Y. Kojima, K. Kohri, M. Kubo, M. Yamaguchi, Y. Ohnishi, Y. Nakamura, Impact of four loci on serum tamsulosin hydrochloride concentration. *J Hum Genet* 58 (2013) 21-26.

6. Y. Urabe, H. Ochi, N. Kato, V. Kumar, A. Takahashi, R. Muroyama, N. Hosono, M. Otsuka, R. Tateishi, P.H. Lo, **C. Tanikawa**, M. Omata, K. Koike, D. Miki, H. Abe, N. Kamatani, J. Toyota, H. Kumada, M. Kubo, K. Chayama, Y. Nakamura, K. Matsuda, A genome-wide association study of HCV-induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at the MHC region. *Journal of hepatology* 58 (2013)875-82.

7. V. Kumar, P.H. Yi Lo, H. Sawai, N. Kato, A. Takahashi, Z. Deng, Y. Urabe, H. Mbarek, K. Tokunaga, Y. Tanaka, M. Sugiyama, M. Mizokami, R. Muroyama, R. Tateishi, M. Omata, K. Koike, **C. Tanikawa**, N. Kamatani, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda, Soluble MICA and a MICA variation as

possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PloS one* 7 (2012) e44743.

#### 1. 学会発表

1) Regulation of histone modification and chromatin structure by p53-PADI4 pathway. Chizu Tanikawa, Koichi Matsuda, and Yusuke Nakamura 103th American association of cancer research. Chicago, USA 2012

2) The role of histone citrullination through p53/PADI4 network in carcinogenesis. Chizu Tanikawa, Koichi Matsuda, Yataro Daigo, Yusuke Nakamura 第71回 日本癌学会学術総会 札幌 2012.

3) A genome-wide association study identifies two susceptibility loci for duodenal ulcer+F42 in the Japanese population 第71回 日本癌学会学術総会 札幌 2012.

4) Functional SNP in MICA binding to SP1 is associated with HCV-induced hepatocellular carcinoma. 第71回 日本癌学会学術総会 札幌 2012.

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

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

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：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）

研究協力者：後藤 寛（東京大学医科学研究所 疾患制御ゲノム医学ユニット 日本学術振興会 特別研究員）

室山 良介（東京大学医科学研究所 疾患制御ゲノム医学ユニット 特任助教）

研究要旨：

我々のグループは、慢性C型肝炎からの発癌にMICA遺伝子上のSNPが関与することを見出し、その遺伝子型と血中MICA濃度が強く相関することを報告した。その成果に基づき、肝癌の発症リスク予測システムを遺伝因子の組み合わせにより構築し、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べく、本研究を行っている。本研究の成果を、患者の予後改善や治療に伴う負担の減少、ならびに日本発の肝癌治療薬の開発に結びつけたいと考えている。

A. 研究目的

前年度までの成果として、我々は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癌細胞株を樹立した。本年度はこの肝癌細胞株を用いてMICAの発現を制御しうる化合物の小規模スクリーニングを行い、該当する化合物の探索を試みた。

B. 研究方法

スクリーニングを行うための肝癌細胞株として、MICAのプロモータ下で制御されるルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現する肝癌細胞株を用いた。この細胞株に対し、市販のFDA-approved Drug Library（約640種類のDrug Library）を用いて小規模スクリーニングを行った。化合物の細胞毒性は、細胞によるテトラゾリウム塩還元産物の培養上清中の吸光度により評価した。小規模スクリーニングにより候補とされた化合物に対しては、該当化合物を細胞株に添加後、リアルタイムPCRにて実際にMICAのmRNAが変化しているか否かを検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は培養細胞系において行われており倫理面への配慮を必要とする研究に該当しない。

C. 研究結果

酪酸ナトリウム（NaB）はHDAC inhibitorの一種で、今までに肝癌細胞株やヒト白血病T細胞株においてMICA発現誘導が報告されている。実際に細胞毒性が認められないNaB処理により、ルシフェラーゼ活性は著明に上昇し、リアルタイムPCRにてMICAのmRNAレベルの上昇が確認された。またFDA-approved Drug Libraryによる小規模スクリーニングにより、MICAの発現を制御しうる薬剤候補が見出され、実際にMICAのmRNA発現量の変化も確認された。

D. 考察

MICAの発現誘導能が報告されているNaB処理により、肝癌細胞株におけるMICAのmRNA発現量上昇を本研究でも観察した。とりわけNaBのHDAC阻害活性は興味深く、ヒストンアセチル化を標的とした薬剤の治療



応用の可能性が示唆される。加えて本スクリーニング・システムを用いた小規模スクリーニングにおいて見出された薬剤は、全て FDA 承認薬であり、将来的に臨床応用が可能な肝臓治療薬となる可能性を有している。また、本スクリーニング・システムを用いて大規模な化合物スクリーニングを行えば、さらなる肝臓治療薬の候補となる化合物が同定されることが期待される。

## E. 結論

前年度までに樹立したスクリーニング・システムを用いて MICA の発現を制御する化合物の小規模スクリーニングを行ない、該当化合物の候補を見出した。また、本研究によるスクリーニング・システムを用いることにより、MICA 発現調節を介した新規肝臓治療薬の開発が期待できるものと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kumar V, Lo PHY, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. PLoS One 2012; 7: e44743

2) Lo PHY, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. PLoS One 2013; 8: e61279

### 2. 学会発表

1) HDAC inhibitors are potent suppressors of HCV-induced hepatocarcinogenesis by upregulating MICA, a GWAS-identified HCC susceptibility gene. 1893. Kaku Goto, Ryosuke Muroyama, Norie Kowatari, Ryo Nakagawa,

Wenwen Li, Naoya Kato: The liver meeting 2012. Boston, MA. 13 November, 2012

2) Exploration for inducers of MICA, a GWAS-identified genetic susceptibility factor for HCV-induced HCC. P.039. Kaku Goto, Ryosuke Muroyama, Norie Kowatari, Ryo nakagawa, Wenwen Li, Naoya Kato: 19th International symposium on hepatitis C virus and related viruses. Venice, Italy. 6 October, 2012

3) 後藤覚、室山良介、李雯雯、中川良、古渡礼恵、加藤直也: C 型肝臓感受性を決定する遺伝子 MICA を誘導する薬剤による肝臓癌抑制法の開発。第 16 回肝臓学会大会 (第 20 回日本消化器関連学会週間)、肝 P-161、神戸、2012 年 10 月

4) 後藤覚、室山良介、李雯雯、中川良、古渡礼恵、加藤直也: C 型肝臓感受性遺伝子 MICA を誘導する薬剤の探索。第 48 回日本肝臓学会総会、OWS-295、金沢、2012 年 6 月

## G. 知的所得権の出願・登録状況 特になし

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

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。今年度は、新たに139例分のDNA検体（内、肝細胞癌例62人、非癌患者77人）、血清については、299人の検体を採取した。これまでに収集されていた1168人分の血清を用いてMICAの測定を行った。今後コホート研究によって血清MICA濃度と発癌リスクの関係を明らかにする予定である。

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

昨年度確立した統合肝疾患データベース(DB)上に作成した血清DBおよびDNA検体DBから、外来通院中でこれまでに検体をいただいて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、保存を行った。得られた血清サンプルから肝発癌のリスク遺伝子として同定されているMICA（MHC class I polypeptide-related sequence A）の血中濃度測定を行った。

（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 1761 人分であったが、平成 24 年度はさらに 139 例分の DNA 検体（内、肝細胞癌例 62 人、非癌患者 77 人）を採取した。血清については、299 人の検体を採取した。

これまでに収集されていた 1168 人分の血清を用いて MICA の測定を行った。平均値は、 $294.6 \pm 258.9$  pg/mL、中央値（範囲）は、 $247.3$  (0-2164) pg/mL であった。肝発癌を認めた患者と認めなかった患者の比較（横断研究）では、既報の通り、前者の方が有意に高値であった。（ $330.9$  vs.  $267.5$  pg/mL）。MICA 測定後に肝発癌を認めた患者が 16 人存在した。

### L. 考察

血中の MICA 濃度は、肝疾患の病態の進展と共に高値になると考えられる。

### M. 結論

横断研究で示された結果をコホート研究で証明するためには、さらなる経過観察期間が必要である。今後 C 型以外の慢性肝疾患との比較を行うことによって慢性肝疾患別の血中 MICA と病態との関連を明らかにする。

### N. 研究発表

（発表誌名巻合・頁・発行年等も記入）  
論文発表

- 1) Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. **Biochem Biophys Res Commun** 2013 Jan 31. doi:pii: S0006-291X(13)00183-6. 10.1016/j.bbrc.2013.01.093. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23376718.
- 2) Hikita H, Enooku K, Satoh Y, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Tateishi R, Soroida Y, Sato M, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1. **Hepatol Res** 2013 Jan 3. doi:10.1111/hepr.12061. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23356977.
- 3) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. **J Hepatol** 2013 Jan 12. doi:pii: S0168-8278(13)00011-1. 10.1016/j.jhep.2012.12.024. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23321320.

- 4) Gotoh H, Enooku K, Soroida Y, Sato M, Hikita H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Yamazaki T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement observed at a general health examination: A cross-sectional study. **Hepatol Res** 2012 Nov 27. doi: 10.1111/hepr.12029. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23279215.
- 5) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H. Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. **Hepatol Res** 2012 Nov 2. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01115.x. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23131000.
- 6) Ohki T, Isogawa A, Iwamoto M, Ohsugi M, Yoshida H, Toda N, Tagawa K, Omata M, Koike K. The effectiveness of liraglutide in nonalcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus compared to sitagliptin and pioglitazone. **ScientificWorldJournal** 2012;2012:496453. Epub 2012 Aug 13. PubMed PMID:22927782.
- 7) Kurano M, Hara M, Tsuneyama K, Okamoto K, Iso-O N, Matsushima T, Koike K, Tsukamoto K. Modulation of lipid metabolism with the over-expression of NPC1L1 in mice liver. **J Lipid Res** 2012 Aug 13. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22891292.
- 8) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- $\kappa$ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. **Hepatology** 2013;57:162-170. PubMed PMID: 22898998.
- 9) Hikita H, Nakagawa H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Yoshida H, Omata M, Soroida Y, Sato M, Gotoh H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. **J Gastroenterol** 2012 Jul 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790352.
- 10) Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **J Gastroenterol** 2012 Jul 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790350.
- 11) Okushin K, Asaoka Y, Fukuda I, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Mikami S, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Tateishi R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Koike K. IGF-II producing hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: metabolic complications and a foresight to molecular targeting therapy to the IGF signal. **Case Rep Gastroenterol** 2012;6(3):784-789. PubMed PMID: 23341802.
- 12) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. **J Infect Chemother** 2012;18(6):883-890. PubMed PMID: 22760340.