

201314013A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：松田 浩一
平成 26 年 (2014) 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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：松田 浩一
平成 26 年 (2014) 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----- 13
(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----- 16
(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----- 19
(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----- 25
(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----- 27

- IV. 研究成果の刊行物、別刷----- 37

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 25 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。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を進め、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8000名、HCV陽性肝硬変2500名、HCV陽性肝癌患者2200名のサンプルを収集した。

②HCV陽性肝癌やHCV陽性肝硬変との関連遺伝子としてMICA及びHLA-DQを同定した。さらに新規の予後関連遺伝子の同定を目的に、慢性C型肝炎約4000例、HCV陽性肝癌1000例、HCV陽性肝硬変1200例を用いて、ゲノムワイドのタイピングを施行した。これらの結果を元に、新規疾患感受性遺伝子の探索を進めている。また既報の遺伝子についても日本人症例での検討を行なった。その結果TULP1上のSNPは肝硬変のリスクと相関を示したが、他のSNPは関連を示さなかった。これらの結果より、HCV感染後の予後における人種差が明らかとなった。

③MICAの発現を誘導する市販薬剤のスクリーニングの結果、MICAの発現を約20倍増加させる薬剤を同定した。発がんリスクを低下させるSNPはMICAの高値となることより、MICAの発現誘導することで、癌化が抑制されうると考えられた。薬剤によるMICA調節のメカニズムや、発現誘導における遺伝子多型の影響についてさらなる解析を進めている。

④MICAのプロモーター解析の結果、rs2596542が機能的なSNPであることを明らかとした。疾患に対してnon-riskとなるGアレル特異的に転写因子SP1が結合し、MICAの発現量を増加させる事が示された。またMICA遺伝子の3' UTRに結合するmiR25-93-106b clusterによっても、MICAの発現が制御されることが示された。

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・肝硬変の発症と関連することが示された。これまでに延べ10000人近いHCV関連疾患患者の臨床情報及びDNAが収集されており、患者の多くで血清が複数年度に渡って収集されている。我々が有する症例は、世界レベルでも最大規模の患者コホートと考えられる。我々のゲノム解析によって同定された予後予測因子を実際にこれらの患者群で検証することにより、バイオマーカーとしての有用性が確認出来れば、介入試験に向けたモデルの構築が可能となる。

またMICAの発現制御に関わる転写因子や、miRNAが複数明らかとなっており、また実際に発現を誘導可能な薬剤も同定された。MICAが高くなりやすい方では、肝癌のリスクが高くなることから、MICAの発現を誘導することで、肝癌の予防、治療に役立つと期待される。今後は、遺伝子型を中心とした個人ごとの予後予測だけでなく、薬剤を用いた治療法の開発に向けて研究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。我々はMHC class1 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2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
2. MICAの活性化による肝癌予防法・治療薬の開発(ゲノム創薬)

B. 研究方法

本年度は、具体的に以下の2つを行った。

1. 比較対照研究による肝癌、肝硬変発症リスク予測システムの構築

共同研究機関において：慢性C型肝炎、HCV陽性肝硬変、HCV陽性肝癌症例の収集を進めた。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国府台病院を合わせて、慢性C型肝炎患者8000名、HCV陽性肝硬変2500名、HCV陽性肝癌患者2200名のサンプルを収集した。

また東京大学医科学研究所の症例を中心にIllumina Omni express exome, Illumina HumanHap610のプラットフォームを用いたタイピングを行なう。上記の症例に加え、健常者30000人のデータを用いて、慢性C型肝炎、HCV陽性肝硬変、HCV陽性肝癌の発症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、遺伝子多型のタイピングは松田、谷川、徳永が担当、統計解析を高橋が担当する。

さらに患者由来の血清を用いてMICAの濃度測定を松田、加藤が行なう。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。

2. 慢性肝炎・肝癌患者におけるMICAの制

御機構の解析とゲノム創薬に向けた研究

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. 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. 比較対照研究による肝癌、肝硬変発症リスク予測システムの構築

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 1)。また既報の遺伝因子についても日本人症例での検討を行なった。その結果 TULP1 上の SNP は肝硬変のリスクと相関を示したが、他の SNP は関連を示さなかった。これらの結果より、HCV 感染後の予後における人種差が明らかとなった。

2. 慢性肝炎・肝癌患者における MICA の制御機構の解析とゲノム創薬に向けた研究

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ことが示された。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 2)。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ことを示された。

また MICA の発現を誘導する市販薬剤のスクリーニングの結果、MICA の発現を約 20 倍増加させる薬剤を同定した。発がんリスクを低下させる SNP は MICA の高値となることより、MICA の発現誘導することで、癌化が抑制されうると考えられた。薬剤による MICA 調節のメカニズムや、発現誘導における遺伝子多型の影響についてさらなる解析を進めている。

D. 考察

我々の遺伝子解析の結果、慢性C型肝炎の予後とかがわかる複数の新規遺伝因子が明らかとなった。また欧米人の解析で報告された遺伝因子が必ずしも日本人で関連を示さないことから、日本人の症例での検討する必要性が示された。今後遺伝因子やウイルス側の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を目指す。

さらには、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。

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・肝硬変の発症と関連することが示された。これまでに延べ10000人近いHCV関連疾患患者の臨床情報及びDNAが収集されており、患者の多くで血清が複数年度に渡って収集されている。我々が有する症例は、世界レベルでも最大規模の患者コホートと考えられる。我々のゲノム解析によって同定された予後予測因子を実際にこれらの患者群で検証することにより、バイオマーカーとしての有用性が確認出来れば、介入試験に向けたモデルの構築が可能となる。

またMICAの発現制御に関わる転写因子や、miRNAが複数明らかとなっており、また実際に発現を誘導可能な薬剤も同定された。

MICAが高くなりやすい方では、肝癌のリスクが高くなることから、MICAの発現を誘導することで、肝癌の予防、治療に役立つと期待される。今後は、遺伝子型を中心とした個人ごとの予後予測だけでなく、薬剤を用いた治療法の開発に向けて研究を進

めていく予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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(5):875-82. (2013).
2. P.H. 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.
3. 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.
4. J. Wang, L.G. Carvajal-Carmona, J.H. Chu, A.G. Zaubler, A.T. Collaborators, M. Kubo, K. Matsuda, M. Dunlop, R.S. Houlston,

- O.M. Sieber, L. Lipton, P. Gibbs, N.G. Martin, G.W. Montgomery, J.P. Young, P.N. Baird, M.J. Ratain, Y. Nakamura, S. Weiss, I. Tomlinson, M.M. Bertagnolli, Germline Variants and Advanced Colorectal Adenomas: Adenoma Prevention with Celecoxib Trial Genomewide Association Study. *Clin Cancer Res* (2013).
- 5.C.M. O'Seaghdha, H. Wu, Q. Yang, K. Kapur, I. Guessous, A.M. Zuber, A. Kottgen, C. Stoudmann, A. Teumer, Z. Kutalik, M. Mangino, A. Dehghan, W. Zhang, G. Eiriksdottir, G. Li, T. Tanaka, L. Portas, L.M. Lopez, C. Hayward, K. Lohman, K. Matsuda, S. Padmanabhan, D. Firsov, R. Sorice, S. Ulivi, A.C. Brockhaus, M.E. Kleber, A. Mahajan, F.D. Ernst, V. Gudnason, L.J. Launer, A. Mace, E. Boerwinckle, D.E. Arking, C. Tanikawa, Y. Nakamura, M.J. Brown, J.M. Gaspoz, J.M. Theler, D.S. Siscovick, B.M. Psaty, S. Bergmann, P. Vollenweider, V. Vitart, A.F. Wright, T. Zemunik, M. Boban, I. Kolcic, P. Navarro, E.M. Brown, K. Estrada, J. Ding, T.B. Harris, S. Bandinelli, D. Hernandez, A.B. Singleton, G. Grotto, D. Ruggiero, A.P. d'Adamo, A. Robino, T. Meitinger, C. Meisinger, G. Davies, J.M. Starr, J.C. Chambers, B.O. Boehm, B.R. Winkelmann, J. Huang, F. Murgia, S.H. Wild, H. Campbell, A.P. Morris, O.H. Franco, A. Hofman, A.G. Uitterlinden, F. Rivadeneira, U. Volker, A. Hannemann, R. Biffar, W. Hoffmann, S.Y. Shin, P. Lescuyer, H. Henry, C. Schurmann, P.B. Munroe, P. Gasparini, N. Pirastu, M. Ciullo, C. Gieger, W. Marz, L. Lind, T.D. Spector, A.V. Smith, I. Rudan, J.F. Wilson, O. Polasek, I.J. Deary, M. Pirastu, L. Ferrucci, Y. Liu, B. Kestenbaum, J.S. Kooner, J.C. Witteman, M. Nauck, W.H. Kao, H. Wallaschofski, O. Bonny, C.S. Fox, M. Bochud, Meta-analysis of genome-wide association studies identifies six new Loci for serum calcium concentrations. *PLoS Genet* 9 (2013) e1003796.
5. T. Yasui, A. Okada, Y. Urabe, M. Usami, K. Mizuno, Y. Kubota, K. Tozawa, S. Sasaki, Y. Higashi, Y. Sato, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda, K. Kohri, A replication study for three nephrolithiasis loci at 5q35.3, 7p14.3 and 13q14.1 in the Japanese population. *J Hum Genet* 58 (2013) 588-593.
6. C. Tanikawa, K. Matsuo, M. Kubo, A. Takahashi, H. Ito, H. Tanaka, Y. Yatabe, K. Yamao, N. Kamatani, K. Tajima, Y. Nakamura, K. Matsuda, Impact of PSCA variation on gastric ulcer susceptibility. *PloS one* 8 (2013) e63698.
7. C. Tanikawa, Y. Okada, A. Takahashi, K. Oda, N. Kamatani, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda, Genome wide association study of age at menarche in the Japanese population. *PloS one* 8 (2013) e63821.
8. 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.
- 9.S.W. Yee, J.A. Mefford, N. Singh, M.E. Percival, A. Stecula, K. Yang, J.S. Witte, A. Takahashi, M. Kubo, K. Matsuda, K.M. Giacomini, C. Andreadis, Impact of polymorphisms in drug pathway genes on disease-free survival in adults with acute myeloid leukemia. *J Hum Genet* 58 (2013) 353-361.
- 10.B. Zhang, W.H. Jia, K. Matsuo, A. Shin, Y.B. Xiang, K. Matsuda, S.H. Jee, D.H. Kim, P.Y. Cheah, Z. Ren, Q. Cai, J. Long, J. Shi, W. Wen, G. Yang, B.T. Ji, Z.Z. Pan, F. Matsuda, Y.T. Gao, J.H. Oh, Y.O. Ahn, M. Kubo, L.F. Thean, E.J. Park, H.L. Li, J.W. Park, J. Jo, J.Y. Jeong, S. Hosono, Y. Nakamura, X.O. Shu, Y.X. Zeng, W. Zheng, Genome-wide association study identifies a new SMAD7 risk variant associated with colorectal cancer risk in East Asians. *International journal of cancer. Journal international du cancer* (2014).
- 11.T. Kashiwara, K. Oda, Y. Ikeda, Y. Shiose, Y. Hirota, K. Inaba, C. Makii, R. Kurikawa, A. Miyasaka, T. Koso, T. Fukuda, M. Tanikawa, K. Shoji, K. Sone, T. Arimoto, O. Wada-Hiraike, K. Kawana, S. Nakagawa, K. Matsuda, F. McCormick, H. Aburatani, T. Yano, Y. Osuga, T. Fujii, Antitumor Activity and Induction of TP53-Dependent Apoptosis toward Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma by the Dual PI3K/mTOR Inhibitor DS-7423. *PloS one* 9 (2014) e87220.
- 12.J. Lin, Z. Deng, C. Tanikawa, T. Shuin, T. Miki, K. Matsuda, Y. Nakamura, Downregulation of the tumor suppressor HSPB7, involved in the p53 pathway, in renal cell carcinoma by hypermethylation. *Int J Oncol* (2014).
2. 学会発表
1. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. AACR 2013 3rd April 2013.
 2. ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の探索-病気になりやすい体質とは?- 第3回泌尿器科最新治療セミナー 福島県立医大 23rd April 2013
 3. 個別化医療へ向けた遺伝子多型研究 第13回 東京大学生命科学シンポジウム 8th June 2013 (招待講演).
 4. 個別化医療へ向けた遺伝子多型研究 第36回日本がん疫学・分子疫学研究会 29th 21st June 2013 (招待講演)
 5. The roles of gene-environmental interaction in human carcinogenesis. 日本癌学会シンポジウム 2013. 10. 2. 横浜
 6. 「聞いて納得! 遺伝子と病気の関係 ~がん・糖尿病・アレルギーなど~」 市民公開講座 ひとりひとりに合った医療をめざして」 2013. 12. 8. 盛岡 (Invited speaker).
 7. GWAS of diseases related with *Helicobacter pylori* infection. The 4th

JCA-AACR Symposia: 17th Dec 2013
(Invited)

8. 全ゲノム関連解析による 発癌リスク、
予後予測因子の探索 「がん臨床診断研究の
検証支援によるバイオマーカー開発の迅速
化」公開シンポジウム 2013.12.16. 横浜
(Invited speaker).

9. 慢性B型肝炎のゲノムワイド遺伝的関
連研究 JDDW W3(肝臓、消化器) 2013.10.9.
東京(Invited speaker).

F. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

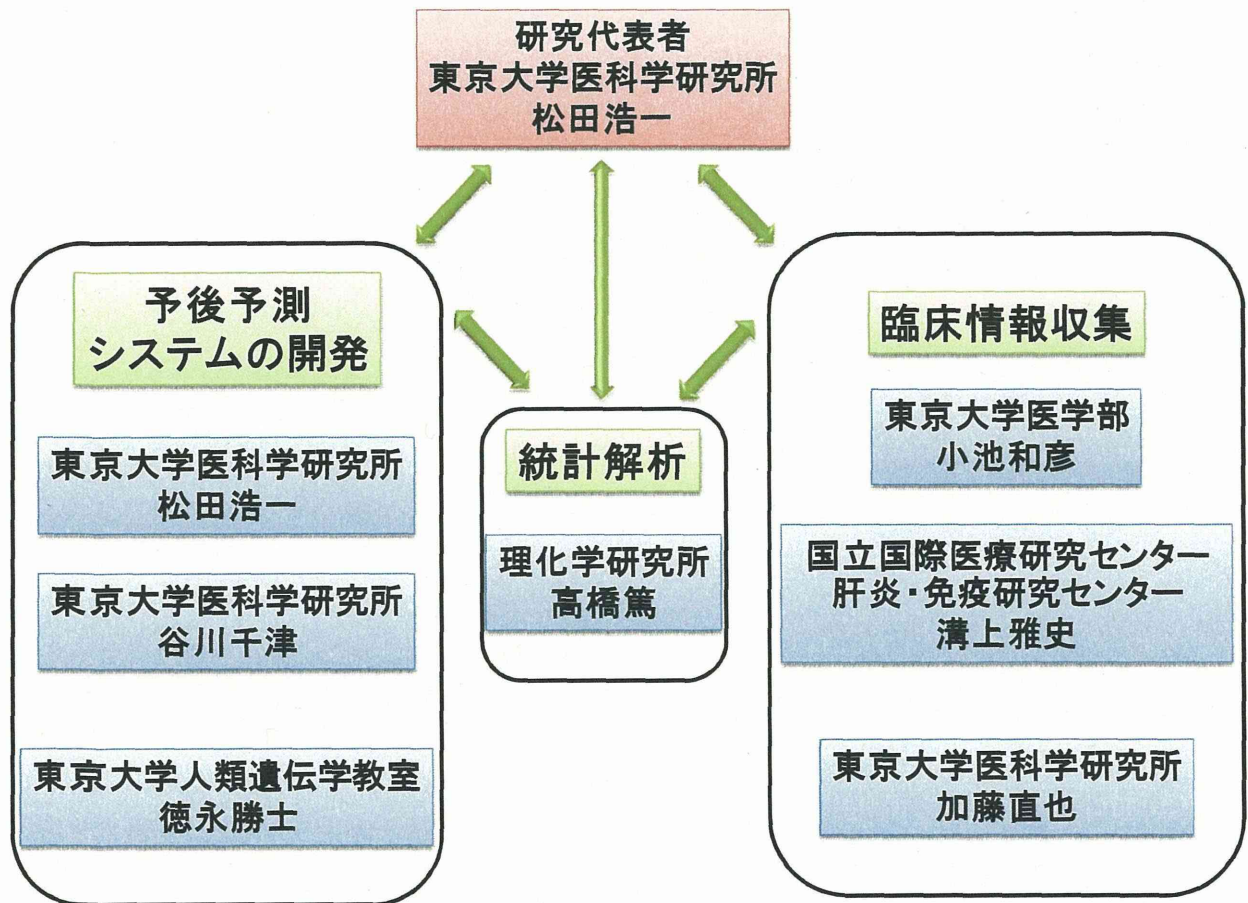
2. 実用新案登録

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 25 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 助教

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。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。

H25年度は、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。さらのMICA多型の他の発癌に及ぼす影響について検討した。H25年度の成果として、MICA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。また肝癌以外については、有意な相関を認めなかった。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、肝癌に対して抗腫瘍効果が期待できる。

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。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 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 が存在しなかつ

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 SP1 の過剰発現によって、MICA の発現量が増加した。以上の結果より、SP1 の結合状態を変えることで、アレル特異的な発現量変化がもたらされると考えられる。

G. 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。この結果より、MICA の発現を高めるとともに、MICA の切断を抑制することが癌化の予防、治療に有効であることが示唆された。

H. 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。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。また薬剤による MICA の発現誘導も有効であると期待される。今後のこれらの成果を元に、治療薬の開発を目指す予定である。

I. 研究発表

論文発表

1. 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(5):875-82. (2013).
2. P.H. 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.
3. C.M. O'Seaghda, H. Wu, Q. Yang, K. Kapur, I. Guessous, A.M. Zuber, A. Kottgen, C. Stoudmann, A. Teumer, Z. Kutalik, M. Mangino, A. Dehghan, W. Zhang, G. Eiriksdottir, G. Li, T. Tanaka, L. Portas, L.M. Lopez, C. Hayward, K. Lohman, K. Matsuda, S. Padmanabhan, D. Firsov, R. Sorice, S. Ulivi,

- A.C. Brockhaus, M.E. Kleber, A. Mahajan, F.D. Ernst, V. Gudnason, L.J. Launer, A. Mace, E. Boerwinckle, D.E. Arking, **C. Tanikawa**, Y. Nakamura, M.J. Brown, J.M. Gaspoz, J.M. Theler, D.S. Siscovick, B.M. Psaty, S. Bergmann, P. Vollenweider, V. Vitart, A.F. Wright, T. Zemunik, M. Boban, I. Kolcic, P. Navarro, E.M. Brown, K. Estrada, J. Ding, T.B. Harris, S. Bandinelli, D. Hernandez, A.B. Singleton, G. Giroto, D. Ruggiero, A.P. d'Adamo, A. Robino, T. Meitinger, C. Meisinger, G. Davies, J.M. Starr, J.C. Chambers, B.O. Boehm, B.R. Winkelmann, J. Huang, F. Murgia, S.H. Wild, H. Campbell, A.P. Morris, O.H. Franco, A. Hofman, A.G. Uitterlinden, F. Rivadeneira, U. Volker, A. Hannemann, R. Biffar, W. Hoffmann, S.Y. Shin, P. Lescuyer, H. Henry, C. Schurmann, P.B. Munroe, P. Gasparini, N. Pirastu, M. Ciullo, C. Gieger, W. Marz, L. Lind, T.D. Spector, A.V. Smith, I. Rudan, J.F. Wilson, O. Polasek, I.J. Deary, M. Pirastu, L. Ferrucci, Y. Liu, B. Kestenbaum, J.S. Kooner, J.C. Witteman, M. Nauck, W.H. Kao, H. Wallaschofski, O. Bonny, C.S. Fox, M. Bochud, Meta-analysis of genome-wide association studies identifies six new Loci for serum calcium concentrations. *PLoS Genet* 9 (2013) e1003796.
4. **C. Tanikawa**, K. Matsuo, M. Kubo, A. Takahashi, H. Ito, H. Tanaka, Y. Yatabe, K. Yamao, N. Kamatani, K. Tajima, Y. Nakamura, K. Matsuda, Impact of PSCA variation on gastric ulcer susceptibility. *PloS one* 8 (2013) e63698.
5. **C. Tanikawa**, Y. Okada, A. Takahashi, K. Oda, N. Kamatani, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda, Genome wide association study of age at menarche in the Japanese population. *PloS one* 8 (2013) e63821.
6. 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.
7. J. Lin, Z. Deng, **C. Tanikawa**, T. Shuin, T. Miki, K. Matsuda, Y. Nakamura, Downregulation of the tumor suppressor HSPB7, involved in the p53 pathway, in renal cell carcinoma by hypermethylation. *Int J Oncol* (2014).
1. 学会発表
- 1) A genome-wide association study identifies PSCA as a susceptible locus for gastric cancer and duodenal ulcer in the Japanese population. Chizu Tanikawa, Koichi Matsuda, and Yusuke Nakamura 104th American association of cancer research. Washington D.C., USA 2013.4.7.
- 2) p53-PADI4 経路によるシトルリン化基質の探索. Chizu Tanikawa, Koichi Matsuda, Yataro Daigo, Yusuke Nakamura 第 72 回 日本癌学会学術総会 横浜 2013.10.3.
- 3) Identification of candidate tumor suppressor gene LBC1 in breast cancer 第 72 回 日本癌学会学術総会 横浜 2013.10.3-5.
- 4) p53 は p53IRI の発現誘導を介して細胞内鉄量の調節に関与する. 第 72 回 日本癌学会学術総会 横浜 2013.10.3-5.

J. 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（平成 25 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：加藤 直也・東京大学医科学研究所 先端ゲノム医学分野・准教授
研究協力者：室山 良介・東京大学医科学研究所 先端ゲノム医学分野・特任助教
後藤 覚・東京大学医科学研究所 先端ゲノム医学分野・日本学術振興会
特別研究員

分担研究課題：前向きコホートの検討、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：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、その遺伝子型と血中MICA濃度が強く相関すること、から、リスクに基づいた個別化医療の実現を目的として、1) MICAの発現調節機構の解明、および2) MICAを標的としたゲノム創薬、につき取り組んだ。その結果、1) MICAの発現にはmiRNAが重要な役割を担っていること、MICAの遺伝子座のSNPによる血中MICA濃度の違いは、プロモーター領域上のSNPによる転写活性の相違により規定されていること、を見出した。また、2) MICA発現を上昇させる薬剤を見出した。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発癌予防薬の開発に結びつけたいと考えている。

A. 研究目的

- 1) MICA の発現調節において、その SNP が microRNA (miRNA) を介する制御に関与しているかどうか、また、同様に SNP が mRNA の転写活性に影響をおよぼしているかどうかにつき明らかにする。
- 2) MICA 発現を増強する薬剤の探索を目的とする。

B. 研究方法

- 1) 肝癌細胞株のうち、C型肝癌のプロテクティブアレルを有する HLE 細胞と、リスクアレルを有する Huh7 細胞の配列を検討に用いた。miRNA を介する制御については、MICA の 3'-UTR を 3'-UTR luc vector にクローニングして、ルシフェラーゼ活性を測定することにより検討した。転写活性については、MICA のプロモーター領域を Luc vector にクローニングして、ルシフェラーゼ活性を測定することにより検討した。

- 2) 肝癌細胞株として Huh7、PLC/PRF/5、HepG2 細胞を用いた。薬剤は米国食品医薬品局 (FDA) 承認薬剤をスクリーニングに用いた。MICA mRNA 発現は qRT-PCR により測定した。MICA タンパク質は Immunofluorescence および FACS により検出した。培養細胞上清中可溶性 MICA (sMICA) 濃度は ELISA により測定した。転写活性については、MICA のプロモーター領域を Luc vector にクローニングして、ルシフェラーゼ活性を測定することにより検討した。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澄中吸光度により測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、今までのところ培養細胞株を用いた検討を行っており、倫理面への配慮は特に必要ない。将来的にヒト由来試料を用いる場合には、厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関

する倫理指針」を遵守する。

C. 研究結果

1) MICA の 3'-UTR 領域をクローニングした 3'-UTR luc vector を用いた検討では、HLE, Huh7 細胞由来の配列ともにルシフェラーゼ活性の低下を認めたが、両者間に差は認められなかった。

一方、MICA のプロモーター領域をクローニングした Luc vector を用いた検討では、Huh7 細胞由来の配列に比し、HLE 細胞由来の配列では約 3~4 倍、ルシフェラーゼ活性が高値であった。両者間のルシフェラーゼ活性の相違を生じさせる SNP を探索したところ、現在までにプロモーター領域上の 2 SNPs が候補 SNPs として見出された。

2) 構築した MICA プロモーター活性測定細胞系を用いて FDA 承認薬剤ライブラリーを用いて強力に MICA プロモーターを活性化させる薬剤を複数同定した。そのうち、最も強力な活性を示した薬剤により処理を行った結果、細胞毒性をもたらさない濃度においてレポーター細胞の濃度依存的なルシフェラーゼ活性上昇が認められると共に、Huh7、PLC/PRF/5、HepG2 細胞において MICA mRNA、細胞膜上タンパク質、sMICA 濃度の上昇が観察された。

D. 考察

1) MICA の発現調節に、miRNA の関与が示唆されたが、3'-UTR 上の SNP は影響しない。一方、MICA の転写活性にはプロモーター上の SNP が影響しており、この SNP の違いにより、MICA の発現量が異なると考えられた。

2) FDA 承認薬ライブラリーを用いたスクリーニングにより同定した候補薬剤のうち最も強力な活性を有していたものは他の癌腫に対して現在使用されている抗癌剤であるため、早期に肝癌治療にも応用されると期待される。今後は同定した薬剤の抗肝癌効果を調べるための培養細胞系またモデル動物を用いた免疫細胞による抗腫瘍効果検証実験、MICA 誘導作用機序の分子レベル

での解析、大規模ハイスループットスクリーニングを視野に入れており、同定した薬剤の MICA 発現増強機序の解明と共に、新規に同定される低分子化合物は肝癌に対する抗腫瘍免疫療法の魅力的な候補となることが期待される。

E. 結論

1) MICA の発現には miRNA が重要な役割を担っており、MICA の遺伝子座の SNP による血中 MICA 濃度の違いは、プロモーター領域上の SNP による転写活性の相違により規定されていた。

2) MICA 発現を上昇させる薬剤を見出した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Lo PH, 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

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; 58: 875-882

Goto K, Lin W, Zhang L, Jilg N, Shao RX, Schaefer EA, Zhao H, Fusco DN, Peng LF, Kato N, Chung RT. The AMPK-related kinase SNARK regulates hepatitis C virus replication and pathogenesis through enhancement of TGF- β Signaling. J Hepatol 2013; 59: 942-948

Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S,

Yoshida H, Omata M, Koike K. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2013 (Epub ahead of print)

Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, Taguri M, Koike K. Impact of IL28B genetic variation on HCV-induced liver fibrosis, inflammation, and steatosis: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9: e91822

Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. The impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 2013 (Epub ahead of print)

2. 学会発表

Naoya Kato, Vinod Kumar, Ryosuke Muroyama, Ryosuke Tateishi, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Masao Omata, Kazuhiko Koike, Koichi Matsuda. MICA plays an opposite role in hepatocarcinogenesis between hepatitis B and hepatitis C. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Amsterdam, Netherlands. 24-28 April, 2013

Kaku Goto, Ryosuke Muroyama, Wenwen Li, Norie Kowatari, Ryo Nakagawa, Naoya Kato. Effective inducers of a GWAS-discovered anti-HCC gene MICA. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 7 October, 2013

Ryosuke Muroyama, Vinod Kumar, Kaku Goto, Norie Kowatari, Wenwen Li, Ryo Nakagawa, Ryosuke Tateishi, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizokami, Masao Omata, Kazuhiko Koike, Koichi Matsuda, Naoya Kato. MICA might have opposite effect on hepatocarcinogenesis between B-HCC and C-HCC. 2013 International Meeting on Molecular Biology of

Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 22 October, 2013

Kaku Goto, Ryosuke Muroyama, Wenwen Li, Norie Kowatari, Ryo Nakagawa, Naoya Kato. An HCV-HCC susceptibility gene MICA found in GWAS was effectively induced by HDAC inhibitors. The Liver Meeting 2013. Washington, DC, U.S.A. 2 November, 2013

加藤直也, 室山良介, 小池和彦. 肝発癌において自然免疫関連分子 MICA は B 型肝炎と C 型肝炎では反対の役目を担っている. 第 49 回日本肝臓学会総会. 東京. 2013 年 6 月 6-7 日

後藤 覚, 室山良介, 李ウエンウエン, 中川良, 古渡礼恵, 加藤直也. GWAS により同定された肝癌感受性遺伝子 MICA の発現を誘導する薬剤の探索. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜. 2013 年 10 月

室山良介, 松田浩一, 加藤直也. ゲノムワイド関連解析による C 型肝炎/肝硬変/肝癌の感受性遺伝子の同定. 第 17 回日本肝臓学会大会. 東京. 2013 年 10 月 9 日-10 日.

後藤 覚. GWAS における HCV-HCC 感受性遺伝子 MICA の発現誘導剤探索. 肝炎ウイルス研修会 2013. 東京. 2013 年 12 月 18 日

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし