

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、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）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4つを行った。

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。

HCV陽性肝癌やHCV陽性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。

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。

MICA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 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事が示された。

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型肝炎の予後とかかわ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. Zauber, 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. Girotto, 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

