

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。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。さらなる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。

D. 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。

E. 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。

F. 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. 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.
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.

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

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 型肝炎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 細胞由来の配列とともにルシフェラーゼ活性の低下を認めしたが、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

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：小池 和彦 東京大学医学系研究科 教授
研究協力者：建石 良介 東京大学医学部附属病院 特任講師

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52例分のDNA検体（内、肝細胞癌例45人、非癌患者7人）、血清については、54人の検体を採取した。現在までに収集した88例の肝細胞癌に対する根治的治療前後の、血清のペアサンプル、1994年から2003年の間に保存されたC型慢性肝炎患者249人の血清を用いてMICA測定を行った。今後は、血清MICA濃度とrs2596542のSNP情報を合わせた検討が必要である。

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うちで遺伝的背景を持つものの詳細を明らかにするためのデータベース整備と DNA 検体・血清検体の採取を行うことを目的とした。

B. 研究方法

一昨年度確立した統合肝疾患データベース上 (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検体を頂いていない被検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 polypeptide-related sequence A)の血中濃度測定を行った。また、88 例の肝細胞癌に対する根治的治療前後の血清のペアサンプルを用いて根治的治療による MICA 濃度を検討した。さらに、1994 年から 2003 年の間に保存された C 型慢性肝炎患者 249 人の血清 MICA 濃度から肝細胞癌発症のリスクをスプライン曲線を用いて前向きに検討した。

(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への守秘義務、患者の権利保護等についての十分な説明を行い、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 24 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 1900 人分であったが、平成 25 年度はさらに 52 人分の DNA 検体 (内、肝細胞癌例 45 人、非癌患者 7 人) を採取した。

MICA 濃度は肝細胞癌を発症した患者で高いことが報告されているが、88 例のペアサンプルを用いた検討では、根治的治療後、血清 MICA は中央値 273.9 と根治的治療前に比べて有意な低下は見られなかった ($p = 0.21$, 対応のある T 検定)。また、MICA 濃度と肝細胞癌発症のリスクについては、男性では有意な相関は見られなかったが、女性においては MICA 濃度が高くなるほど肝細胞癌発症のリスクが有意に上昇した ($p = 0.04$)。

D. 考察

血中の MICA 濃度は、肝癌のリスクの推定に有用である可能性が示唆されたが、過去の GWAS の報告から予測されるものとは逆の相関であった。MICA 濃度は rs2596542 の SNP によっても影響を受けるため、SNP 情報も絡めた解析が必要である

E. 結論

血中 MICA 濃度は、肝癌の根治的治療によっては変化しない。また、C 型慢性肝炎患者の MICA 濃度は肝癌発症のリスク推定に有用な可能性がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High Ubiquitous Mitochondrial Creatine Kinase Expression in Hepatocellular Carcinoma Denotes a Poor

Prognosis with Highly Malignant Potential. *Int J Cancer* 2014;134(9): 2189-98.

(2) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Fushimi K, Koike K. Acute Liver Disease in Japan: A Nationwide Analysis of the Japanese Diagnosis Procedure Combination Database. *J Gastroenterol* 2014;49(3): 547-54.

(3) Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, Taguri M, Koike K. Impact of I128b Genetic Variation on Hcv-Induced Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2014;9(3): e91822.

(4) Kondo M, Ishizawa T, Enooku K, Tokuhara Y, Ohkawa R, Uranbileg B, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Kokudo N, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased Serum Autotaxin Levels in Hepatocellular Carcinoma Patients Were Caused by Background Liver Fibrosis but Not by Carcinoma. *Clin Chim Acta* 2014;433C: 128-34.

(5) Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased Serum Mitochondrial Creatine Kinase Activity as a Risk for Hepatocarcinogenesis in Chronic Hepatitis C Patients. *Int J Cancer* 2014.

(6) Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Otomo K, Omata M, Yoshida H, Koike K. Frequency, Risk Factors and Survival Associated with an Intrasubsegmental Recurrence after Radiofrequency Ablation for Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 2013;8(4): e59040.

(7) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama

R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. I128b Minor Allele Is Associated with a Younger Age of Onset of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Gastroenterol* 2013.

(8) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Impact of Pnpla3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatol Res* 2013.

(9) Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Mikami S, Sato M, Uchino K, Arano T, Enooku K, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Matsuyama Y, Omata M, Ohtomo K, Koike K. Ct with Hepatic Arteriopography as a Pretreatment Examination for Hepatocellular Carcinoma Patients: A Randomized Controlled Trial. *Am J Gastroenterol* 2013;108(8): 1305-13.

(10) Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K. Spontaneous Clearance of Serum Hepatitis C Virus Rna During the Clinical Course of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C. *Hepatol Res* 2013.

(11) Mikoshiba N, Miyashita M, Sakai T, Tateishi R, Koike K. Depressive Symptoms

after Treatment in Hepatocellular Carcinoma Survivors: Prevalence, Determinants, and Impact on Health-Related Quality of Life. *Psychooncology* 2013.

(12) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziaepostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of Liver Cancer Progenitors Whose Malignant Progression Depends on Autocrine Il-6 Signaling. *Cell* 2013;155(2): 384-96.

(13) Fujiwara N, Tateishi R, Akahane M, Taguri M, Minami T, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Ohtomo K, Koike K. Changes in Risk of Immediate Adverse Reactions to Iodinated Contrast Media by Repeated Administrations in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* 2013;8(10): e76018.

2. 学会発表

なし

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

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：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

分担研究課題：臨床情報の収集・整理、発癌関連因子の検討

研究要旨：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。本研究では、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を目指して、慢性C型肝炎患者群とHCV関連肝癌患者群の2群間で発癌リスクに関する因子を検討する。

今年度は、C型肝炎患者群（肝癌、肝硬変、慢性肝炎）を合計804検体追加して収集し、その臨床情報の紐付けを行った。全検体の臨床情報が付帯できた時点で、病態進展群（肝癌、肝硬変）と慢性肝炎群を比較したGWASで検出された13か所の候補遺伝子領域を対象として、Replication解析を実施する。

A. 研究目的

肝癌は癌による死亡原因の第4位で、そのうち約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。またC型肝炎に対してはIFN、肝癌にはソラフェニブの有効性が確認されているものの、副作用などで治療を中断せざるを得ない場合も多い。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 (H23-24)
2. テラプレビルを含む3剤併用療法での発癌リスク予測システムの検証 (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

研究協力施設からの検体及び付帯情報の

収集

すでに研究協力体制ができている国内の大学病院等の15施設から、平成24年度も引き続き検体とその検体についての臨床検査データおよび患者の付帯情報収集を行う。検体解析中に新たに付帯情報が必要となった場合はその都度付帯情報の収集を行う。各施設においての検体とデータは、連結可能な匿名化の作業を順守した上で国立国際医療研究センターへ提出させる。

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

国立国際医療研究センターにおいて収集した検体を用いて、慢性C型肝炎患者群とHCV関連肝癌患者群の2群間で発癌リスクに関する因子を検討する。遺伝子型多型解析は、国立国際医療研究センター（研究分担者：溝上雅史）および東京大学大学院（研究分担者：徳永勝士）において分担して実施する。

(倫理面への配慮)

本研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言(平成20年10月修正)を遵守する。かつ、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成25年2月8日全部改正)に則って本研究を実施するものとする。研究遂行者の供与される情報は、個人識別情報を除き供与される。即ち、連結可能匿名化とする。個人情報に関しては、個人情報識別管理者(国府台病院:管理課長、国立国際医療研究センター病院:企画戦略室長)をおき、情報管理には細心の注意を払う。また、患者個人識別情報と検体との対応表は、独立の鍵が掛かる場所に厳重に保管する。さらに、個人情報の管理をパソコンで行う場合には、当該パソコンをネットに連結することなく単独で使用し、独立の鍵の掛かる場所に厳重に保管する。

C. 研究結果

H25年度も継続して、C型肝炎関連肝癌・肝硬変患者、および慢性肝炎患者のサンプル収集(ゲノムDNA、血清)を行った。国内の大学病院等の全13施設から合計603例を追加して収集し、これまでに収集してあった201例と合わせて、合計804例をReplication解析用に収集した。それらに対応する臨床情報の紐付けを進めている。

臨床情報の収集が完了した段階で、HCV関連肝癌・肝硬変患者群と慢性肝炎患者群を比較したGWAS(HCV由来肝発癌133例 vs. 慢性肝炎200例)で検出された13候補遺伝子領域に対するReplication解析を実施する。

D. 考察

肝発癌に関わるホスト因子の同定を実施するためには、患者背景を揃えた解析が重要となる。検体・臨床情報管理システムを用いたサンプル収集・管理体制が整い、詳細な臨床情報に基づくホスト因子の探索が可能となった。

E. 結論

全1,337例の肝発癌、慢性肝炎を含む日本人C型肝炎由来患者サンプル(ゲノムDNA、血清)を用いたGWAS(計333例を使用)およびReplication解析(計804例を使用)により、肝発癌に関連する新たなホスト因子の同定が可能と期待する。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ocho M, Togayachi A, Iio E, Kaji H, Kuno A, Sogabe M, Korenaga M, Gotoh M, Tanaka Y, Ikehara Y, **Mizokami M**, Narimatsu H. Application of a Glycoproteomics-Based Biomarker Development Method: Alteration in Glycan Structure on Colony Stimulating Factor 1 Receptor as a Possible Glycobiomarker Candidate for Evaluation of Liver Cirrhosis. *J Proteome Res.* 2014
- (2) Nagata N, Niikura R, Shimbo T, Kishida Y, Sekine K, Tanaka S, Aoki T, Watanabe K, Akiyama J, Yanase M, Itoh T, **Mizokami M**, Uemura N. Alcohol and smoking affect risk of uncomplicated colonic diverticulosis in Japan. *PLoS One.* 8 (12): e81137, 2013
- (3) Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramane S, Matsui T, Ito K, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, **Mizokami M**. Ex vivo induction of IFN- λ 3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol.* 49 (1): 126-37, 2014
- (4) Kaji H, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Sogabe M, Ohkura T, Nozaki H, Angata T, Chiba Y,

- Ozaki H, Hirabayashi J, Tanaka Y, **Mizokami M**, Ikehara Y, Narimatsu H. Glycoproteomic discovery of serological biomarker candidates for HCV/HBV infection-associated liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res.* 12 (6): 2630-40, 2013
- (5) Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, **Mizokami M**, Takehara T. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 57 (5): 1705-15, 2013
- (6) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, **Mizokami M**. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut* 62 (9): 1340-6, 2013

2. 学会発表

- (1) 西田奈央、徳永勝士、**溝上雅史**、IL28B 遺伝子による C 型肝炎の治療効果予測と、第二の関連遺伝子の探索、第 17 回日本肝臓学会大会、品川、2013
- (2) 西田奈央、田中靖人、杉山真也、馬渡頼子、石井真由美、徳永勝士、**溝上雅史**、C 型慢性肝炎の治療効果に関連する第二遺伝要因の探索、第 49 回日本肝臓学会総会、新宿、2013
- (3) Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Masaya Sugiyama, Yoriko Mawatari, Mayumi Ishii, Chieko Haga, Katsushi Tokunaga, **Masashi Mizokami**, Understanding of IL28B gene associated with treatment response for HCV patients, 61th Annual ASHG Meeting, Boston, 2013

H. 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

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：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）

分担研究課題：発癌関連因子の検討

研究要旨：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。本研究では、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を目指して、慢性 C 型肝炎患者群と HCV 関連肝癌患者群の 2 群間で発癌リスクに関する因子を検討する。今年度は、本研究において継続して収集された C 型肝炎関連肝癌・肝硬変患者、および慢性肝炎患者のサンプルについて、Affymetrix AXIOM ASI 1 Array を用いたゲノムワイド SNP タイピングを実施した。合計 533 検体で遺伝子型決定を行い、DishQC および call rate の平均値は 0.974 および 99.52% となり、精度の高い遺伝子型決定を行う事ができた。今後も国立国際医療研究センターとの協力のもとで、詳細な臨床情報が付帯された検体の収集を進めると共に、詳細な臨床情報や HCV ゲノム情報も含めた解析を進める。

A. 研究目的

肝癌は癌による死亡原因の第 4 位で、そのうち約 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。また C 型肝炎に対しては IFN、肝癌にはソラフェニブの有効性が確認されているものの、副作用などで治療を中断せざるを得ない場合も多い。

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 (H23-24)
2. テラプレビルを含む 3 剤併用療法での

発癌リスク予測システムの検証 (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

研究協力施設からの検体及び付帯情報の収集

すでに研究協力体制ができている国内の大学病院等の 15 施設から、平成 25 年度も引き続き検体とその検体についての臨床検査データおよび患者の付帯情報収集を行う。検体及び付帯情報の収集は、国立国際医療研究センター（研究分担者：溝上雅史）と協力して行い、各施設においての検体とデータは、連結可能な匿名化の作業を順守し

た上で国立国際医療研究センターへ提出させる。

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

収集した検体を用いて、慢性 C 型肝炎患者群と HCV 関連肝癌患者群の 2 群間で発症リスクに関する因子を検討する。遺伝子型多型解析は、国立国際医療研究センター（研究分担者：溝上雅史）および東京大学医科学研究所（研究代表者：松田浩一）と協力して実施する。

（倫理面への配慮）

本研究に関係するすべての研究者はヘルシンキ宣言（平成 20 年 10 月修正）を遵守する。かつ、臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日全部改正）およびヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 25 年 2 月 8 日全部改正）に則って本研究を実施するものとする。研究遂行者の供与される情報は、個人識別情報を除き供与される。即ち、連結可能匿名化とする。また、患者個人識別情報と検体との対応表は、独立の鍵が掛かる場所に厳重に保管する。さらに、個人情報管理をパソコンで行う場合には、当該パソコンをネットに連結することなく単独で使用し、独立の鍵の掛かる場所に厳重に保管する。

C. 研究結果

本研究において継続して収集された C 型肝炎関連肝癌・肝硬変患者、および慢性肝炎患者のサンプルおよび臨床情報を、国立

国際医療研究センターの協力のもと集約的に管理し、慢性 C 型肝炎患者群における発症リスク因子を同定する為に、約 60 万種 SNP を搭載した Affymetrix AXIOM ASI 1 Array を用いたゲノムワイド SNP タイピングを実施した。

ゲノムワイド SNP タイピングは、C 型肝炎関連肝癌・肝硬変患者、および慢性肝炎患者について、研究協力 12 施設から収集した合計 534 検体を対象として実施した。96 検体ごとにデータを取得し遺伝子型決定を行い、DishQC < 0.82 および call rate < 97% を示した検体についてはタイピングデータを再度取得した。その後取得したデータすべてを用いて、Genotypeing Console v4 ソフトウェアによる遺伝子型決定を行った。合計 533 検体で遺伝子型を決定し、DishQC = 0.974、call rate = 99.52% を平均値とする精度の高い遺伝子型決定を行う事ができた。全例の臨床情報が揃ったところで、HCV 由来の肝癌群と慢性肝炎群を対象としたゲノムワイド関連解析(GWAS)を実施することが可能となった。

D. 考察

HCV 関連肝癌患者群と慢性 C 型肝炎患者群を対象とした GWAS を実施し、発症リスク候補因子を絞った後に、replication study による検証が必要となる。そのため今後もより多くの検体収集および臨床情報蓄積が必要とされ、国立国際医療研究センターとの協力のもとで、詳細な臨床情報が付帯された検体の収集を進める。

E. 結論

HCV 関連肝癌のリスク要因を明らかにするために、網羅的なゲノム解析のみならず、詳細な臨床情報や HCV ゲノム情報も含めた解析をする必要がある。またこれまでに蓄積された異なるプラットフォームで取得した GWAS の結果と統合する事で、より多くの検体を用いた、より多数の SNP における検討が可能になる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nishida N, **Tokunaga K**, Mizokami M, Genome-Wide Association Study Reveals Host Genetic Factors for Liver Diseases. Journal of Clinical and Translational Hepatology 1:45-50, 2013
- (2) 西田奈央、**徳永勝士**、溝上雅史、高密度マイクロアレイによるゲノムワイド関連解析 (GWAS) の実際、肝胆膵 67(1) : 7-14、2013

2. 学会発表

- (4) 西田奈央、**徳永勝士**、溝上雅史、IL28B 遺伝子による C 型肝炎の治療効果予測と、第二の関連遺伝子の探索、第 17 回日本肝臓学会大会、品川、2013
- (5) **徳永勝士** : ゲノム・遺伝子解析研究が

もたらす革新 (教育講演) 第 62 回日本医学検査学会、香川、2013.

- (6) **徳永勝士** : 肝炎の診断と治療、(シンポジウム「GWAS 成果と応用」) 第 58 回日本人類遺伝学会大会、仙台、2013.
- (7) 西田奈央, 田中靖人、杉山真也、馬渡頼子、石井真由美、**徳永勝士**、溝上雅史、C 型慢性肝炎の治療効果に関連する第二遺伝要因の探索、第 49 回日本肝臓学会総会、新宿、2013
- (8) Nao Nishida, Yasuhito Tanaka, Masaya Sugiyama, Yoriko Mawatari, Mayumi Ishii, Chieko Haga, **Katsushi Tokunaga**, Masashi Mizokami, Understanding of IL28B gene associated with treatment response for HCV patients, 61th Annual ASHG Meeting, Boston, 2013

H. 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

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：

高橋篤・理化学研究所統合生命医科学研究センター統計解析研究チーム・チームリーダー

分担研究課題：肝癌発症リスク予測システムの統計解析

研究要旨：慢性C型肝炎患者における肝癌発現リスクは、ウイルス因子、血液生化学検査、遺伝子多型や性別、年齢などの表現型が関わっている。これらの情報を元に肝癌の発症を予測するシステムの構築を目指す

A. 研究目的

これまでの研究により、*MICA* の遺伝子多型の違いにより HCV 陽性肝癌の発症リスクが 2 倍異なることがわかっている。さらに、血中 *MICA* の濃度は、*MICA* 遺伝子多型により違いがあり、血中 *MICA* の濃度が肝癌発症リスクのバイオマーカーとなりうる可能性が示唆されている。*MICA* を含む遺伝子多型、血中 *MICA* 濃度、ウイルス因子、性別・年齢などの表現型の情報から HCV 陽性肝癌の発症予測システムの構築を行う。本研究では、予測システムの精度向上に重要な要素である、肝癌発症に関わる新たな遺伝要因を探索する。

B. 研究方法

コピー数多型は、一塩基多型と同じくヒトゲノム上に多く存在する遺伝子多型である。コピー数多型が存在する場合、コピー数多型の領域に存在する一塩基多型を測定したとき、蛍光強度の散布図が通常と異なり、複数のクラスタを示す。この性質を利用して、一塩基多型の実験結果から、コピー数多型の検出が理論的に可能となる。

本研究の遂行にあたり、各医療機関、研究施設において倫理審査委員会の承認を得た上で、実施しており、参加者全員よりインフォームドコンセントを取得している。

また、本研究で用いた症例は、各医療機関で連結可能匿名化済みであり、個人情報は一切含まれていない。さらに、解析はインターネットなどの外部ネットワークに接続されていない計算機上で実施され、情報の安全性を高めている。

C. 研究結果

すでにタイピングされている 50 万ヶ所の一塩基多型の蛍光強度データを用いて、コピー数多型の有無の可能性について、計算機を用いて統計学的に調べた。コピー数多型を検出するためのツールが複数公開されている。本研究では、PennCNV, PlatinumCNV, TriTyper を使用した。各ツールの結果は、ツールごとに異なる結果を示した。そのため、検出された領域の蛍光強度データを目視で確認した。その結果、ある一つのツールが全て正しいというわけではなく、様々な場合が存在した。コピー数多型が存在しても、一塩基多型の蛍光強度のクラスタは完全に分離されず、一部のクラスタ同士が重なるなどが、この現象の理由である。

D. 考察

現時点では、一塩基多型と異なりコピー数多型の検出精度が高くない。そのため、

検出した領域が本当にコピー数多型の領域なのかを実験で確認する必要がある。同時に、検出アルゴリズムの精度の一段の向上が必要である。

E. 結論

予測モデルの精度向上のために、肝癌発症に関連するコピー数多型の探索を行った。コピー数多型の検出精度は、一塩基多型と比べ低い。そのために、関連の有無を結論付けることは難しい。コピー数多型の検出精度の向上、実験によるコピー数多型の存在の再現確認が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 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