

酵素の発現低下も認められた。

D. 考察

Peg-IFN + RBV + TVR三剤療法中、TVRの効果によりコレステロール代謝は大きな影響を受けていた。TVRはHCVのprotease活性を阻害し抗ウイルス効果を持つのみならず、コレステロール合成や脂肪酸合成を阻害することでウイルスが増殖しにくい環境を形成し、更にLDL-receptorの発現を制御することでウイルスの再感染を阻害することで、抗ウイルス効果を増強している可能性が考えられた。またこの反応性の違いが治療効果に大きく影響していることが示唆された。

E. 結論

脂質代謝の制御は、プロテアーゼ阻害剤のみならずその他直接作用型抗ウイルス剤使用時にも治療効果に影響する重要な因子と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Association of ITPA polymorphism with outcomes of peginterferon- α plus ribavirin combination therapy.

Fujino T, Aoyagi Y, Takahashi M, Yada R, Yamamoto N, Ohishi Y, Nishiura A, Kohjima M, Yoshimoto T, Fukuizumi K, Nakashima M, Kato M, Kotoh K, Nakamuta M, Enjoji M.

World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2013;4(3):54-60.

Clinical milestones for the prediction of severe anemia by chronic hepatitis C

patients receiving telaprevir-based triple therapy.

Ogawa E, Furusyo N, Nakamuta M, Kajiwara E, Nomura H, Dohmen K, Takahashi K, Satoh T, Azuma K, Kawano A, Tanabe Y, Kotoh K, Shimoda S, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group.

J Hepatol. 2013 Oct;59(4):667-74.

Telaprevir can be successfully and safely used to treat older patients with genotype 1b chronic hepatitis C.

Furusyo N, Ogawa E, Nakamuta M, Kajiwara E, Nomura H, Dohmen K, Takahashi K, Satoh T, Azuma K, Kawano A, Tanabe Y, Kotoh K, Shimoda S, Hayashi J; Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group.

J Hepatol. 2013 Aug;59(2):205-12.

Add-on therapy of pitavastatin and eicosapentaenoic acid improves outcome of peginterferon plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C.

Kohjima M, Enjoji M, Yoshimoto T, Yada R, Fujino T, Aoyagi Y, Fukushima N, Fukuizumi K, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Nakashima M, Sakamoto N, Tanaka Y, Nakamuta M.

J Med Virol. 2013 Feb;85(2):250-60.

Efficacy of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment on the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C: a prospective, multicenter study.

Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E,
Takahashi K, Nomura H, Maruyama T,
Tanabe Y, Satoh T, Nakamuta M, Kotoh K,
Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi
J; Kyushu University Liver Disease Study
(KULDS) Group.

J Hepatol. 2013 Mar;58(3):495-501.

2. 学会発表

第99回 日本消化器病学会総会 (シンポ
ジウム)

第49回 日本肝臓学会総会 (口演・ポス
ター)

AASLD 2013 (Poster)

H. 知的財産権の出願・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（肝炎等克服緊急対策研究事業）
次世代シーケンシング・ゲノムワイド関連解析を用いた C 型肝炎治療に伴う肝
病態進展軽快、肝発癌に関わる宿主因子の解析（坂本班）

平成 25 年度分担研究報告書

エクソームシーケンシングによる肝癌由来細胞株の鉄代謝関連遺伝子の網
羅的変異解析

鉄負荷マウスにおける肝組織糖・脂質代謝変化に関するトランスクリプトー
ム解析

研究分担者 高後 裕

旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 教授

研究要旨： C 型慢性肝炎では肝の線維化ステージの進展に伴って鉄沈着が進み、肝細胞の酸化ストレスに関与する。また、血清トランスフェリン飽和度の上昇は肝硬変・肝癌の発生率増加に関与していることが疫学調査から明らかになっている。本研究では肝癌細胞株におけるこれら鉄代謝関連分子の変異に関して次世代シーケンサシステム(NGS)を用いた全エクソーム解析で網羅的に解析し、Hep3B 細胞の鉄代謝関連遺伝子 64 種類の一塩基変異 (SNVs) や小さな挿入/欠失 (Indels) を探索した。48 箇所の SNVs を認め (うち 24 箇所の SNVs はアミノ酸置換を伴う)、3 箇所の Indels を認めた。また、慢性肝疾患から肝癌へ進展する過程で、負荷された鉄が糖・脂質代謝関連分子にどのような影響を与えるかという点に着目し、鉄負荷マウス肝臓における糖・脂質代謝のキー分子を同じく NGS を用いたトランスクリプトーム解析で網羅的に探索した。その結果、肝組織における鉄過剰は糖・脂質代謝の異常を誘導し、その代謝産物の影響下で細胞増殖シグナルが促進されることが示唆された。

研究協力者

大竹孝明 旭川医科大学臨床消化器・肝臓学診療連携講座 特任教授
佐々木勝則 旭川医科大学消化管再生修復医学講座 特任准教授
田中宏樹 旭川医科大学消化管再生修復医学 特任助教

《エクソームシーケンシングによる肝癌由来細胞株の鉄代謝関連遺伝子の網羅的変異解析》

A. 研究目的

C 型慢性肝炎では肝の線維化ステージの進展に伴って鉄沈着が進み、肝細胞の酸化ストレスに関与する (Saito H, Hepatol Res, 2005)。また、血清トランスフェリン飽和度の上昇は肝硬変・肝癌の発生率増加に関与していることが疫学調査から明らかになっている (Ioannou GN, Clin Gastroenterol Hepatol, 2007)。

また、遺伝性ヘモクロマトーシス

の原因遺伝子 HFE の発見に始まり、生体内鉄代謝 関連分子の解明が急速に進歩している (図 1)。本研究では肝癌細胞株におけるこれら鉄代謝 関連分子の変異に関して次世代シーケンサシステムを用いた全エクソーム解析で網羅的に解析する。

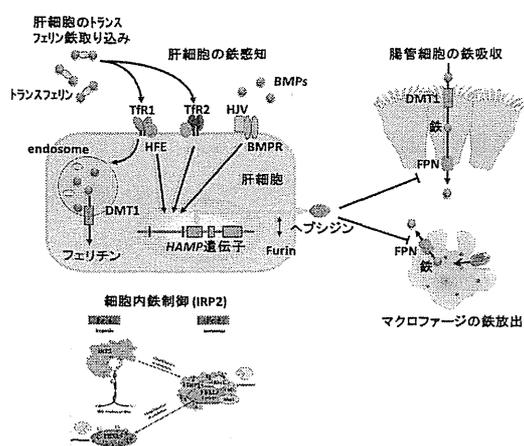


図 1 : 生体内鉄代謝と関連分子

B. 研究方法

肝癌細胞株 Hep3B 細胞からゲノム DNA を抽出し、Ion TargetSeq Exome Kit (Life technologies) を用いて、ゲノム DNA 上の 21,500 以上の蛋白コードするエクソン領域を認識するプローブでキャプチャーし、エクソームライブラリーを作成した。得られたデータは Genomics Workbench (CLC bio) で解析した。リファレンス情報は Hg19 (UCSC human genome 19) および 1000 Genome (A Deep Catalog of Human Genetic Variation、コモンバリエーション情報) を用いた。

解析遺伝子は鉄代謝関連分子：全 64 遺伝子で、鉄取り込み分子：Transferrin (TF), Transferrin

receptor 1 (TFRC), Divalent metal-ion transporter 1: DMT1 (SLC11A2), STEAP3 (STEAP3), SEC15L1 (EXOC6), Dcytb (CYBRD1), Lipocalin (LCN1, 2)、鉄再利用分子：Hemopexin (HPX), Haptoglobin (HP), Heme carrier protein 1 (SCL46A1)、へム鉄放出分子：Heme oxygenase (HMOX1, 2)、鉄放出分子：Ferroportin (SLC40A1)、鉄酸化分子：Ceruloplasmin (CP), Hephaestin (Hp)、へム放出分子：FLVCR (FLVCR1), Abcb6 (ABCG2)、細胞内調節分子：IRP1 (ACO1), IRP2 (IREB2)、鉄代謝調節分子：Hepcidin (HAMP), HFE (HFE), Transferrin receptor 2 (TFR2), Hemojuvelin (HFE2), Bone morphogenetic protein receptor: BMP receptor (BMPRI1, 1B), Neogenin (NEO1)、細胞内鉄貯蔵：Ferritin heavy chain (FTH1), Ferritin light chain (FTL)、その他：Erythropoietin (EPO), Erythropoietin receptor (EPOR), GDF15 (GDF15), Matriptase 2 (TMPRSS6), TWSG1 (TWSG1), HRG-1 (HRG), BMP (BMP2, 4, 6)、ミトコンドリア鉄代謝、電子伝達系、へム合成系、NTBI 取り込み、前駆体変換酵素等である。また、陽性コントロールとして p53 (P53), k-ras (KRAS) を調べた。

C. 研究結果

Hep3B 細胞の鉄代謝関連遺伝子 64 種類の一塩基変異 (SNVs) や小

さな挿入/欠失 (Indels) を探索し、48 箇所の SNVs を認め、うち 24 箇所の SNVs はアミノ酸置換を伴っていた (図 2-1, 2, 3)。アミノ酸置換を伴う SNVs が認められた鉄代謝関連分子は Transferrin (2 か所), Transferrin receptor 1, DMT1, SEC15L1 (2 か所), IRP2 (2 か所), BMPR1A, Matriptase 2, TWSG1, HRG-1 (2 か所), BMP2, ABCB7, coproporphyrinogen oxidase, CACNA1s (2 か所), Furin, PC5 (6 か所)であった。他にアミノ酸置換を伴わない SNVs は 24 か所に認めた。

Gene	Position	Variant	Effect
Transferrin	chr 3
Transferrin receptor 1	chr 12
DMT1	chr 10
SEC15L1	chr 15
IRP2	chr 2
BMPR1A	chr 11
Matriptase 2	chr 10
TWSG1	chr 10
HRG-1	chr 10
BMP2	chr 11
ABCB7	chr 12
coproporphyrinogen oxidase	chr 10
CACNA1s	chr 10
Furin	chr 16
PC5	chr 1

図 2-1 : 鉄代謝関連分子遺伝子変異情報

Gene	Position	Variant	Effect
Transferrin	chr 3
Transferrin receptor 1	chr 12
DMT1	chr 10
SEC15L1	chr 15
IRP2	chr 2
BMPR1A	chr 11
Matriptase 2	chr 10
TWSG1	chr 10
HRG-1	chr 10
BMP2	chr 11
ABCB7	chr 12
coproporphyrinogen oxidase	chr 10
CACNA1s	chr 10
Furin	chr 16
PC5	chr 1

図 2-2 : 鉄代謝関連分子遺伝子変異情報

Gene	Position	Variant	Effect
Transferrin	chr 3
Transferrin receptor 1	chr 12
DMT1	chr 10
SEC15L1	chr 15
IRP2	chr 2
BMPR1A	chr 11
Matriptase 2	chr 10
TWSG1	chr 10
HRG-1	chr 10
BMP2	chr 11
ABCB7	chr 12
coproporphyrinogen oxidase	chr 10
CACNA1s	chr 10
Furin	chr 16
PC5	chr 1

図 2-3 : 鉄代謝関連分子遺伝子変異情報

また、陽性コントロールの p53 のエクソン 8 の Indel 以外に DMT1 のエクソン 13、BMP2 のエクソン 2、Furin のエクソン 16 にフレームシフトを起こす 3 箇所の Indels を認めた (図 3)。図 4 にアミノ酸置換を伴う SNVs と Indels が認められた鉄代謝関連分子の細胞内での役割分布をシエマで示す。

64 genes (TF, TFR, SLC11A2, ...) / Hep3B	
SNVs: 48	missense mutation: 24 (heter: 6, homo: 18) silent mutation: 24 (heter: 1, homo: 23)
Indels: 3	deletion: 3 (heter: 3)

図 3 : Hep3B 細胞の鉄代謝関連分子における SNVs/Indels サマリ

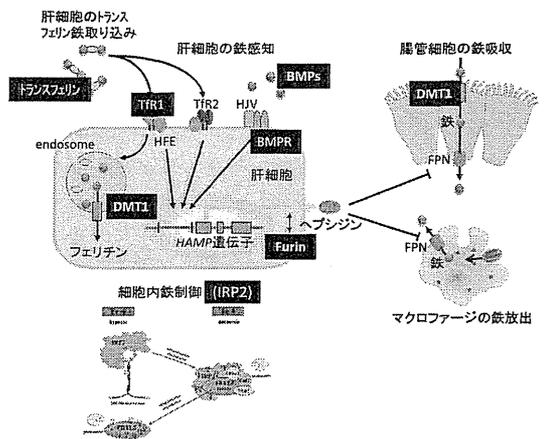


図 4 : 生体内鉄代謝と関連分子

《鉄負荷マウスにおける肝組織糖・脂質代謝変化に関するトランスクリプトーム解析》

A. 研究目的

C型慢性肝炎の肝組織では、線維化進展とともに鉄が蓄積し、肝癌発症に直接・間接的に影響している。これまで、鉄が触媒する Fenton 反応により発生するヒドロキシルラジカルが発癌ドライバー遺伝子の変異を引き起こすことが主な発癌要因とされていた。また、同時に鉄はヘモグロビン鉄としての酸素運搬作用、エネルギー代謝における酵素反応、遺伝子発現調節など生体内において多彩な役割を担っており、発癌への関与はこれらの影響を包括的に考慮する必要がある。発癌ドライバー遺伝子の変異によって増殖因子レセプターを介したシグナル伝達が転写因子を活性化し、増殖関連蛋白質の発現を促進させる経路が明らかになっているが(図5)、エネルギー代謝関連酵素の一部はこれに依存して発現、活性が制御されている。また、シグナル伝達が一方的に代謝関連酵素を調節するのではなく、癌細胞では代謝の異常によって産生された異常代謝産物がこのシグナル伝達に影響することもわかってきた(図6)。しかし、まだ、このような観点からの研究は始まったばかりである。本研究では、負荷された鉄が糖・脂質代謝関連分子にどのような影響を与えるかという点に着目し、鉄負荷マウス肝臓における糖・脂質代謝のキー分子に関して NGS を用いたトランス

クリプトーム解析で網羅的に探索した。

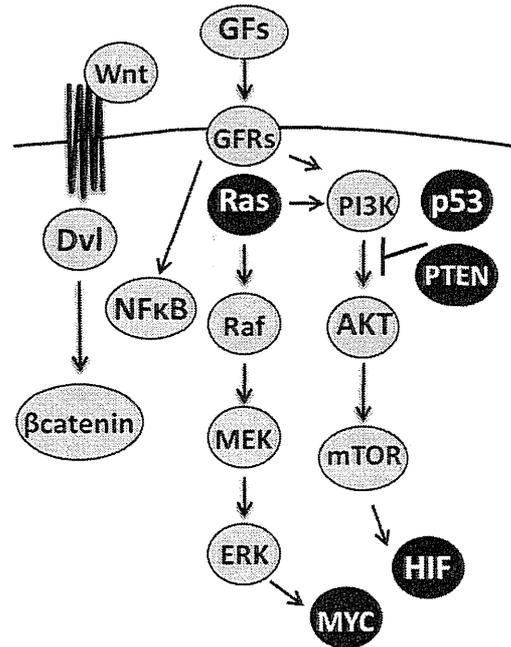


図5：発癌シグナルトランスダクション

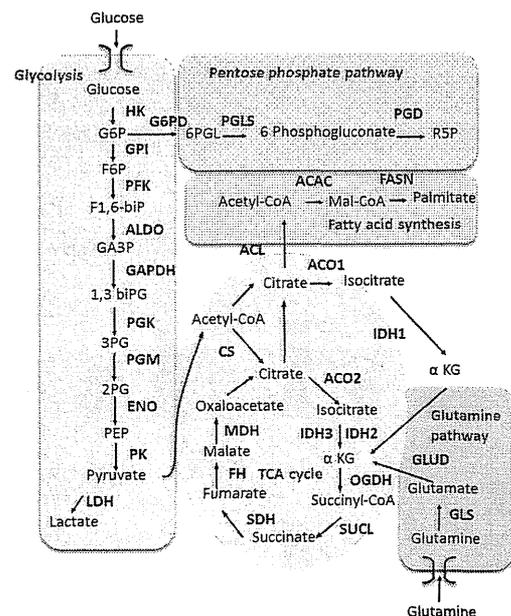


図6：癌細胞の代謝の特徴：癌細胞では低酸素でも解糖系が活性化してエネルギーを産生している。また、解糖系代謝産物からペントースリン酸経路を介して核酸合成、脂肪酸合成、エネルギー源としてグルタミン利用も盛んである。

B. 研究方法

C57BL6J マウスを 2.5%鉄含有食で 8 週間飼育した軽度鉄過剰モデル (Fe diet 群)、10 mg デキストラン鉄を 5 日間腹腔内投与した高度鉄過剰モデル (Fe dex 群) を作成し、それぞれの肝組織から total RNA を抽出した。これらをサンプルとし、高速半導体シーケンサー Ion proton (Life technologies) を用いたトランスクリプトーム解析を行った (各 n=3)。発現量が folds change > 1.5 log または folds change < -1.5 log、かつ p 値 < 0.05 を有意の変化とした。

C. 研究結果

血清鉄マーカーの血清鉄、UIBC、トランスフェリン飽和度、非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) の値は Fe diet 群は軽度の鉄過剰、Fe dex 群では高度の鉄過剰を示唆する結果となった (図 7)。

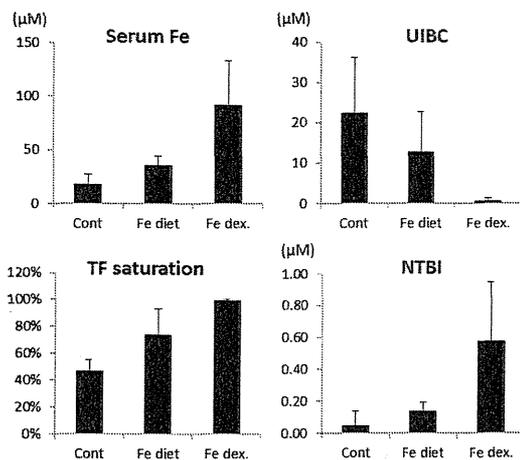


図 7 : 鉄過剰マウスの血清鉄マーカー : トランスフェリン飽和度がコントロール群で 50%、Fe diet 群で 70%、Fe dex 群で 100%であった。

肝組織像は HE 染色では各群に明

らかな差を認めなかったが、鉄染色では、Fe diet 群で肝細胞に淡い鉄沈着、Fe dex 群ではびまん性に高度の鉄沈着を認めた (図 8)。

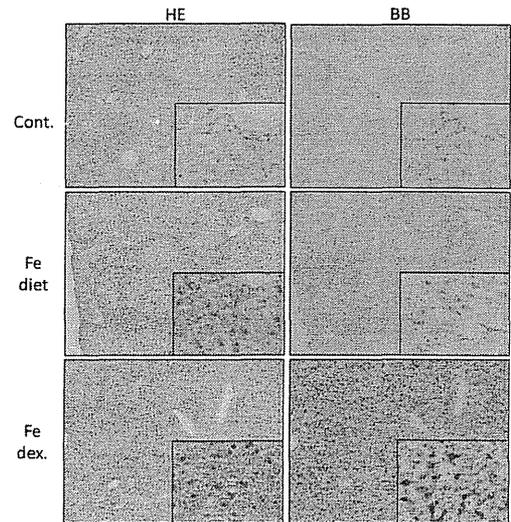
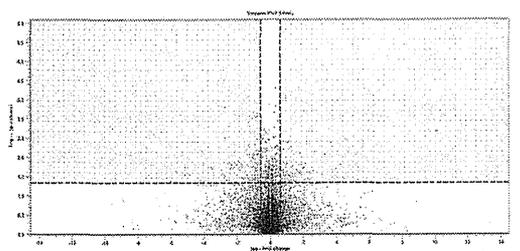


図 8 : 鉄過剰マウスの肝組織像 : HE : HE 染色、BB : ベルリンブルー染色。

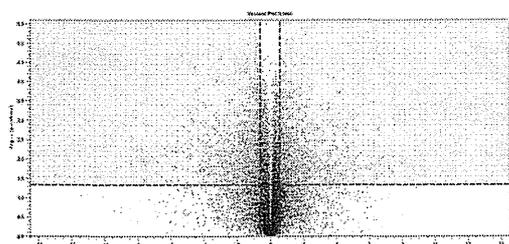
NGS を用いたトランスクリプトーム解析ではコントロール群とマウス軽度鉄過剰モデル群の肝組織の比較では 326 遺伝子、コントロール群とマウス高度鉄過剰モデル群の肝組織比較では 2928 遺伝子の有意な発現変動が検出された (図 9)。

これらのうち細胞内糖・脂質代謝に関連する酵素の発現について注目した。軽度鉄過剰モデル肝組織では正常肝組織と比較しコレステロール合成関連酵素 (Hmgcs1、Lss 等) の発現亢進が認められた (図 10)。高度鉄過剰モデル肝組織では正常肝組織と比較しコレステロール合成関連酵素 (Hmgcs1、Lss 等)、蛋白質プレニル化酵素 (FTase、GGTase 等)、脂肪酸 β 酸化酵素 (Acadm、Acadl 等)、糖代謝関連酵素 (Hk1、Pk 等)

の発現亢進が認められた (図 1 1)。



Cont. (n=3) vs Fe diet (n=3)



Cont. (n=3) vs Fe dex. (n=3)

図 9 : NGS を用いたトランスクリプトーム解析

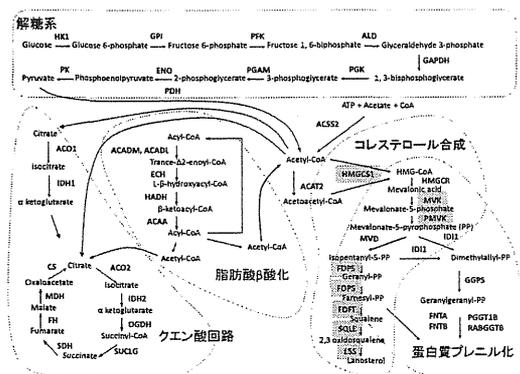


図 1 0 : Dietary iron overload model で発現亢進が認められた分子: コレステロール合成関連酵素の発現亢進が認められた。

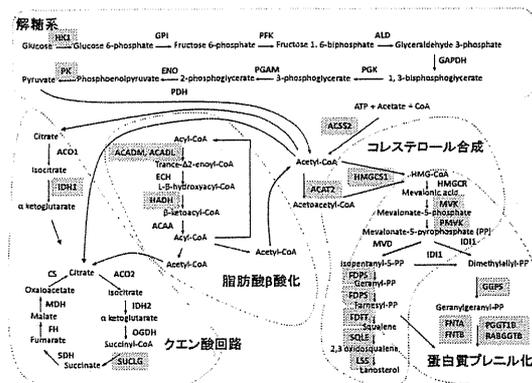


図 1 1 : Iron dextran i.p. model で発現亢進が認められた分子: さらに蛋白質プレニル化酵素、脂肪酸β酸化酵素、糖代謝関連酵素と広範囲に糖・脂質代謝関連酵素の発現亢進が認められた。

D. 考察

鉄代謝異常が発癌に影響している肝癌の細胞株 Hep3B において 64 種類鉄代謝関連分子の中に 48 か所の SNVs を認め、うち 24 か所はアミノ酸置換を伴っていた。さらに 3 か所の Indels を認めた。これらの変異は蛋白質の機能や発現に影響を与える機能欠失/亢進型バリエーションの可能性が示唆された。

癌細胞が酸素の有無に関わらず嫌氣的解糖によりエネルギーを得ていること (Warburg 効果) が発見されて以来、癌と代謝に関する研究が精力的に行われている。発癌ドライバー遺伝子変異によって活性化した細胞内シグナル伝達の影響で解糖系酵素の発現・活性が亢進している。一方、一部の癌で糖代謝に重要な役割を果たすイソクエン酸脱水素酵素 (IDH)、フマル酸ヒドラターゼ (FH)、コハク酸脱水素酵素 (SDH) の遺伝子変異が報告されている (Cairns RA

et al. Nat Rev Cancer 2011)。このような癌細胞では変異型酵素による異常代謝産物が、細胞増殖シグナル伝達を亢進させ発癌を促進している。すなわち細胞内シグナル伝達機構が一方的に細胞内代謝を調節するのではなく、細胞内代謝異常が細胞内シグナル伝達に影響を与えて発癌を促進する機構も重要と考えられる。本研究では慢性肝疾患から肝癌を発症する過程で、負荷された鉄が糖・脂質代謝関連分子にどのような影響を与えるかという点に着目し、そのキーマジンを網羅的に探索した。

マウス軽度鉄過剰モデル肝組織ではコレステロール合成関連酵素の発現亢進が認められ、マウス高度鉄過剰モデル肝組織ではさらに蛋白質プレニル化酵素、脂肪酸β酸化酵素、糖代謝関連酵素とさらに広範囲に糖・脂質代謝関連酵素の発現亢進が認められた。このことは肝組織内では蓄積した鉄量に依存して糖・脂質代謝がダイナミックに変動することを示唆している。また、コレステロール合成の中間産物 Farnesylpyrophosphate はその下流の FTase、GGTase による Ras をはじめとする低分子 G 蛋白質をプレニル化する反応の基質となる。このプレニル化は細胞増殖シグナル伝達の起点となる低分子 G 蛋白質の細胞膜への局在化を促進する重要な反応である。すなわち、鉄過剰により誘導されたコレステロール合成の亢進が、その中間産物を介して Ras 等を恒常的に活性化し、細胞増殖シグナルに

影響を与えていることを示唆している。

E. 結論

- ① Hep3B 細胞の鉄代謝関連分子群の中に 48 箇所の SNVs を認め、うち 24 箇所の SNVs はアミノ酸置換を伴い、3 箇所の Indels を認めた。
- ② これらの変異は蛋白質の機能や発現に影響を与える機能欠失/亢進型バリエーション候補である可能性が示唆された。
- ③ 肝組織における鉄過剰は糖・脂質代謝の異常を誘導し、その代謝産物の影響下で細胞増殖シグナルが促進されることが示唆された。これらのことから肝内鉄過剰を伴う慢性肝疾患から肝癌への進展する過程においては、除鉄治療に加え、糖・脂質代謝異常への治療介入も考慮する必要が考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hasebe T, Sawada K, Nakajima S, Maeda S, Abe M, Suzuki Y, Ohtake T, Hasebe C, Fujiya M, Kohgo Y. Effective control of relapsing disseminated intravascular coagulation in a patient with decompensated liver cirrhosis by recombinant soluble thrombomodulin. Intern Med 53(1): 29-33 2014.

2) Sasaki Y, Shimonaka Y, Ikuta K,

Hosoki T, Sasaki K, Torimoto Y, Kanada H, Moriguchi Y, Kohgo Y. Hcpidin production in response to iron is controlled by monocyte-derived humoral factors. *Int J Hematol* 99(1): 12-20 2014

3) Kawaguchi T, Shiraishi K, Ito T, Suzuki K, Koreeda C, Ohtake T, Iwasa M, Tokumoto Y, Endo R, Kawamura NH, Shiraki M, Habu D, Tsuruta S, Miwa Y, Kawaguchi A, Kakuma T, Sakai H, Kawada N, Hanai T, Takahashi SI, Kato A, Onji M, et al. Branched-chain Amino Acids Prevent Hepatocarcinogenesis and Prolong Survival of Patients With Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* doi:p11: S1542-3565(13) 01312-8 2013

4) Ichiki K, Ikuta K, Addo L, Tanaka H, Sasaki Y, Shimonaka Y, Sasaki K, Ito S, Shindo M, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y. Upregulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon α . *J Gastroenterol Hepatol* 29(2): 387-94 2014

5) Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, Kohgo Y. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Hepato Res* doi: 10.1111/hepr.12199 2013

6) Suzuki Y, Ohtake T, Nishiguchi S, Hashimoto E, Aoyagi Y, Onji M, Kohgo Y; Japan Non-B, Non-C Liver Cirrhosis Study Group. Survey of non-B, non-C liver

cirrhosis in Japan. *Hepato Res* 43(10): 1020-31 2013

7) Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, Saibara T, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anzai K, Fujimoto K, Okanoue T, Nakajima A; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Noninvasive scoring systems in patients with nonalcoholic fatty liver disease with normal alanine aminotransferase levels. *J Gastroenterol* 48(9): 1051-60 2013

8) Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H, Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T. Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 48(4): 515-25 2013

2. 学会発表

1) 海外

1) Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Nakajima S, Abe M, Tanaka H, Kohgo Y. Fatty acids induce the expression of TLRs as the pro-inflammatory state in NAFLD mice liver. The 64th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. November 1-5, 2013, Washington, DC

2) Maeda S, Abe M, Sawada K, Nakajima S, Ohtake T, Saito Y, Torimoto Y, Fujiya M, Kohgo Y. Retrospective analysis of sequential therapy with sorafenib and IVR for advanced hepatocellular carcinoma. FACO 2013, September 26, 2013, Amoy, China

3) Yamamoto M, Tanaka H, Addo L, Ito S, Shindo M, Ikuta K, Sasaki K, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, Kohgo Y. Increased expression of NGF in hepatocytes is an early event in iron overloaded mouse by transcriptome analysis. The 55th annual meeting of American Society of Hematology December 7-10, 2013, New Orleans

2) 国内

1) 大竹孝明、長谷部拓夢、高後裕. 脂肪肝マウスにおける BMP6 発現変化を介した鉄代謝調節異常. 第 99 回日本消化器病学会総会、シンポジウム 4 : 肝疾患における金属代謝研究の進歩 2013 年 3 月 21 日、鹿児島

2) 高後裕. 基調講演 : 鉄・酸化ストレスと ASH, NASH. 第 49 回日本肝臓学会総会、ワークショップ 1 : ASH, NASH の最前線、2013 年 6 月 6 日、東京

3) 澤田康司、前田重明、阿部真美、大竹孝明、高後裕. NAFLD 病態に

おける TLR シグナル異常と腸内フローラの意義. 第 49 回日本肝臓学会総会、ワークショップ 1 : ASH, NASH の最前線、2013 年 6 月 6 日、東京

4) 大竹孝明、澤田康司、高後裕. アルコール性肝障害の肝線維化進展および発癌リスク予測に関する解析. 平成 25 年度アルコール・薬物依存関連学会合同学術総会 (J-ANDAC 2013)、第 48 回日本アルコール・薬物医学会、シンポジウム「アルコール性肝障害の新たな展開 : 新診断基準をふまえて」2013 年 10 月 4 日、岡山コンベンションセンター

5) Sasaki K, Ikuta K, Tanaka H, Ohtake T, Torimoto Y, Fujiya M, Kohgo Y. Splicing abnormality of HAMP transcript by frameshift-causing deletion of SF1 gene. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、横浜

6) 澤田康司、長谷部千登美、前田重明、阿部真美、鈴木康秋、大竹孝明、高後裕. Drug free を目指した B 型慢性肝炎 sequential 療法の HBs 抗原推移に関する検討. JDDW 2013、第 17 回日本肝臓学会大会、2013 年 10 月 9~12 日、東京

7) 大竹孝明、中嶋駿介、前田重明、澤田康司、阿部真美、鈴木康秋、長谷部千登美、高後裕. 選択的バソプレシン V2-受容体拮抗剤トルバプタ

ンが有効であった難治性腹水の 3 例.
JDDW 2013、第 17 回日本肝臓学会
大会、2013 年 10 月 9～12 日、東京

8) 鈴木康秋、大竹孝明、高後裕. 我
が国における ASH/NASH 肝癌の実
態・非 B 非 C 肝硬変の全国集計調査
より-. JDDW 2013、第 17 回日本肝
臓学会大会 ワークショップ 8.
「ASH/NASH 肝癌の臨床像とフォ
ローアップ体制の確立」2013 年 10
月 9～12 日、東京

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

酸化ストレスによる肝発癌に関わるゲノム情報の解析

研究分担者 宮西 浩嗣 札幌医科大学医学部腫瘍・血液内科 講師

研究要旨: C型慢性肝炎では持続慢性炎症によって惹起される発癌の機序は明らかとなっていないが、発癌過程において細胞内で生じた活性酸素（ROS）による酸化的 DNA 傷害が関与する可能性が想定されている。また C 型肝炎の増悪因子として肝細胞に蓄積した鉄の関与が注目され、鉄イオンが Fenton 反応等を介してヒドロキシルラジカル等の ROS の産生を促進し、酸化的 DNA 傷害を増強することが知られている。本研究では、NASH 患者における酸化的 DNA 傷害の程度と肝発癌の関係について検討した。また C 型慢性肝炎を背景とした HCC 患者における酸化的 DNA 傷害の修復系遺伝子群の異常の有無を検討することを目的とした。検討の結果、NASH においては肝 8-OHdG 量が発癌者において有意に増加しており発癌危険因子の一つとなること、C 型慢性肝炎患者において MUTYH 遺伝子の一つの SNP における minor allele 保有が発癌危険因子となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

持続慢性炎症によって惹起される発癌過程には、細胞内で生じた活性酸素(ROS)による酸化的 DNA 傷害が関与する可能性が想定されている。C 型慢性肝炎の炎症増悪因子として肝細胞に蓄積した鉄の関与が注目されている。鉄イオンは Fenton 反応を介して ROS を生成し酸化的 DNA 傷害を引き起こす。これまでに我々は、C 型慢性肝炎および HCC の肝組織中に鉄が過剰に沈着しており、酸化的 DNA 傷害のマーカである 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)が蓄積していることを報告してきた。8-OHdG は C のかわりに A、T とともにペアリングし DNA 変異を惹起することから、肝発癌への関与が推測される。本研究では近年増加の一途をたどる非アルコール性脂肪肝炎(NASH)からの発癌における酸

化的 DNA 傷害の関与ならびに C 型慢性肝炎からの発癌への酸化的 DNA 傷害修復系遺伝子群の関与について検討することを目的とした。

B. 研究方法

NASH 患者の非癌部肝組織と肝癌組織における 8-OHdG 量を免疫染色と KS-400 システムにより定量化し、他の背景因子とともに多変量解析を行うことにより肝発癌への関与を検討した。また C 型肝炎患者の末梢血リンパ球から高分子 DNA を抽出し、酸化的 DNA 損傷修復酵素である MUTYH 遺伝子の全 SNPs 解析を次世代シーケンサー ION PGM により行った。

(倫理面への配慮)

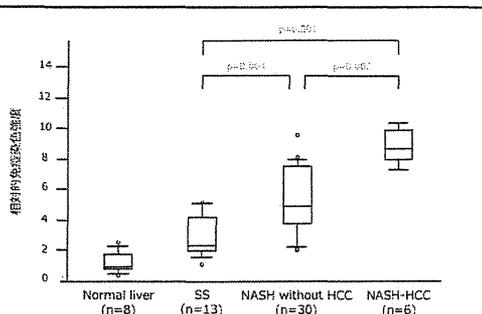
研究に先立って倫理委員会および IRB

委員会の審査・承認を受け、さらに検体採取に際しては患者に対して十分なインフォームドコンセントを書面で得た。

C. 研究結果

(1) 肝 8-OHdG 量は健常人、単純性脂肪肝、未発癌 NASH、発癌 NASH の順に段階的に増加していた。

肝8-OHdG定量 (NAFLD)



(2) C 型慢性肝炎からの肝発癌に関わる酸化 DNA 傷害修復遺伝子の個体差検討するため次世代シーケンサーで解析したところ、MUTYH 遺伝子の SNP は 3 種類同定され、そのうちの 하나가発癌危険因子の候補となった。

D. 考察

NASH を背景とした肝癌が増加しているものの NASH 患者における肝発癌危険因子は明らかとはなっておらず、NASH 患者における肝発癌危険群の囲い込みならびに肝発癌監視が困難であるのが現状であった。本検討では NASH のうち肝細胞癌未発症例と発症例の比較において高齢と肝 8-OHdG 高値が独立した肝発癌危険因子として抽出された。NASH 患者における肝 8-OHdG 量はインスリン抵抗性、鉄過剰、炎症の程度のいずれをも反映しており、各因子を

包括した酸化ストレスマーカーとして肝発癌高危険群の囲い込みに有用である可能性が示唆された。また C 型慢性肝炎 32 例について MUTYH 遺伝子全配列を検索し、肝発癌との関連を検討したところ一種類の SNP の minor allele 保有者が有意に肝発癌に多く見られた。今後この SNP の機能的意義等について検討が必要である。

E. 結論

脂肪性肝炎からの肝発癌予測に肝 8-OHdG 量の定量が有効であることが示唆された。また C 型慢性肝炎からの発癌に酸化 DNA 傷害修復酵素の SNP が関与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

論文発表

1. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. Tanaka S, Miyanishi K, Kobune M, Kawano Y, Hoki T, Kubo T, Hayashi T, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kato J. J Gastroenterol. 2013 Nov;48(11):1249-58

学会発表

1. 宮西浩嗣、田中信悟、加藤淳二. C 型慢性肝炎と非アルコール性脂肪肝炎における鉄代謝異常の発生機序の検討. 第 99 回日本消化器病学会総会 (シンポジウム 4)
2. 田中信悟、宮西浩嗣. アルコール性肝障害および非アルコール性脂肪肝炎から

の発癌における酸化ストレスの関与について
の検討. 第 49 回日本肝臓学会総会
(ワークショップ 1)

3. Koji Miyanishi, Junji Kato. INCREASED
HEPATIC OXIDATIVE DNA DAMAGE
IN PATIENTS WITH NONALCOHOLIC
STEATOHEPATITIS WHO DEVELOP
HEPATOCELLULAR CARCINOMA.
Fifth Meeting of the International BioIron
Society

4. Koji Miyanishi, Junji Kato. Analysis of
abnormal iron metabolism in patients with
nonalcoholic steatohepatitis. AASLD The
liver meeting 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Masato Nakai, Tsukasa Seya, Misako Matsumoto, Kunitada Shimotohno, Naoya Sakamoto, Hussein H Aly	The J6JFH1 strain of hepatitis C virus infects human B cells with low replication efficacy.	Viral Immunology		in press	2014
Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatakaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S	Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor κ B/mitogen-activated protein kinase.	Carcinogenesis	35(2)	272-281	2014
Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, and Moriishi K	Inhibitory Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester Derivatives on Replication of Hepatitis C Virus.	Plos One	8(12)	e82299	2013
Ohnishi S, Maehara O, Nakagawa K, Kameya A, Otaki K, Fujita H, Higashi R, Takagi K, Asaka M, Sakamoto N, Kobayashi M, Takeda H	Hypoxia-inducible Factors Activate CD133 Promoter through ETS Family Transcription Factors.	Plos One	8(6)	e66255	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, <u>Sakamoto N</u> , Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, and Watanabe M.	Wnt5a Signaling Mediates Biliary Differentiation of Fetal Hepatic Stem/Progenitor Cells.	Hepatology	57(6)	2502-2513	2013
<u>Sakamoto N</u> :	NX-PVKA assay, a conventional but refined prognostic biomarker for Hepatocellular carcinoma.	Journal of Gastroenterol and Hepatol	28(5)	755-756	2013
Huang JT, Tseng CP, Liao MH, Lu SC, Yeh WZ, <u>Sakamoto N</u> , Chen CM, Cheng JC:	Hepatitis C virus replication is modulated by the interaction of non-structural protein NS5B and fatty acid synthase.	Journal of Virology	87(9)	4994-5004	2013
Oze T, Hiramatsu N, Mita E, Akuta N, <u>Sakamoto N</u> , Itoh Y, Izumi N, Nomura H, Hayashi N, Takehara T	A multi-center survey of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan.	Hepatology Res	43(1)	35-43	2013
<u>Kurosaki M</u> , Tanaka Y, Nishida N, <u>Sakamoto N</u> , Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N	Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated- interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	J Med Virol	85(3)	449-458	2013
Kohjima M, Enjoji M, Yoshimoto T, Yada R, Fujino T, Aoyagi Y, Fukushima N, Fukuizumi K, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Nakashima M, <u>Sakamoto N</u> , Tanaka Y, Nakamuta M	Add-on therapy of pitavastatin and eicosapentaenoic acid improves outcome of peginterferon plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C.	J Med Virol	85(2)	250-260	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nitta S, <u>Sakamoto N</u> , Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M	Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon- dependent innate immunity	Hepatology	57(1)	46-58	2013
坂本直哉	肝炎ウイルス学 近年の進歩	診断と治療	101(9)	1283-1286	2013
坂本直哉	C型肝炎の近未来治療.	化学療法の領域	28(S-1)	1134-1140	2012
坂本直哉	C型肝炎治療薬 テラプレビル	薬局	63 (1)	123-128	2012
新田沙由梨, 坂本直哉	NCV-NS4B 蛋白と IFN 発現計シグナル分子との分子間相互作用の解析	消化器と免疫	48	174-177	2011
Murata K, <u>Sugiyama M</u> , 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	126-137	2014
Sunbul M, Khan A, Kurbanov F, Leblebicioglu H, <u>Sugiyama M</u> , Tanaka Y, Mizokami M.	Tracing the Spread of Hepatitis C Virus in Turkey: A Phylogenetic Analysis.	Intervirology	56	201-205	2013
Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, <u>Sugiyama M</u> , 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	1705-1715	2013
Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, <u>Sugiyama M</u> , Murakami S, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M.	Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication.	J Viral Hepat.	20	27-36	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, <u>Taketomi A.</u>	RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients.	Pediatr Surg Int.	29(11)	1147-52	2013
Wakayama K, Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Kamachi H, Tsuruga Y, Nakanishi K, Shimamura T, Todo S, <u>Taketomi A.</u>	Surgical management of hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the inferior vena cava or right atrium.	World J Surg Oncol.			2013
Shibasaki S, Takahashi N, Toi H, Tsuda I, Nakamura T, Hase T, Minagawa N, Homma S, Kawamura H, <u>Taketomi A.</u>	Percutaneous transhepatic gallbladder drainage followed by elective laparoscopic cholecystectomy in patients with moderate acute cholecystitis under antithrombotic therapy.	J Hepatobiliary Pancreat Sci.			2013
Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kurogochi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, <u>Taketomi A.</u> , Nishimura S, Todo S.	Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis.	Hepatology.	57(6)	2314-25	2013
Shirabe K, Motomura T, Takeishi K, Morita K, Kayashima H, <u>Taketomi A.</u> , Ikegami T, Soejima Y, Yoshizumi T, Maehara Y.	Human early liver regeneration after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma: special reference to age.	Scand J Surg.	102(2)	101-5	2013
Ijichi H, Shirabe K, <u>Taketomi A.</u> , Yoshizumi T, Ikegami T, Mano Y, Aishima S, Abe K, Honda H, Maehara Y.	Clinical usefulness of (18) F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for patients with primary liver cancer with special reference to rare histological types, hepatocellular carcinoma with sarcomatous change and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma.	Hepatol Res.	43(5)	481-7	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Wakayama K, Tsuruga Y, Kakisaka T, Kamachi H, <u>Taketomi A.</u>	Clinicopathological characteristics and prognostic factors in young patients after hepatectomy for hepatocellular carcinoma.	World J Surg Oncol.			2013
<u>Taketomi A</u> , Shirabe K, Muto J, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Sugio K, Maehara Y.	A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma.	Surg Today.	43(3)	289-92	2013
Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, <u>Taketomi A</u> , Shirabe K, Maehara Y, Oda Y.	Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma.	Pathobiology.	80(3)	146	2013
Aketa H, <u>Tatsumi T</u> , Kohga K, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Nawa T, Shigekawa M, Hikita H, Sakamori R, Hosui A, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T	The combination therapy of α -galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice	Int J Cancer	133(5)	1126-1135	2013
Ishida H, Kato T, Takehana K, <u>Tatsumi T</u> , Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T	Valine, the branched-chain amino acid, suppresses hepatitis C virus RNA replication but promotes infectious particle formation	Biochem Biophys Res Commun	437(1)	127-133	2013
Harada N, Hiramatsu N, Oze T, Yamada R, Kurokawa M, Miyazaki M, Yakushijin T, Miyagi T, <u>Tatsumi T</u> , Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Inoue A, Hayashi N, Takehara T.	Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels categorized by Japanese treatment guidelines.	J Gastroenterol	48(4)	535-543	2013