

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成 25 年度）

全ゲノム配列解析による肝がんリスク因子探索

研究分担者 今西 規 東海大学医学部 教授
研究協力者 中川 草 東海大学医学部 助教
研究協力者 クリュコフ キリル 東海大学医学部 博士研究員

研究要旨

本年度はゲノムワイド関連解析（GWAS）を行うための大規模ヒトゲノム・エキソーム解析のための中型計算機の整備と解析パイプラインの構築を行った。公共のデータベースから多くのヒトゲノム情報や遺伝子多型情報などの収集し、特に近年急速に研究が進む日本人特有の遺伝子多型情報を抽出し、本解析に使用できるように整備した。肝がん発症に関連する先行研究から関連する遺伝子多型を収集し、整備を行った。解析実務者のための研究情報共有システムを構築した。東海大学医学部 医の倫理委員会に本研究を申請し、承認を得た。

A . 研究目的

本研究におけるバイオインフォマティクス解析担当班として、GWAS 解析に必要な大規模計算機解析とソフトウェア整備、さらに大量ゲノム配列データのデータベース構築を行う。特に、次世代シーケンサーによる大量ゲノム配列のマッピング解析、SNV や CNV の特定、各種モデルによる GWAS の遺伝統計学的解析、肝発癌に関わる疾患パスウェイ探索などのデータマイニング解析などを実施する。ここでは、今西らが開発したヒト遺伝子統合データベース H-InvDB を使用し、独自の疾患候補遺伝子の選定解析法を改良し、多数の候補中から疾患原因 SNV を選定するための新しい統計解析法を使用する。

B . 研究方法

HCVのクリアランスにも関わらず、肝がん発症に至った症例群と、肝発癌しなかった対照群のエキソン由来のDNA配列を次世代シーケンサーにより大規模解読する（図 1）。

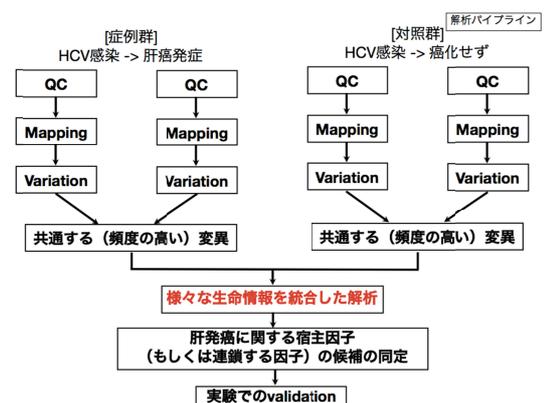


図 1 本研究の解析パイプライン

本研究班では、その結果得られた大規模エキソーム配列を標準ヒトゲノム、もしくは日本人の標準ヒトゲノム（独自に作

成予定)にマッピングし、SNVを同定する。また、日本人特有のSNPを反映した日本人標準ゲノムを作成するなど、SNVの同定精度を高める。

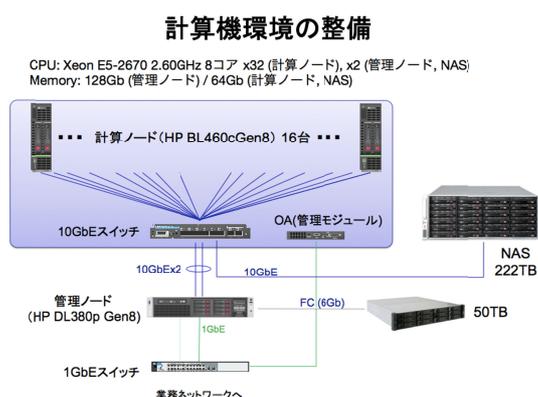
(倫理面への配慮)

各個人情報には研究統括班で二重匿名化され、本研究機関で統合することはできない。加えてエキソーム解析を行うサーバーは外部インターネット接続から遮断して解析を行う予定である。

C. 研究結果

1. 計算機整備・データ解析パイプラインの構築

大規模ヒトゲノム・エキソーム解析のための中型並列計算機の整備と解析パイプラインの構築を行った。具体的には 8 コアをもつ CPU を 32 個、合計 256 コアを並列で使用できる環境を整えた。また、データの解析・保存用に 250TB もの容量を備えたストレージも整備した (図 2)。



そして次世代シーケンス解析における標準的なソフトウェアをインストールし、並列演算が行えるように整備した (図 3)。

ソフトウェア環境の整備

~標準的なNGS解析用のソフトのインストールは完了~

- Beagle 4.1.128 - manual install, jar - java -jar /usr/local/bio/beagle/LATEST/beagle.jar
- Beagle Utilities - manual install (including pseudomarker and cluster2haps, also conform-gt) - java -jar /usr/local/bio/beagle/utilities/vcf2beagle.jar
- BFAST 0.7.0a - manual install, from source - bfast
- BLAST+ 2.2.28 - manual install, binary - blastn -help
- Bowtie 1.0.0 - manual install, binary - bowtie-build, bowtie-inspect, bowtie
- Bowtie 2.2.1 - manual install, binary - bowtie2-build, bowtie2-inspect, bowtie2
- BWA 0.7.5 - manual install, from source - bwa
- FastQC 0.10.1 - manual install, distribution - fastqc --help
- GATK 2.7-4 - manual install, distribution - java -jar /usr/local/bio/gatk/LATEST/GenomeAnalysisTK.jar --help
- LAST 362 - manual install, from source - lastcb, lastal, lastex
- MAFFT 7 - manual install, binary - mafft -version
- Muscle 3.8.31 - manual install, binary - muscle -version
- Picard Tools 1.1105 - manual install, from source - picard tools
- SAM Tools 0.1.19 - manual install, from source - samtools
- SOAPaligner 2.21 - manual install, binary - soap
- TopHat 2.0.10 - manual install, binary - tophat2
- Velvet 1.2.10 - manual install, from source - velvet, velvetg
- VCFtools 0.1.11 - manual install, from source - /usr/local/bio/vcftools_0.1.11/bin

図 3 整備した NGS ソフトウェア

2. 公共データベースからのデータ収集

標準ヒトゲノム (GRCh38 と GRCh37) 1000 Genome Project などのゲノム配列情報に加えて、HapMap、Human gene catalog、dbSNP、JSNP などの多型データを収集した。加えて日本人の多型情報を基に、SNP を置換した日本人標準ゲノムを作成した (図 4)。

日本人標準ゲノムの構築

~1000genomesの89名の日本人ゲノムデータを活用~

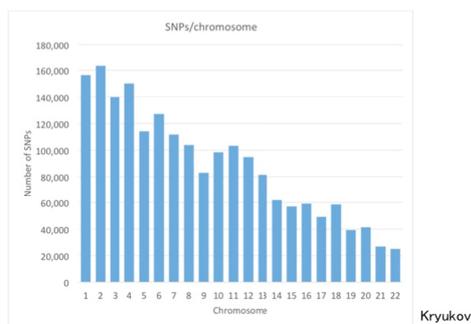


図 4 日本人標準ゲノムの SNP 数

また、われわれは DNA 配列のマルチプルアラインメントのためのソフトウェア開発を行った。本ソフトウェアは、個人ごとのエキソーム配列データの解析に適用可能であり、対立遺伝子の判別や重複遺伝子の識別などの目的に極めて有効と考えている。

3. 解析実務者のための研究情報共有システム

本研究に関係する一般的な情報（個人の遺伝情報などは含まない）を Web 上でまとめ、各研究者で共有できるシステムを構築した（図5）。セキュリティにより登録した ID とパスワードを用いなければ情報を閲覧・修正することはできない。

情報共有サイトの構築

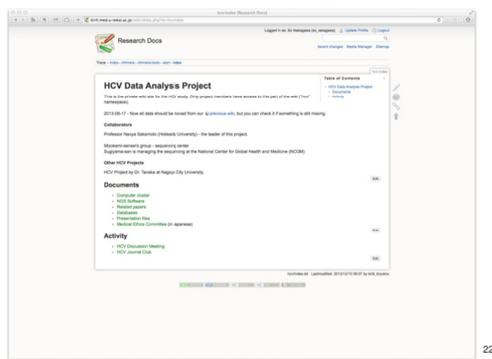


図5 情報共有サイトの構築

4. 倫理委員会

本研究計画について東海大学医学部における「医の倫理委員会」に申請を行い、2013年10月21日付けで承認を得た。これにより、東海大学医学部では匿名化されたゲノム配列データを利用した研究を行う準備が整った。

D . 考察

一般的なエキソーム解析が行える環境整備を整えた。一方で次世代シーケンサー関連の技術革新は著しく、そのソフトウェア群の進歩も非常に早い。そのため、関連する学会やセミナー等に積極的に参加し情報収集に今後も努めるようにして、常に最新技術による解析が行えるように、ソフトウェアやデータベースの更新を続ける。

来年度には国立国際医療研究センターの杉山研究班が次世代シーケンサーを用

いて解読したヒトエキソーム配列を用いて多型解析を行う予定である。

E . 結論

本年度の研究成果により、本研究プロジェクトの目標である HCV による肝がんに関連する宿主因子の同定に向けたデータ解析準備が整った。今後は共同研究者との間でさらに密接な連携を行い、バイオインフォマティクス解析を通して本研究の推進を加速していきたい。

F . 健康危険情報

該当しない。

G . 研究発表

論文発表

無し

学会発表

1. 中川草、今西規、溝上雅史、坂本直哉
C 型肝炎治療に伴う肝病態の進展に関わる宿主因子の解析
NGS 現場の会、神戸、9/4-5、2013
(ポスター発表)
2. Kryukov Kirill
Methods for molecular evolutionary studies in special reference to massive data
日本進化学会、筑波、8/28-31、2013
(口頭発表)

H . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得

無し

2 . 実用新案登録

無し

3 . その他

無し

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成 25 年度）

HCV タンパク質 NS5A の分子動力的手法による構造・機能解析

研究分担者 遠藤俊徳 北海道大学大学院情報科学研究科 教授
研究協力者 山崎和思

研究要旨

C 型肝炎ウイルスの NS5A タンパク質はウイルス増殖に重要な役割を果たしていると考えられており、NS5A はウイルスゲノム複製効率や粒子形成に重大な影響を与えていると考えられているが、その機構は明らかでない。治験中のウイルス増殖阻害薬 Daclatasvir はこのウイルスタンパク質を標的として設計され著効が示されているが、耐性変異出現の問題がある。そこで、NS5A の分子動力的解析を行い、分子の挙動と阻害剤結合部位の予測を行った。

A . 研究目的

C 型肝炎ウイルスの増殖・に重要な役割を果たすウイルスタンパク質 NS5A について、特に阻害剤に対する耐性獲得を中心に分子機能を解明する。

B . 研究方法

実験的手法に比べ、時間・費用の観点から省コストが期待されるコンピュータシミュレーションを用いて、NS5A の分子機構と薬剤耐性獲得機構を分子動力的に解析する。

（倫理面への配慮）

個人情報等を含まない分子データをコンピュータ上で扱うことから、倫理的な問題は生じない。

C . 研究結果

NS5Aは細胞内膜（小胞体膜）結合分子であることが知られており、水溶液中とは挙動が異なる可能性がある。そこで、まず膜結合状態での分子の挙動について、分子動力学シミュレーションを行い、膜結合状態の分子配向と分子フォールディングを確認した。続いてNS5Aに対する阻害剤Daclatasvirの結合部位の推定を行った。NS5Aタンパク質はウイルスゲノム複製酵素NS5Bと結合して、RNA複製補助に機能すると考えられているほか、ウイルス粒子形成にも関与していると考えられている。大きく形の異なる2種類の結晶構造が決定済みで、耐性変異部位付近に阻害剤が結合することが予想されていたが、シミュレーションの結果は阻害剤結合部位はいずれの構造であっても、変異部位

から遠いことを示した。このことは、変異によって阻害剤の結合強度が直接変化するというよりも、アロステリックな構造変化が阻害剤への結合強度が弱めている可能性を示す。

D．考察

NS5A のウイルス複製における役割は解明されていない。本研究では分子動力学シミュレーションによって、NS5A が実際に膜表面を浮遊するような挙動をしていること、阻害剤の耐性変異部位と結合部位が異なるであろうことを見出した。また、結晶解析の結果から NS5A は二種類のフォームを取り得ることが示されていたが、そのいずれの形でも阻害剤結合部位と耐性変異部位は一致しなかった。2 種類の構造が実際に生体内でも取り得る構造であるかどうかははっきりしないが、RNA 複製時に RNA 複製酵素として働く NS5B と結合するときの構造と、多量体として小胞体膜を巻き込みながらウイルス粒子を形成するときの構造とが違っている可能性も残されており、今後、さらなるシミュレーションや実験による解明が必要である。これらの努力によって、耐性変異を回避する薬剤設計への指針を与え得るようになるかもしれない。

E．結論

C 型肝炎ウイルスのタンパク質 NS5A はウイルス複製に必須であり、複製効率にも影響を与えていることが知られているものの、ゲノム RNA 複製に直接関与する分子ではなく、その構造や機能は不明な点が多い。ウイルス阻害剤である Daclatasvir は NS5A を標的として設計された分子だが、実際の作用機序は不明な

点が多く、知られている複数の耐性変異についてもどのような仕組みで耐性が得られるかがわかっていなかった。本解析によって耐性変異部位と薬剤結合部位が異なっていることが示唆され、変異が直接に薬剤結合強度に影響を与えるのではなく、構造変化によって影響している可能性が示唆された。

F．健康危険情報

コンピュータ・シミュレーションによって示された本解析結果は、治験の結果と総合して評価することにより、より信頼性の高い情報として活用され得ると考えている。本結果単独での活用は考えられていない。

G．研究発表

論文発表
なし

学会発表

1. 山崎和思, 須田剛生, 遠藤俊徳, 坂本直哉「C型肝炎ウイルス NS5A タンパクの機能と薬剤耐性獲得メカニズムの解明に向けて」肝炎等克服緊急対策研究事業合同班会議(国立感染症研究所 2015 年 1 月 14-15 日)

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

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成 25 年度）

宿主 DNA の高速シーケンス解析

研究分担者 杉山 真也 国立国際医療研究センター 上級研究員

研究要旨：現在のところ、C 型慢性肝炎由来の肝発癌を予測する有用な因子は見つかっていない。肝発癌を予測できれば、予防策の策定と治療薬の開発に寄与できるだけでなく、肝癌の予防は医療費の大幅な抑制につながる。本研究では、C 型肝癌の予測因子の探索を行うことを目的とする。分担研究内容としては、その原因となるヒト側因子の同定を行うために、次世代シーケンサー（NGS）を用いて、エキソーム解析を中心に肝発癌に関連する変異情報を収集する。本年度では、ヒトゲノム解析に関する倫理申請を行い、承認を得た。エキソーム解析のサンプル調整キットと NGS の組み合わせを検証して、得られるデータの質を検証した。サンプル調整キットとしては、AmpliSeq、SureSelect、SeqCap を使用した。シーケンス装置として Ion Proton と Hiseq、Miseq を利用してデータの取得を進めた。現在、健常サンプルを用いてエキソーム解析の基礎データの取得と比較解析を行っている。データ解析担当者らと得られたシーケンスデータ解析に備えて、データの授受方法やファイル形式、解析手法について打合せた。

A . 研究目的

C 型慢性肝炎は、肝線維化、肝硬変を経て肝癌へと至る。様々な解析が進められてきたが、肝発癌を予測する有用な因子はまだ見つかっていない。肝発癌を予測できれば、その予防策の策定と治療薬の開発に寄与できるだけでなく、肝癌の予防は医療費の大幅な抑制につながる。

そこで、本研究では C 型肝癌の予測因子の探索を行うことを目的とする。分担研究内容としては、その原因となるヒト側因子の同定を行うために、次世代シーケンサー（NGS）を用いて、エキソーム解析を中心に肝発癌に関連する変異情報を収集する。

B . 研究方法

様々なエキソーム解析用キットと NGS が存在しており、良質なデータを得られる組み合わせがどのようなものか不明のままである。そこで、エキソーム解析を進める上で、最適な解析手法を決めるために、既存のエキソーム解析用キットである AmpliSeq、SureSelect、SeqCap を使用してサンプル調製した。また、NGS としては Ion Proton、Hiseq2500、Miseq を使用してデータの取得を行った。サンプルは健常者のゲノムを用いた。これらのサンプルは、イルミナ OmniExpress でタイピング技術による SNP 情報を取得し、これを標準データとした。各サンプル調整キットと NGS データの組み合わせから得られたデータとタイプ

ングデータを比較してデータの精度を検証した。

(倫理面への配慮)

国立国際医療研究センターでヒトゲノム解析に関する倫理申請を行って承認を得た。

C . 研究結果

エキソーム解析用のサンプル調整キットをそれぞれ使用して健常ゲノムを解析した。AmpliSeq のカバーエリアはおよそ 58Mbp であり、SureSelect と SeqCap はおよそ 115Mbp であった。エキソーム解析に対しては、Ion Proton では 1 ランで 2 サンプル、Hiseq2500 では 1 ランで 5 サンプルが算出データとしては適当であると推定された。

AmpliSeq と Ion Proton でのシーケンシング結果では、自験例で 20 倍以上のカバレッジを得られた領域が 96.7%であった。このことから、NGS 解析は順調に行えたと考えられた。一方で、カバレッジが 5 以下となった領域で、それが各サンプルに共通していたのが 5%程度存在していた。それらの領域では変異データを得られないと考えられた。SureSelect と SeqCap によるサンプル取得と NGS 解析については現在実施中である。

D . 考察

各メーカーから出されているデータは、理想的なサンプル条件で行われていることが多く、また、データの詳細部分は知ることが出来ないため自験例での検証が必要となる。今回の実験では、健常者ゲノムを用いて行ったが、AmpliSeq においてはカタログスペックと同等の結果を得

ることが出来た。しかしながら、正確に増幅できていない領域が、各サンプルに共通して認められたために、そのような領域のデータは信頼性が低いと考えられた。

今後も引き続いて、各キットのデータ精度を検証し、最適な実験条件を得られるように条件検討を進める。

E . 結論

AmpliSeq でのエキソーム解析では、一部に増幅が不十分な領域が認められたが、他社キットについても検証を行い、患者サンプルでの大規模解析に備えてデータの精度管理を進める。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

1. 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. 2013 Apr 17.
2. Sunbul M, Khan A, Kurbanov F, Leblebicioglu H, Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M. Tracing the spread of hepatitis C virus in Turkey: a phylogenetic analysis. Intervirology. 2013;56(3):201-5.

3. 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*. 2013 May;57(5):1705-15.
4. Sakamoto T, Tanaka Y, Watanabe T, Iijima S, Kani S, Sugiyama M, 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*. 2013, 20:27-36.
5. Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsunami 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*. 2013 Sep;62(9):1340-6.

学会発表

3. 「B型肝炎ウイルス複製に関連する脂質分子の同定とその効果」杉山真也、田中靖人、溝上雅史 第49回日本肝臓学会総会

シンポジウム 京王プラザホテル 2013年6月7日

国際学会

4. 「Polymorphisms consisting of (TA)_n dinucleotide repeat near IL28B gene could improve the predictive value for HCV spontaneous clearance with IL28B SNPs.」Masaya Sugiyama, Satoshi Hiramine, Norihiro Furusyo, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Masaaki Korenaga, Kazumoto Murata, Naohiko Masaki, Jun Hayashi, and Masashi Mizokami The 64th Annual Meeting of the AASLD P-1426 Nov 4th 2013 Washington DC
5. 「Prediction improvement on the effect of interferon-based therapy and spontaneous clearance of hepatitis C using rs72258881 near IL-28B following rs8099917」Masaya Sugiyama, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi, Hisayoshi Watanabe, Yoshiyuki Ueno, Kazumoto Murata, Masaaki Korenaga, and Masashi Mizokami The International Liver Congress 2013: 48th Annual Meeting of EASL in Amsterdam, P-26th April 2013

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

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成 25 年度）

C 型肝炎を発生母地とする HCC 肝切除後の再発に関わる次世代
シーケンシング・ゲノムワイド関連解析を用いた宿主因子の解析

研究分担者 武富紹信 北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 教授

研究要旨

C 型肝炎を背景とする肝細胞癌は肝切除後に肝内転移のみならず多中心性発生再発が多いという特徴をもっており再発高危険群を割り出すことで予後向上に寄与する治療戦略をたてることが出来る。今回、我々は肝細胞癌切除症例を対象に次世代シーケンシング・ゲノムワイド関連解析（GWAS）を用いた宿主因子の解析を行うことで再発に関わる宿主側遺伝子を明らかにする。

A . 研究目的

C 型肝炎を背景とする肝細胞癌は多中心性発生再発が多いという特徴を持っている。今回、我々は肝細胞癌切除症例を対象に次世代シーケンシング・ゲノムワイド関連解析（GWAS）を用いた宿主因子の解析を行い再発に関わる宿主側遺伝子を明らかにすることで再発高危険群を割り出し、テーラーメイド医療や新規治療への応用を可能にすることを目的とする。

B . 研究方法

2000年1月～2012年12月までの当科におけるC型肝炎を背景とした肝細胞癌切除178例中、DNA抽出可能なサンプルのある113例を対象としてGWAS解析を行い再発に関わる宿主側因子を明らかにする。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、

尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。

る。

C . 研究結果

113 例の DNA 抽出は終えており、これから次世代シーケンシングを用いた GWAS 解析を行う予定である。

D . 考察

従来の臨床の宿主側因子では ICG20% 以上で有意に再発率が高く肝線維化と再発は関連しているものと考えられるため、GWAS 解析においても線維化と関連する遺伝子が候補となる可能性がある。

E . 結論

今後の解析結果が待たれる。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

論文発表

1.Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka 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*. 2014 Feb;35(2):272-81.

2.Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int*. 2013 Nov;29(11):1147-52.

3.Wakayama K, Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Kamachi H, Tsuruga Y, Nakanishi K, Shimamura T, Todo S, Taketomi A. Surgical management of hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the inferior vena cava or right atrium. *World J Surg Oncol*. 2013 Oct 5;11:259.

4.Shibasaki S, Takahashi N, Toi H, Tsuda I, Nakamura T, Hase T, Minagawa N, Homma S, Kawamura H, Taketomi A. Percutaneous transhepatic gallbladder drainage followed by elective laparoscopic cholecystectomy in patients with moderate acute cholecystitis under antithrombotic therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2013 Sep 11.

5.Okada T, Honda S, Miyagi H, Kubota KC, Cho K, Taketomi A. Liver fibrosis in prenatally diagnosed choledochal cysts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013 Aug;57(2)

6.Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kuroguchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, Taketomi A, Nishimura S, Todo S. Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology*. 2013 Jun;57(6):2314-25

7.Shirabe K, Motomura T, Takeishi K, Morita K, Kayashima H, Taketomi A, 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*. 2013 Jun 1;102(2):101-5.

8.Ijichi H, Shirabe K, Taketomi A, 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*. 2013 May;43(5):481-7.

9.Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Wakayama K, Tsuruga Y, Kakisaka T, Kamachi H, Taketomi A. Clinicopathological characteristics and prognostic factors in young patients after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol*. 2013 Mar 2;11:52.

10.Taketomi A, 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*. 2013 Mar;43(3):289-92

11.Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Oda Y. Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Pathobiology*. 2013;80(3):146

学会発表

1.横尾 英樹, 神山 俊哉, 柿坂 達彦, 若山 顕治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信、大腸癌多発肝転移に対する外科切除のタイミング 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013

2.蒲池 浩文, 敦賀 陽介, 若山 顕治, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 神山 俊哉, 武富 紹信、肝門側からの展開困難な血管合併切除を要する左葉系肝門部胆管癌に対する術式の工夫 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013

3.若山 顕治, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 柿坂 達彦, 蒲池 浩文, 敦賀 陽介, 中西 一彰, 嶋村 剛, 藤堂 省, 武富 紹信、下大静脈/右心房腫瘍栓を有する肝細胞癌に対する肝切除 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013

4. 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 若山 顕治, 柿坂 達彦, 横尾 英樹, 神山 俊哉, 武富 紹信、当科における門脈再建法、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013

5. 柿坂 達彦, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 若山 顕治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信、肝細胞癌リンパ節転移症例に対する治療法の検討、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013

6. 川俣 太, 蒲池 浩文, 永生 高広, 西原 広史, 田原 宗徳, 神山 俊哉, 藤堂 省, 武富 紹信、細胞内の局在に着目した肝外胆管癌における Mesothelin 発現の免疫組織学的検討、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013

7. 大畑 多嘉宣、横尾 英樹、柿坂 達彦、敦賀 陽介、蒲池 浩文、神山 俊哉、武富 紹信、肝細胞癌における予後再発因子としての FABP5 の有用性、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013

8. 若山 顕治、神山 俊哉、柿坂 達彦、横尾 英樹、敦賀 陽介、蒲池 浩文、武富 紹信、肝尾状葉腫瘍切除における 3D 画像によるシミュレーションの有用性、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013

9. 蒲池 浩文、敦賀 陽介、若山 顕治、柿坂 達彦、横尾 英樹、山下 健一郎、神山 俊哉、武富 紹信、左葉系切除を要する高度進行胆道癌に対する Transparenchymal glissonian approach を用いた血行再建法、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013

10. 神山 俊哉、柿坂 達彦、横尾 英樹、蒲池 浩文、若山 顕治、敦賀 陽介、三浦 信明、西村 紳一郎、藤堂 省、武富 紹信、血清中糖鎖の網羅的解析による肝細胞癌新規バイオマーカーの開発、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013

11. 大畑多嘉宣、横尾 英樹、柿坂 達彦、若山 顕治、敦賀 陽介、蒲池 浩文、神山 俊哉、武富 紹信、第 24 回日本消化器癌発生学会総会、金沢、9 月 5 日-6 日、2013

12. 皆川のぞみ、崎浜秀康、小林希、小原美都、柴崎晋、若山顕治、柿坂達彦、敦賀 陽介、本間重紀、横尾 英樹、蒲池 浩文、川村秀樹、高橋典彦、神山俊哉、武富 紹信、第 24 回日本消化器癌発生学会総会、金沢、

9 月 5 日-6 日、2013

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成 25 年度）

分担研究課題名 ウィルス感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響

研究分担者 夏井坂光輝 北海道大学病院消化器内科 助教

研究要旨

がん幹細胞の存在が多くの固形癌においても同定され、再発、転移、治療抵抗性に深く関与していることが明らかとなってきた。がん幹細胞を標的とした新たな治療法の開発は、癌研究における最も重要な研究課題の一つである。本研究は C 型肝炎ウイルス感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響を次世代シーケンサーを用いた新たな研究手法により明らかにすることを目的に遂行される。

A . 研究目的

HCV 感染が肝細胞癌の生物学的悪性度に関与している可能性が考えられるが、HCV 感染が癌幹細胞に与える影響は明らかとなっていない。HCV 感染系を用いて、HCV 感染および HCV 駆除が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響を解析し、ウィルス感染を背景とした肝細胞癌におけるがん幹細胞を標的とした新たな治療法を開発することを目的に本研究は遂行される。

B . 研究方法

HCV 感染系、肝細胞癌由来 Huh7 細胞を用いて、HCV 感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響を解析する。次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンシングにより、肝細胞癌がん幹細胞における重要な候補遺伝子を絞込む。候補遺伝子の遺伝子発現に及ぼす HCV 感染の影響を、とくに転写責任領域のメチル化に関して次世代シーケンサーにより解析する。さらに臨床検体を用いたエピゲノム解析を行う。

（倫理面への配慮）

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言（2008 年 10 月修正）」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）」を遵守して実施する。

研究実施に係る試料等を取扱う際は、被

験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し、被験者の秘密保護に十分配慮する。遺伝子解析の結果も同様に個人情報とは分離し保管される。固有の通し番号と個人識別情報の対応表は個人識別情報管理者によって厳重に保管される。研究の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないようにする。

C . 研究結果

肝細胞癌においては CD44⁺/CD133⁺細胞が癌幹細胞の性質を有することを複数の細胞株（Huh7、HepG2）を用いて確認した。次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンシングにより、肝細胞癌がん幹細胞において重要な機能を有する可能性のある候補遺伝子を選定した。候補遺伝子をノックダウンあるいは過剰発現することで、CD44⁺/CD133⁺細胞の割合は変化し、いくつかの遺伝子発現により CD44⁺/CD133⁺細胞が制御されている可能性が示唆された。今後は HCV 感染系（JFH1、J6）を用いて、HCV 感染および駆除が CD44、CD133 陽性細胞に与える影響を解析する。また、臨床検体を用いた解析を開始する。

D . 考察

肝細胞癌においてもがん幹細胞は存在し、ある種の遺伝子発現によりがん幹細胞が制御されている可能性が示唆された。HCV 感

染が候補遺伝子の発現調節に関与している可能性も考えられる。がん幹細胞の制御メカニズムのより詳細な解析が待たれる。

E. 結論

HCV 感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響を解明することで、HCV 陽性肝細胞癌症例に対する新たな治療戦略開発の萌芽となり得る。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka 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 B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2013. (in press).

Natsuizaka M, Kinugasa H, Kagawa S, Whelan KA, Naganuma S, Subramanian H, Chang S, Nakagawa KJ, Rustgi NL, Kita Y, Natsugoe S, Basu D, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Diehl JA, Rustgi AK and Nakagawa H. IGFBP3 promotes esophageal cancer growth by suppressing oxidative stress in hypoxic tumor microenvironment. *Am J Cancer Res*. Jan 15;4(1):29-41. 2014.

2. 学会発表

Natsuizaka M, Kagawa S, Whelan KA, Chang S, Kinugasa H, Ohashi S, Naganuma S, Sakamoto N, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Diehl JA, Herlyn M, Rustgi AK, Nakagawa H. Transforming Growth Factor-beta and Notch1 Cooperate to Repress NOTCH3 to Facilitate Epithelial-Mesenchymal Transition and Tumor Initiating Capability in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Digestive Disease Week and the 114th

annual meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, May 18-21, 2013.

Kagawa S, Nakagawa K, Natsuizaka M, Kinugasa H, Whelan KA, Chang S, Subramanian H, Ohashi S, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Diehl JA, Herlyn M, Nakagawa H, Rustgi AK. Inactivation of the Retinoblastoma Protein-Dependent Senescence Checkpoint Functions Permits Notch1 to Gain Oncogenic Tumor Promoting Activity. Digestive Disease Week and the 114th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, May 18-21, 2013.

Kinugasa H, Natsuizaka M, Kagawa S, Whelan KA, Subramanian H, Chang S, Ohashi S, Naganuma S, Diehl JA, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Herlyn M, Nakagawa H. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Regulates Esophageal Tumor Initiating Capability via a Novel Insulin-Like Growth Factor-Independent Antioxidant Activity. Digestive Disease Week and the 114th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Orlando, May 18-21, 2013.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

C 型慢性肝炎における免疫遺伝子多型と NK 細胞解析

研究分担者 巽 智秀、大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学、助教

研究要旨

C 型慢性肝炎・肝癌の病態形成において自然免疫、特に natural killer (NK) 細胞が重要な役割を担うことが知られている。本年度は、C 型慢性肝炎における NK 細胞に対する免疫調節因子 (Tim-3/Galectin-9, (Gal-9)) の役割を明らかにすることを目的とした。C 型慢性肝炎・肝癌患者の血清 Gal-9 値は健康人に比し有意に高値であり、また Gal-9 は NK 細胞の細胞傷害能・IFN- γ 産生能を抑制することも明らかとなった。Gal-9 は NK 細胞の機能を抑制することで C 型慢性肝炎の病態を形成する一因となっている可能性が示唆された。

A . 研究目的

我が国の C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染患者は約 200 万人存在すると推定され、HCV 感染症の制御・克服は重要な課題である。HCV は持続感染をおこし慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌と進行していく。慢性肝疾患の病態形成にはウイルス側因子に加えて、宿主側の防御応答である自然免疫や獲得免疫などの免疫応答が、重要な役割を担うことが知られている。C 型慢性肝炎において、HCV 感染に対する宿主側の免疫応答として慢性的に内因性 IFN- α が分泌された結果、末梢血中の NK 細胞は細胞傷害活性が増強し、逆にサイトカイン分泌能は低下しており、それぞれが肝細胞傷害やウイルス持続感染に関連していることを示唆する報告がなされている。NK 細胞の活性化は、活性型レセプターと抑制性レセプターとのバランスによって規定されることが明らかとなってきた。C 型慢性肝炎患者の、末梢血 NK 細胞に

おける抑制性レセプターの NKG2A は高発現であり、このことが NK 細胞の活性化を阻害していることが報告された。このように C 型慢性肝炎の病態形成に NK 細胞が一定の役割を果たすことが明らかとなっている。

最近 C 型肝炎から肝癌への進展に対して自然免疫が重要な役割を担うことも、ゲノムワイド関連解析 (genome wide association study: GWAS) による一塩基多型解析から報告された。腫瘍細胞上に発現する MHC class I-related chain A (MICA) の遺伝子多型が C 型肝炎に関連する癌の発生に関連していた。MICA は NK 細胞や CD8 陽性 T 細胞上に発現する活性型レセプターである natural killer group 2, member D (NKG2D) にリガンドであり、免疫細胞による腫瘍監視機構が、肝発癌に重要な役割を果たしていることが示唆される。

近年、Galectin-9 (Gal-9) /T cell Ig and mucin domain 3 (Tim-3) が免疫システム

を調節する免疫細胞として注目されている。C 型慢性肝炎において、Tim-3/Gal-9 が T 細胞に対して抑制的に機能することは、既に報告されているが、NK 細胞に対する役割は、Gal-9 が IFN- γ 産生を促すという報告と、逆に IFN- γ 産生と細胞傷害活性を低下させるとする報告があり、未だ不明である。しかしながら、抗ウイルス免疫応答、肝障害、肝発癌において重要な役割を果たす NK 細胞の制御に、Gal-9 /Tim-3 が NK 細胞の調節を介して C 型慢性肝炎の病態を形成する一因となっている可能性がある。

本研究では、C 型慢性肝炎の病態における Gal-9 /Tim-3 の意義を明らかにすることで、新たな治療戦略の構築を目指すことを目的としている。

B . 研究方法

大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会承認のプロトコルを用いて C 型慢性肝炎患者 (CHC 群)・HCV 陽性 HCC 患者 (HCC 群)・対照群 (Control 群) の血清 Gal-9 値を ELISA 法で測定した。また CHC 群・Control 群の末梢血単核球 (PBMC) を採取し、フローサイトメトリーにて Tim-3 の頻度解析を行った。さらに NK 細胞に対する Gal-9 の与える影響を評価するために recombinant human Gal-9 を添加し NK 細胞の機能評価を行った。(倫理面への配慮)

本研究遂行にあたっては、事前に施設倫理委員会にて実験内容が承認され、C 型慢性肝炎患者及び健康者に文書を用いて説明の上、署名による同意を得た上で、採血し解析を行った。

C . 研究結果

対象は C 型慢性肝炎患者 55 例、C 型肝炎患者 28 例、対照群 41 例である。各群年齢はそれぞれ 63 ± 11 歳、 73 ± 7 歳、 66 ± 8 歳であった。血清 Gal-9 値は C 型慢性肝炎患者で 175 ± 190 (pg/ml)、C 型肝炎患者で 182 ± 204 (pg/ml)、対照群で 19.5 ± 66 (pg/ml) であり、C 型慢性肝炎患者・C 型肝炎患者群で有意に高値であった (図 1)。C 型慢性肝炎患者・C 型肝炎患者内での検討では AST・ALT 値の異常値群において血清 Gal-9 値は高値であり、肝障害との関連が示唆された。

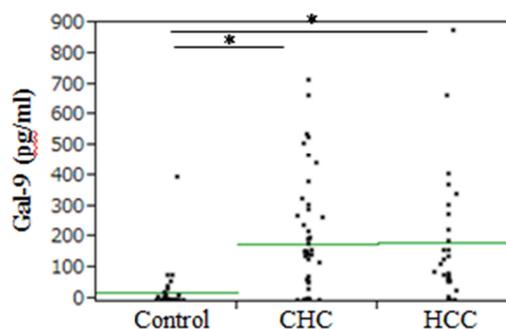


図 1 各群での血清 Gal-9 値

次に C 型慢性肝炎患者・対照群の NK 細胞上の Tim-3 の頻度解析を行ったところ、C 型慢性肝炎患者で 87 ± 9.1 (%), 対照群で 88 ± 7.4 (%) であり、両群間に有意差はなかった (図 2)。

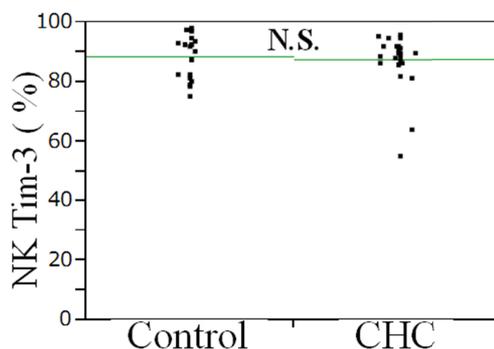


図 2 NK 細胞上の Tim-3 発現頻度

NK 細胞に対する Gal-9 の与える影響を調べるために、Gal-9 の添加実験を行った。NK 細胞はヒト末梢血より PBMC を採取、MACS にて単離したのち、24 時間のインターロイキン (IL) 刺激を加えたものを使用した。K562 細胞に対する細胞傷害活性と IFN- γ 産生能をフローサイトメトリーにて評価した。いずれも Gal-9 用量依存的に有意に低下することが明らかとなった (図 3)。

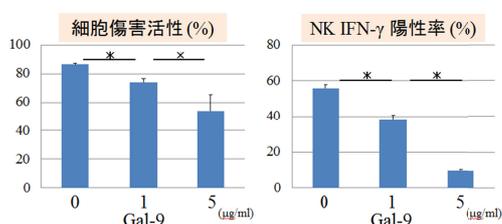


図 3 Gal-9 の NK 細胞傷害活性・IFN- γ 産生能に与える影響

さらに HCV 感染下における Gal-9 の NK 細胞に与える影響を評価するため、HCV 感染細胞である JFH1/Huh7.5.1 細胞と PBMC を共培養し、NK の細胞傷害活性を評価した。

共培養時の上清中の Gal-9 値は JFH1 と PBMC を共培養した時において有意に高値であり、その際の NK の細胞傷害活性は、有意に低下していた。以上より Gal-9 は NK の細胞傷害活性を抑制することが明らかとなった。

D . 考察

C 型慢性肝炎患者・C 型肝癌患者において血清 Gal-9 値は対照群に比し有意に高値であった。Gal-9 は NK 細胞の細胞傷害能・IFN- γ 産生能の両方を抑制することで持続感染に寄与するものと推察された。また NK 細胞の細胞傷害活性による腫瘍監

視機構は、肝発癌の制御に重要な役割を果たしていると考えられており、Gal-9 は NK 細胞による免疫監視機構から逃避させ、肝癌の発生や進展に寄与することが示唆された。Gal-9 の産生源及び発現を調節している因子については今後の検討が必要である。

E . 結論

C 型慢性肝炎において Gal-9 は、NK 細胞の機能を抑制することで C 型慢性肝炎の病態を形成する一因となっている可能性が示唆された。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

論文発表

- Aketa H, Tatsumi T, 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: 1126-1135, 2013
- Ishida H, Kato T, Takehana K, Tatsumi T, 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*

8. **Commun** 19: 127-33, 2013
9. Harada N, Hiramatsu N, Oze T, Yamada R, Kurokawa M, Miyazaki M, Yakushijin T, Miyagi T, Tatsumi T, 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 Gastroenterology** 48: 535-543, 2013

学会発表

6. 本年は本研究に基づく学会発表なし

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

厚生労働省研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究者報告書(平成 25 年度)

C 型慢性肝炎の病態進展に対する MICA、DEPDC5、IL28B 遺伝子多型の
意義の検討

分担研究者:前川 伸哉 山梨大学医学部第一内科 講師

研究要旨:近年 GWAS 解析等により C 型慢性肝疾患進展に関連する幾つかの SNP が報告されているが、必ずしも臨床的意義が確立された肝疾患進展に有用なマーカーとはいえない。本研究では MICA、DEPDC5、IL28、PNPLA3 の 4SNP に注目し、C 型慢性肝炎における肝線維化・肝発癌の関連を明らかにすることを目的とし、C 型慢性肝疾患 298 症例に対して、末梢血白血球より MICA(rs2596542)、DEPDC5(rs1012068)、IL28B(rs8099917)、PNPLA3(rs738409)の 4SNP について SNP タイピングを行い、ファイブロスキャンを用いた肝硬度値を含む臨床因子との関連を検討した。

その結果、C 型慢性肝炎において、MICA は、肝線維化と独立して肝発癌に関連し、DEPDC5 は高齢者における肝発癌リスク上昇と関連した。一方、PNPLA3、IL28B は直接肝癌との関連を認めないものの、肝癌に至る病態を修飾することが考えられた。肝癌への関与は SNP 個々には高くはないが、これらを組み合わせることによって、肝発癌のより高リスクな集団を同定しうる可能性が考えられ、臨床的な有用性が示唆された。

研究協力者:前川 伸哉 山梨大学医学部第一内科 講師

A. 研究目的

近年 GWAS 解析等により C 型慢性肝疾患進展に関連する幾つかの SNP が報告されているが、十分な追試がされていないこと、また SNP の有用な C 型慢性肝疾患のサブグループの特徴などについても明らかとなっていないことから、必ずしも臨床的意義が確立された肝疾患進展に有用なマーカーとはいえない。

すなわち本邦の C 型肝発癌と関連すると報告されている MICA(odds 1.39)、DEPDC5(odds 1.75)、また肝脂肪化・線維化との関連も示唆されている IL28B SNP、NASH と関連する PNPLA3 に本研究では注

目し、MICA、DEPDC5、IL28、PNPLA3 の 4SNP と C 型慢性肝炎における肝線維化・肝発癌の関連を明らかにすることを目的として検討を行った。

B. 研究方法

C 型慢性肝疾患 298 症例に対して、末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出し、MICA(rs2596542)、DEPDC5(rs1012068)、IL28B(rs8099917)、PNPLA3(rs738409)の 4SNP について realtime-PCR を用いて SNP タイピングを行い、ファイブロスキャンを用いた肝硬度値を含む臨床因子との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は山梨大学における倫理委員会の承認(遺伝子研究)を得ており、対象者全員から文書による同意を得たうえで行われた。

C. 研究結果

MICA リスクアレル(A)は既知の肝癌リスクとは独立したHCC関連因子(Odd Ratio 1.9, $p=0.02$)であり、DEPDC5 リスクアレル(G)は65歳以上の高齢者においてHCCと関連した(OR2.8, $p=0.01$)。一方、IL28B リスクアレル(G)は肝線維化あるいは肝癌と直接の関連は認めず、PNPLA3 リスクアレル(G)は肝発癌との関連を認めなかったものの、肝線維化と有意に関連した($p=0.03$)。

D. 考察

C型慢性肝炎において、MICAは、肝線維化と独立して肝発癌に関連し、またDEPDC5は高齢者の肝発癌リスクを上昇させた。一方、PNPLA3、IL28Bは直接肝癌との関連を認めないものの、肝癌に至る病態を修飾することが考えられた。

E. 結論

MICA、DEPDC5、IL28、PNPLA3の4SNPは直接的に、あるいは間接的にそれぞれ肝発癌に関与していた。一方、肝癌への関与はSNP個々には高くはないが、これらを組み合わせることによって、肝発癌のより高リスクな集団を同定しうる可能性が考えられ、臨床的な有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

I. 論文発表

1. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res.* 2014 Feb 14. [Epub ahead of print]
2. 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, Moriishi K. Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLoS One.* 2013 Dec 17;8(12):e82299.
3. Maekawa S, Enomoto N. Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for chronic hepatitis C.

- J Gastroenterol. 2014
Jan;49(1):163-4.
4. Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.
Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression.
J Virol. 2013 Dec;87(23):12541-51.
5. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.
IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication.
J Viral Hepat. 2013
Apr;20(4):281-9.
6. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, 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. 2013
Mar;85(3):449-58.
7. Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.
Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. Hepatol Res. 2013
Aug;43(8):865-75.
11. 学会発表
1. 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸 第 17 回 肝臓学会大会(2013) ワークショップ 3 C 型慢性肝炎の病態進展に対する MICA、DEPDC5 遺伝子多型の意義の検討 2013.10.9 於東京
2. 前川伸哉、三浦美香、辰巳明久、小松信俊、佐藤光明、進藤邦明、雨宮史武、中山康弘、井上泰輔、坂本穰、榎本信幸 第 49 回肝臓学会総会 ワークショップ 3 C 型慢性肝炎の病態進展に対する MICA、DEPDC5、IL28B 遺伝子多型の意義の検討 2013.6.6 於東京
- 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。

次世代シーケンサーを用いた肝細胞癌の病態に関連する遺伝子変異の解析

研究分担者名 朝比奈靖浩 東京医科歯科大学 肝臓病態制御学 教授

研究要旨

【目的】本研究では肝細胞癌の病態と関連する遺伝子を解明する

【方法】2001年以降に肝細胞癌に対して手術を行い、臨床的背景因子、無再発生存期間、生存期間等の各種臨床データが明らかである50例を対象とし、半導体シーケンスを用いて低頻度に存在する遺伝子変異も含めて網羅的検索を行った。

【結果】検出された Hotspot 変異は49検体中210個14遺伝子であった。そのうち肝臓の非腫瘍部に認められなかった変異が34検体中42個、8遺伝子あり、CTNNB1変異19例(38%)、TP53変異16例(32%)、PTEN変異1例(2%)、HRAS変異1例(2%)、CDKN2A変異1例(2%)、IDH1変異1例(2%)、PIK3CA変異1例(2%)、STK11変異1例(2%)で認められた。CTNNB1変異を認めた症例の無再発生存期間は中央値295日、Log-rank検定 $p=0.51$ 、TP53変異を認めた症例の無再発期間は中央値600日、Log-rank検定 $p=0.47$ で有意差は認められなかったが、今回4例(8%)でCTNNB1変異とTP53変異を同時に認め、無再発生存期間が中央値195日、Log-rank検定 $p=0.06$ と短い傾向であった。

【考察】肝細胞癌の70%がCTNNB1変異またはTP53変異を認めたが、同時変異は予後不良と関連している可能性が示唆された。

A . 研究目的

肝細胞癌は慢性肝炎、肝硬変を背景として発生し、他の固形癌と同様に癌の進行に伴って遺伝子異常が蓄積すると考えられているが、治療反応性、再発の有無、生命予後など臨床病態と密接に関連する遺伝子異常は明らかになっていない。本研究では肝細胞癌の病態と関連する遺伝子を解明する目的で、臨床肝癌検体から半導体シーケンサーを用いて低頻度に存在する遺伝子変異も含めて網羅的検索を行った。

B . 研究方法

2001年以降に肝細胞癌に対して手術を行い、臨床的背景因子、無再発生存期間、生存期間等の各種臨床データが明らかである50例を対象とした。年齢中央値=69歳、男/女=40/10例、HBV/HCV/NBNC=10/27/13例、腫瘍径中央値=4.1cm、Child-Pugh grade A/B=44/6例、高分化/中分化/低分化=5/31/13例、再発あり=43例、無再発生存期間=634 ± 643/405日、生存期間=1336 ± 703/1397日。腫瘍部および肝臓の非腫瘍部をペアと

した DNA サンプルから癌関連 50 遺伝子の 2790 箇所の Hotspot をターゲットとして Ion AmpliSeq Cancer Panel Kit v2 を用い Library を増幅、Template 作成後、Ion PGM Sequencer を用いて deep sequence を行った。データ解析は Torrent Suite v2.2 を用い標準ヒトゲノム hg19 をリファレンス配列とし、これらへのマッピングおよび SNP 検出を行った。

C . 研究結果

腫瘍部は平均 2024 リードが得られ、2790 の Hotspot 変異のうち 100 カバレッジ以上得られたのは平均 99.1%であった。検出された Hotspot 変異は 49 検体中 210 個 14 遺伝子であった。そのうち肝臓の非腫瘍部に認められなかった変異が 34 検体中 42 個、8 遺伝子あり、CTNNB1 変異 19 例(38%)、TP53 変異 16 例(32%)、PTEN 変異 1 例(2%)、HRAS 変異 1 例(2%)、CDKN2A 変異 1 例(2%)、IDH1 変異 1 例(2%)、PIK3CA 変異 1 例(2%)、STK11 変異 1 例(2%)で認められた。これらの遺伝子変異と臨床的背景因子として年齢、男女比、HBV 感染、HCV 感染、アルコール摂取、腫瘍径、脈管侵襲、病理学的分化度、背景肝、AFP 値に有意差は認められなかった。CTNNB1 変異を認めた症例の無再発生存期間は中央値 295 日、Log-rank 検定 $p=0.51$ 、TP53 変異を認めた症例の無再発生存期間は中央値 600 日、Log-rank 検定 $p=0.47$ で有意差は認められなかったが、今回 4 例(8%)で CTNNB1 変異と TP53 変異を同時に認め、無再発生存期間が中央値 195 日、Log-rank 検定 $p=0.06$ と短い傾向であった。

D . 考察

肝切除組織から抽出した DNA を半導体シーケンスにて解析することにより、十分なカバレッジで低頻度の癌関連遺伝子変異を網羅的に検出することが可能であった。これまで CTNNB1 変異と TP53 変異の同時変異は極めて稀と報告されているが、今回の結果から同時変異が予後不良と関連している可能性が示唆された。

E . 結論

肝細胞癌の 70%が CTNNB1 変異または TP53 変異を認めたが、同時変異は予後不良と関連している可能性が示唆された。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Yutaka Yasui, Atsushi Kudo, Masayuki Kurosaki, Shuya Matsuda, Masaru Muraoka, Nobuharu Tamaki, Shoko Suzuki, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Kotaro Matsunaga, Hiroyuki Nakanishi, Kaoru Tsuchiya, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Shinji Tanaka, Yasuhiro Asahina, Nobuyuki Enomoto, Shigeki Arii, Namiki Izumi. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: A propensity score matching study. *Oncology* 86:53-62,2014.
2. Kaoru Tsuchiya, Yasuhiro Asahina, Nobuharu Tamaki, Yutaka Yasui, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura, Masayuki Kurosaki, Nobuyuki Enomoto, Namiki Izumi. Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful

- radiofrequency ablation in patients with early stage hepatocellular carcinoma. *Liver Transplant* 2013 in press.
3. Nobuharu Tamaki, Masayuki Kurosaki, Shuya Matsuda, Masaru Muraoka, Yutaka Yasui, Shoko Suzuki, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Kaoru Tsuchiya, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi. Non-invasive prediction of hepatocellular carcinoma development using serum fibrosis marker in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2013 in press.
 4. Sato A, Sata M, Ikeda K, Kumada T, Izumi N, Asahina Y, Osaki Y, Chayama K, Kaneko S, Sakai A, Onji M, Hiasa Y, Omura T, Ozeki I, Yokosuka O, Shiina S, Itsubo M, Nishiguchi S, Hirano K, Ide T, Sakisaka S, Yamasaki T, Hidaka I, Tanaka M, Kim SR, Ichida T. Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan. *Internal Medicine* 52: 2701-2706, 2013.
 5. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 58:1253-1262, 2013
doi: 10.1002/hep.26442.
 6. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. Genetic variation near interleukin 28B and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013 Jul 17.
 7. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. *Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection. Hepatol Res* 2013; 43: 1-34.
 8. Tsuchiya K*, Asahina Y*, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N.* These authors contributed equally to this study. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 120:229-237,2014.
 9. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Moriwaki H, Adachi H, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H. Inhibition of hepatocellular carcinoma by

- PegIFN α 2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multicenter cooperative study. *J Gastroenterol* 48: 382-390, 2013.
10. Nitta S, Sakamoto N, 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: 46-58, 2013.
 11. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M. Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. *Hepatology* 57: 2502-2513, 2013.
 12. Toyota J, Ozeki I, Karino Y, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H. Virological response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. *J Viral Hepat* 20: 167-173, 2013.
 13. Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N. Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 20: 72-76, 2013.
 14. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, 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: 449-458, 2013.
 15. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, Izumi N. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: Evaluation by near-infrared spectroscopy. *Hepato Res* 2013 Apr 5. doi: 10.1111/hepr.12127.
 16. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y, Izumi N. Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepato Res* 2013 Jun 6. doi: 10.1111/hepr.12179.
 17. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee

for Hepatitis Management Guidelines. JSH Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection: A 2014 Update for Genotype 1. *Hepatol Res* 2014; 44: S59–S70.

18. Asahina Y, Hayashi N, Hiramatsu N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Kurosaki M, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tanaka E, Tanaka Y, Tsubouchi H : editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis B Virus Infection. *Hepatol Res* 2014; 44: S1–S58.

2 . 学会発表

1. Tsuchiya K, Yasui Y, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Monitoring of plasma vascular endothelial growth factor after sorafenib administration as predictor of survival in advanced hepatocellular carcinoma. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.
2. Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.
3. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto Wk, Yuen MF, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Mawatari Y, Kawashina M, Tokunaga K, Mizokami M. Trans-ethnic analysis of HLA-DPA1, DOB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.
4. Asahina Y, Nakagawa M, Taniguchi M, Kawai F, Fujiki J, Otani T, Yamanaka H, Murakawa M, Nitta S, Kitazume A, Watanabe T, Sakurai Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Serum interleukin-6 levels during treatment correlate with resistance to telaprevir-based triple therapy in chronic hepatitis C. The 48th annual meeting of the European association for the study or the liver (EASL The International Liver Congress 2013), Amsterdam, Netherlands, April 24-28, 2013.
5. Azuma S, Asahina Y, Sakurai Y, Ootani H, Yamanaka H, Kawai F, Fujiki J, Nitta S, Kitazume A, Murakawa M, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M. Comparison between Gd-EOB-DTPA MRI and CTHA/CTAP for detection of hypervascular hepatocellular carcinoma: efficacy of diffusion weighing image and hepatobiliary phase. APASL Liver Week 2013

(Annual Meeting of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver), Singapore, June 2013.

6. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN-4 are closely associated with a non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C patients. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.

H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題「Yamagata Study(住民検診基盤でのコホート研究)を用いた
病変進展・肝発癌の分子機構の解析」

研究分担者 上野 義之（山形大学医学部消化器内科 教授）
研究協力者 渡辺 久剛、西瀬 雄子（山形大学医学部消化器内科）

研究要旨

HCV 排除後の肝組織進展と発癌のハイリスク群の特定に向けた基礎資料を得るために、住民コホートにおける HCV 抗体陽性率と陽性者の特徴を把握し、5 年間の追跡調査によるコホートの肝発癌と予後の状況を検討した。また肝線維化マーカーとして AST/ALT 比および Fibrosis probability index を用いて HCV 抗体判定別に初回調査と追跡調査の推移を比較検討した。本コホートの 40 歳以上 3511 名の HCV 抗体陽性率は 1.7%であり、強陽性 0.9%（32 名）、弱陽性 0.8%（27 名）であった。HCV 抗体強陽性者名から 2 人の原発性肝癌の発生を認めしたが、弱陽性者と陰性者からは発生を認めなかった。肝線維化マーカーの推移を検討した結果、HCV 抗体弱陽性者では陰性者と同様の推移を示したのに対し、強陽性者では弱陽性者および陰性者と異なった推移を示した。

A . 研究目的

C 型肝炎ウイルス（HCV）感染による肝組織進展および発癌には様々な危険因子が関与していることが明らかになっているが、来たる HCV 全例治癒の時代に備え、HCV 排除後の肝組織進展、発癌のハイリスク群の特定が必要と考えられている。平成 25 年度の分担研究では、日本人地域住民コホートにおける HCV 感染の現状およびコホートの発癌状況について把握し、HCV 非感染コントロールとしての基礎的なデータを得るために以下の項目について検討した。

- 1) HCV 抗体陽性率と陽性者の特徴、および発癌状況と生命予後を把握する。
- 2) HCV 患者の線維化マーカーである AST と ALT の比（AST to ALT ratio; AAR）および

Fibrosis probability index (FPI) の推移を HCV 抗体陽性者と陰性者で比較検討する。

B . 研究方法

山形大学「地域特性を生かした分子疫学研究」(Takahata Study) のデータベースを利用し、初回調査（H16～H18）で HCV 抗体測定を行った 3511 名を分析対象とした。さらに 5 年後の追跡調査（H21, H23）を受診した対象者を縦断研究の分析対象とした。

HCV 抗体は第 3 世代抗体(ラテックス凝集法)を用い、陰性(Unit <1.0)、弱陽性(Unit 1.0～6.6)、陽性(Unit ≥6.7)と判定した。

データはいずれも匿名化された形で解析に用いられた。

<検討 1> 山形県地域がん登録との照合により得られた平成 20 年 12 月までの発癌状況と、住民基本台帳および死亡個票との照合により得られた予後調査のデータを分析に用いた。癌および死因の分類には国際疾病分類第 10 版を用いた。対象者の HCV 抗体判定別に比較検討した。

<検討 2> 追跡調査受診者のうち、初回調査と追跡調査の血清生化学データ (AST、ALT、GTP) が得られた 1569 名について HCV 抗体判定別に AAR の変化および関連要因を比較検討した。

<検討 3> 肝線維化マーカーとして Sud A が報告した Fibrosis probability index (FPI) を用い (Sud A. et al, Hepatology 2004)、FPI 算出に必要なデータ (AST、年齢、飲酒歴、HOMA-1R、血清総コレステロール) がすべて得られた対象者について、HCV 抗体判定別に FPI の変化および関連要因を比較検討した。尚、FPI は対数オッズの値を示した。

(倫理面への配慮)

本研究は、山形大学医学部倫理審査委員会の倫理審査の承認を受け実施された。解析に使用したデータは同審査によって承認された山形大学「地域特性を生かした分子疫学研究」(Takahata Study) の匿名化されたデータベースの一部であり、研究方法による不利益はなく、個人情報保護は保護され、倫理面で問題となることはないと考えられる。

C . 研究結果

対象者 3511 名の HCV 抗体判定結果は陰性 3452 名 (98.3%)、弱陽性 27 名 (0.8%)、強

陽性 32 名 (0.9%) であった。ベースライン調査時の HCV 抗体判定別特徴は表 1 に示す通りである。

表 1 HCV 抗体判定別特徴

| | | HCV 抗体 | | | p 値 |
|------|-------------|----------------|---------------|----------------|---------|
| | | 陰性 N = 3432 | 弱陽性 N = 27 | 強陽性 N = 32 | |
| 年齢 | 中央値 (範囲) | 63 (40-87) | 70 (56-78) | 64 (49-79) | < 0.01 |
| 性別 | 男性 (%) | 1554 (45) | 5 (19) | 15 (47) | < 0.05 |
| AST | 中央値 (範囲) | 23 (10-453) | 22 (13-58) | 36 (13-96) | < 0.001 |
| ALT | 中央値 (範囲) | 20 (4-238) | 17 (10-71) | 28 (11-132) | < 0.01 |
| γ-GT | 中央値 (範囲) | 23 (6-971) | 18 (8-93) | 30 (11-340) | 0.135 |

χ^2 検定、Kruskal-Wallis 検定

年齢は弱陽性者で最も高く ($p < 0.01$)、性別はいずれの群でも女性が半数以上を占め、特に弱陽性者で女性の占める割合が高かった ($p < 0.05$)。AST、ALT は強陽性者で有意に高かった ($p < 0.001$ 、 $p < 0.01$)。

<検討 1>

1. 発癌状況

山形県地域がん登録データとの照合の結果、5 年間の観察期間内に HCV 抗体強陽性者 32 名中 3 名に発癌を認め、そのうち 2 名に原発性肝癌 (C220) が認められた。一方、HCV 抗体陰性者では 134 名に発癌を認め、最も多かったのは胃癌 (C160 ~ 163, C169) 計 42 名であり、次に多かったのは結腸および直腸の癌 (C180, 182, 184, 186, 187, 189, 209) 計 21 名であった。HCV 抗体弱陽性者に

は2名の発癌を認め、白血病(C441)と眼瞼(C421)であった。HCV抗体陰性者と弱陽性者に原発性肝癌発生は認めなかった。

2. 予後調査

住民基本台帳および死亡個票との照合による予後調査の結果、5年間における本コホートの転出者は計46名、死亡者は計221名であった。HCV抗体強陽性者では7名の死亡を認め、そのうち2名は死因が原発性肝癌であった。HCV抗体陰性者では213名の死亡を認め、死因で最も多かったのは肺癌(C341, 343, 349)計22名であり、次に多かったのは急性心筋梗塞(I211, 212, 219)計20名であった。HCV抗体弱陽性者では死亡は白血病による1名のみであった。

<検討2>

追跡調査受診者の対象者は、HCV抗体陰性者1542名、弱陽性者7名、強陽性者10名であった。AARは年齢が高くなるほど高い値を示しており($p < 0.01$)、HCV抗体陽性者はすべて50歳以上であったことから分析対象を50歳以上とした。初回調査時のASTはHCV抗体陰性者、弱陽性者、強陽性者ではそれぞれ 25 ± 9.0 , 20 ± 2.6 , 35 ± 16.7 であり、強陽性者で有意に高くなっていた($p = 0.017$)。同様にALTのもそれぞれ 24 ± 12.5 , 17 ± 3.9 , 34 ± 27.7 と強陽性者で有意に高くなっていた($p = 0.050$)。一方AARについてはHCV抗体陰性者、弱陽性者、強陽性者でそれぞれ 1.17 ± 0.34 , 1.21 ± 0.26 , 1.19 ± 0.35 となり明らかな差を認めなかった($p = 0.925$)。

追跡調査時のAARは、HCV抗体陰性者、弱

陽性者、強陽性者でそれぞれ 1.26 ± 0.40 , 1.29 ± 0.29 , 1.21 ± 0.31 となり、初回調査時の値と比較すると、陰性者で有意な上昇を認め($p < 0.001$)、弱陽性者では有意差はないものの上昇傾向を認め($p = 0.057$)、強陽性者では明らかな変化を認めなかった($p = 0.821$)。

<検討3>

続いて肝線維化マーカーとしてFPIを求めHCV抗体判定別に比較検討した。FPIは年齢が上昇するほど高い値を示したため、検討2と同様に50歳以上を分析対象とした。初回調査時のFPIは、HCV抗体陰性者全体($n = 2450$)で中央値-1.4(範囲:-5.1~45.6)、弱陽性者全体($n = 21$)で-1.4(範囲:-3.0~0.8)、強陽性者全体($n = 23$)で-0.6(範囲:-3.0~1.6)となり、強陽性者で有意に高い値を示していた($p < 0.05$)。

追跡調査では陰性者886名、弱陽性者3名、強陽性者8名が分析可能であり、FPIはいずれの群でも初回調査に比べて追跡調査で高い値を示し、その変化量は、HCV抗体陰性群の中央値0.44(範囲:-5.6-9.76)に比較し、弱陽性群では対象者が少なく評価は困難であるものの明らかな有意差はなく、強陽性群では中央値0.77(範囲0.18-33.6)と有意に高い値を指示していた($p < 0.001$)。

D. 考察

40歳以上の住民コホートを5年間追跡した結果2例に原発性肝癌の発生および死亡を認め、いずれもHCV抗体強陽性者からの発癌であった。本コホートはHCV抗体陽性率1.7%と本邦においては比較的低い陽性率の地域住民からなるが、HCV感染が肝発癌お

よび肝癌死亡の強力なリスクとなっていることがあらためて確認された。

残念ながら今回の調査では HBV 感染に関するデータが得られず HBV 関連肝発癌の評価ができなかった。今後 HBs 抗原測定結果が得られる予定であるため、平成 26 年度の検討課題とする。

また、今回の研究では HCV 陽性者の HCVRNA を測定しておらず陽性者における持続感染の有無については評価されていない。弱陽性者群の AAR および FPI が陰性者群と類似した値や変化を示し、強陽性者群では異なった変化を示していることから、弱陽性者群には既往感染者およびインターフェロン治療による SVR 後の患者が含まれ、強陽性者には持続感染者が含まれていることが示唆される。持続感染有無を明らかにすることは肝線維化進展および肝発癌への影響を検討する上で重要であるため、今後の検討課題とする。

FPI は説明変数に年齢が含まれているため今回のような縦断研究では追跡調査での増加傾向に関して慎重な解釈が必要である。FPI の HCV 抗体陰性者における意義については明らかでないが、強陽性群では陰性群に比べて有意に変化量が多かったという本研究の結果は、5 年の経過で強陽性群における肝線維化が進行していることを反映している可能性がある。

また、FPI の説明変数には HOMA-IR と総コレステロールが含まれておりインスリン抵抗性や脂質異常が肝病変進展に与える影響についてもさらに検討が必要である。

E . 結論

住民コホートの 5 年間の追跡調査で HCV 抗体強陽性者にのみ肝細胞癌の発生を認め

た。肝線維化マーカーは HCV 抗体弱陽性者では陰性者と同様の推移を示したのに対し、強陽性者では弱陽性者および陰性者と異なった推移を示した。

F . 健康危険情報

特記すべきことなし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1) Saito T, Sugimoto M, Igarashi K, Saito K, Shao L, Katsumi T, Tomita K, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Tomita M, Ueno Y, Soga T. Dynamics of serum metabolites in patients with chronic hepatitis C receiving pegylated interferon plus ribavirin: A metabolomics analysis. *Metabolism* 62 (11): 1577-1586, 2013.

2) Sato C, Saito T, Shao L, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Makino N, Fukao A, Kitanaka C, Kayama T, Ueno Y, Kawata S. Impaired mitochondrial β -oxidation in patients with chronic hepatitis C: relation with viral load and insulin resistance. *BMC Gastroenterol* 13: 112-119, 2013.

3) Ishii R, Saito T, Shao L, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Makino N, Fukao A, Kitanaka C, Kayama T, Ueno Y, Kawata S: Serum prolactin levels and prolactin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells in hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 85 (7): 119-1205, 2013.

4) 奥本和夫、斎藤貴史、勝見智大、富田恭子、佐藤智佳子、阿蘇里佳、西瀬雄子、渡辺久剛、上野義之：アポ型 ALT により ALT が異常低値を示した C 型慢性肝炎に対して抗ウイルス療法を行った一例。肝臓 54 (8): 543-547, 2013.

5) 渡辺久剛、斎藤貴史、石橋正道、新澤陽英、河田純男：地域コホート研究からみた C 型肝炎ウイルス持続感染者の自然史。「コホート研究からみたウイルス性肝炎の解明」(佐田通夫、田中榮司、田中英夫、長尾由実子編) p130-139、

メディカルレビュー、大阪、2013.

6) 渡辺久剛、上野義之：B型肝炎の自然予後（無治療住民検診での長期予後）肝胆膵疾患；「予後」の変遷．肝胆膵66(3)：399-407，2013.

2. 学会発表

3. 1) 渡辺久剛、勝見智大、富田恭子、佐藤智佳子、奥本和夫、西瀬雄子、斎藤貴史、上野義之：Telaprevir (TVR) 3 剤療法での TVR 用量別治療効果と安全性．第 17 回日本肝臓学会大会、東京；2013 年 10 月．
4. 2) 西瀬雄子、斎藤貴史、勝見智大、富田恭子、佐藤智佳子、石井里佳、奥本和夫、渡辺久剛、今井康陽、堀田博、上野義之：C型肝炎ウイルス 1b の NS3 領域蛋白質 2 次構造を基にしたサブグループ分類と肝細胞癌発生の関連に関する前向き研究 第 3 報 第 49 回日本肝臓学会総会、東京；2013 年 6 月．
5. 3 西瀬雄子、渡辺久剛、勝見智大、富田恭子、佐藤智佳子、芳賀弘明、石井里佳、奥本和夫、斎藤貴史、上野義之：高齢者 C 型肝炎患者におけるインターフェロン治療の有効性と予後 第 99 回日本消化器病学会総会、鹿児島；2013 年 3 月．

H. 的財産権の出願・登録状況

1. 特許の取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成25年度）

Peg-IFN + RBV + TVR 三剤療法治療とコレステロール代謝に関する研究

研究分担者 国立病院機構九州医療センター 消化器内科 科長 中牟田誠
研究協力者 国立病院機構九州医療センター 消化器内科 医長 国府島庸之
医師 吉本剛志
医師 大橋朋子
医長 福泉公仁隆

研究要旨

Telaprevirはコレステロール・脂肪酸代謝に影響を与え、Peg-IFN + RBV + TVR治療中のTC, HDL-C値に変化が生じる。この変化は、肝細胞でのウイルスの増殖や再感染の抑制をもたらすと考えられ、この反応性の違いが治療効果に大きく影響する。

A . 研究目的

現在Genotype 1b C型慢性肝炎症例に対して、Peg-IFN + ribavirin (RBV) + Telaprevir (TVR)三剤併用療法が行われ、非常に高い有効率が報告されている。C型肝炎感染肝では脂質代謝異常を来しており、この変化はC型肝炎ウイルスの増殖に深く関連している。しかし、三剤併用療法の治療経過・治療効果と脂質代謝の関連については不明な点が多く、今回治療前・治療中のコレステロール代謝の変化と治療効果への影響について検討を行った。

B . 研究方法

当院においてHCV Genotype 1b 高ウイルス群119例に対しpeg-IFN + RBV + TVR治療を行い、治療中のコレステロール値の変化と治療効果について解析を行った。肝細胞へのTVRの影響はHepG2細胞を用い、定量的RT-PCR法を用いて各種遺伝子発現を測定した。

（倫理面への配慮）

遺伝子多型解析においては、患者の同意の下に行い、個人情報処理するコンピュータについては、他の一切のコンピュータと切り離すなどの措置を講じるとともに、個人情報を含むその他の資料は、鍵のかかる保管庫に保管するなど個人情報の保護に細心の注意を払った。

C . 研究結果

Peg-IFN + RBV + TVR治療時には、治療早期より血中総コレステロール (TC) とLDLコレステロール (LDL-C)値が有意に上昇し、TC, LDL-CともTVR投与終了後改善した。治療効果との関連について検討したところ、治療前のTC値は著効群で有意に高値であった。また、著効群ではTVR治療経過中のTC値が高く、治療開始前からのTCの変化量も大きい傾向にあった。HepG2細胞にTVRを付加したところ、HCVの細胞への侵入に関与するLDL-receptorの発現やコレステロール合成に関与するHMG-CoA還元酵素の発現が有意に低下した。また脂肪酸合成

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

速に進行している(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。

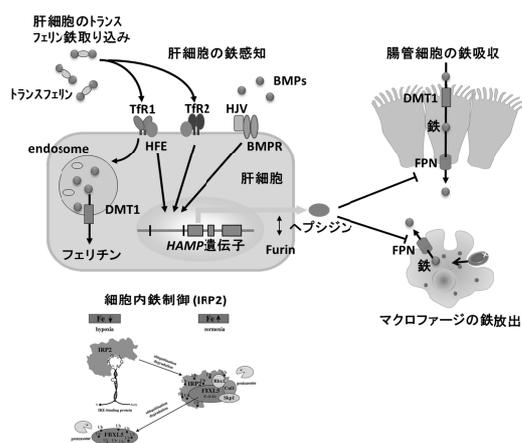


図1：生体内鉄代謝と関連分子

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 (*TFR1*), 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*), ヘム鉄放出分子：Heme oxygenase (*HMOX1, 2*), 鉄放出分子：Ferroportin (*SLC40A1*), 鉄酸化分子：Ceruloplasmin (*CP*), Hephaestin (*Hp*), ヘム放出分子：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 (*BMPR1A, 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、ヘム合成系、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

《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向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。

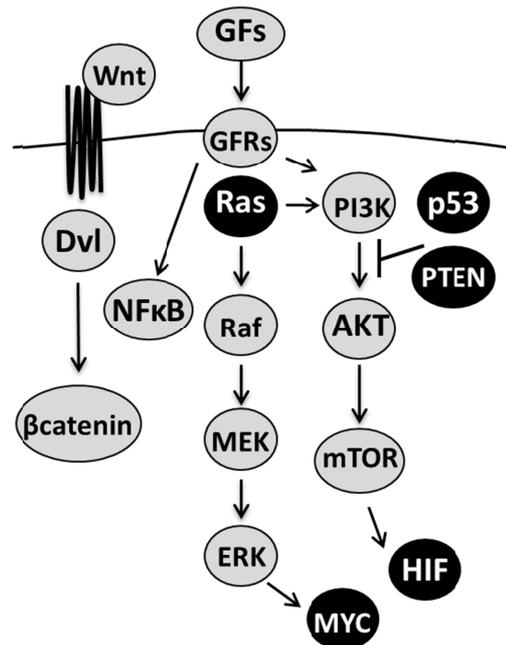


図5：発癌シグナルトランスダクション

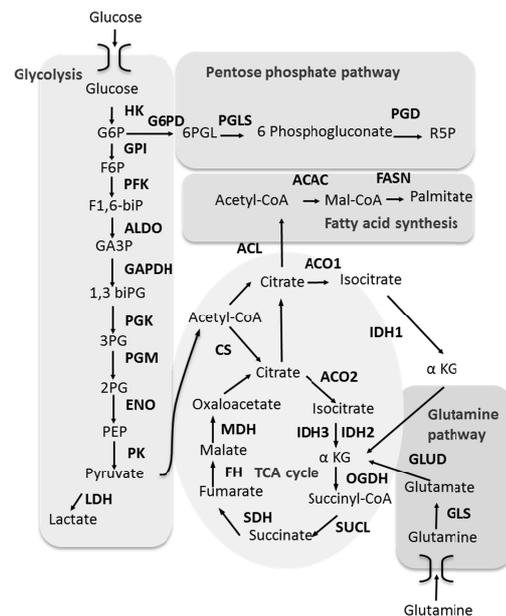


図6：癌細胞の代謝の特徴：癌細胞では低酸素でも解糖系が活性化してエネルギーを産生している。また、解糖系代謝産物からペントースリン酸経路を介して核酸合成、脂肪酸合成、エネルギー源としてグルタミン利用も盛んである。

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)。

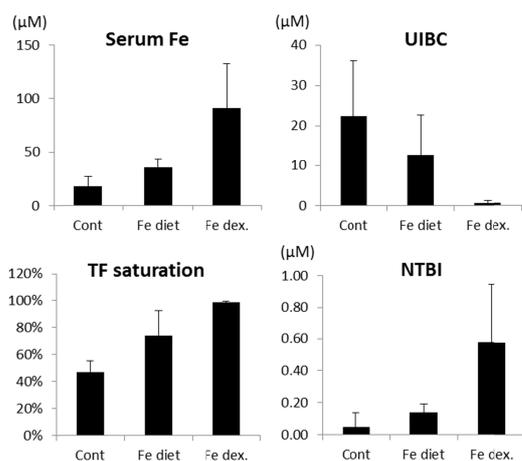


図 7 : 鉄過剰マウスの血清鉄マーカー : トランスフェリン飽和度がコントロール群で 50%、Fe diet 群で 70%、Fe dex 群で 100%であった。

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)。

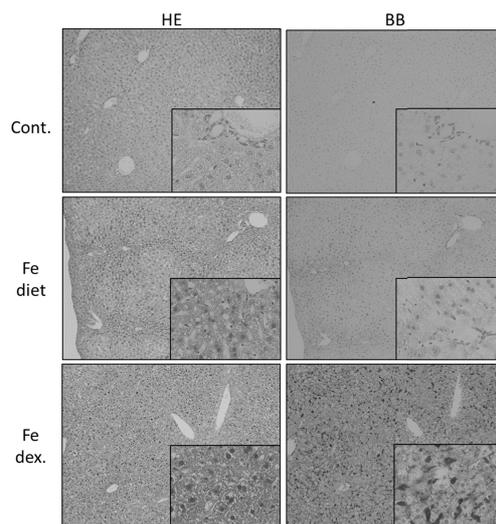
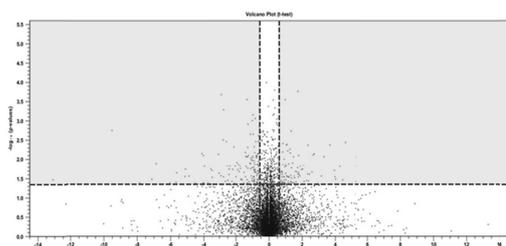


図 8 : 鉄過剰マウスの肝組織像 : HE : HE 染色、BB : ベルリンブルー染色。

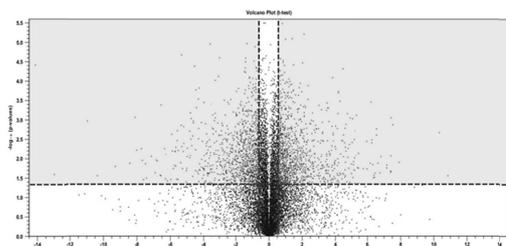
NGS を用いたトランスクリプトーム解析ではコントロール群とマウス軽度鉄過剰モデル群の肝組織の比較では 326 遺伝子、コントロール群とマウス高度鉄過剰モデル群の肝組織比較では 2928 遺伝子の有意な発現変動が検出された (図 9)。

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

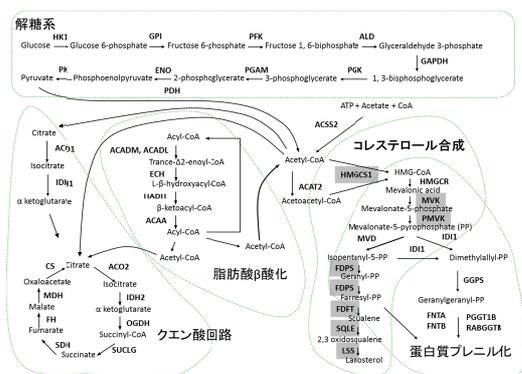


図 1 0 : Dietary iron overload model で発現亢進が認められた分子: コレステロール合成関連酵素の発現亢進が認められた。

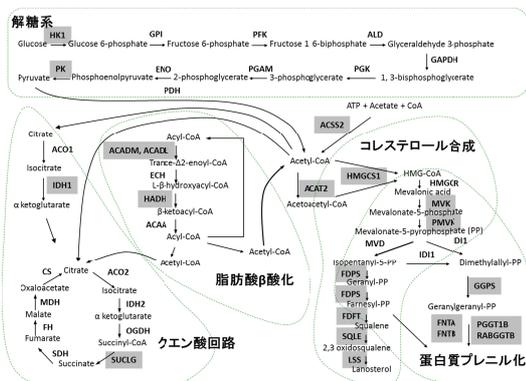


図 1 1 : Iron dextran i.p. model で発現亢進が認められた分子: さらに蛋白質プレニル化酵素、脂肪酸酸化酵素、糖代謝関連酵素と広範囲に糖・脂質代謝関連酵素の発現亢進が認められた。

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、そのキー分子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

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。

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。

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. Hecpidin 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:pii: 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 a. *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. *Hepatol 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. *Hepatol 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

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成 25 年度）

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）

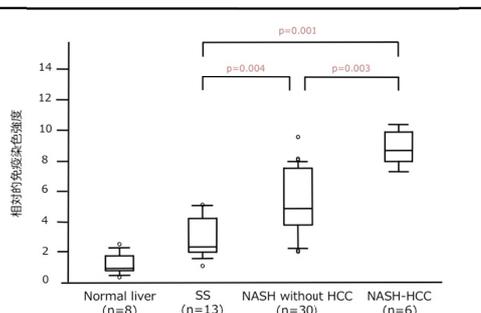
研究に先立って倫理委員会および IRB

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