

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の手法を用いた宿主因子の解析に関する研究班

研究分担者：渡辺 久剛 山形大学医学部消化器内科学 講師

分担研究課題：住民/患者コホートにおける線維化進展に関わる因子の検討

研究要旨：感染時期が明確である HCV 感染住民コホートにおいて、HCV RNA 陽性約 500 名の検体採取と臨床情報の追加収集を行った。肝病態進展に関わる因子として、今年度は新規糖鎖マーカーである M2BPGi をコホート住民で測定したところ、M2BPGi 値はコホートにおける FIB-4 index と相関していた。また M2BPGi による層別化を行うと、累積肝発がん率に差を認めた。一方、初回受診時 M2BPGi 値が高いほど、コホート経過観察期間中の ALT 値持続正常化率は低く、HCV RNA の自然陰性化率も低かった。今後患者コホートと併せ多数例での解析予定である。

A. 研究目的

HCV 感染者の肝線維化進展に関わる因子を明らかにするために、C 型肝炎高浸淫地域コホートを用いて、感染住民における線維化進展に関わる有用な新規のマーカーを見出すことを目的とした。

B. 研究方法

1991 年より現在まで県南に位置する C 型肝炎高浸淫自治体（人口 15,364 人）と連携して、HCV RNA 陽性者をコホート追跡している。

HCV 抗体陽性 1,078 名について、今年度も当該自治体と連携し、追跡調査受診者の検体収集とともに、臨床情報の追加収集を行った。肝発がん状況の把握に超音波検査およびフィブロスキャンを実施した。また病院コホートでその臨床的意義が報告されている新規糖鎖マーカーである M2BPGi を本コホートにおいて測定し、その意義を検討した。

C. 研究結果

(1) HCV 感染者および健常者における糖鎖マーカー

血液生化学データおよびフィブロスキャンデータからキャリアと推定される住民と、HCV 抗体陰性の一般住民において比較すると、HCV キャリア住民において M2BPGi 値は有意に高い傾向を示した。

(2) FIB-4 index との相関

線維化マーカーのひとつである FIB-4 index や血小板数との相関をみると、FIB-4 index とは正の相関と、血小板数とは緩やかな負の相関を認めた。

(3) 累積肝発がん率との関係

初回受診から 5 年以上経過を追跡できている住民で累積肝発がん率と M2BPGi 値との関連を検討すると、初診時 M2BPGi 値が高い例ほど累積

肝発がん率が高い傾向にあった。

(4) 肝病態との関連

HCV キャリア、慢性肝炎、肝がん例において糖鎖マーカーの推移を比較すると、キャリアでは糖鎖マーカーの年次上昇率が低いのに対して、慢性肝炎、肝がん例と肝病態が進行するにつれてその上昇率は高くなる傾向にあった。

(5) 経過における ALT 値の推移、HCV RNA 陰性化との関連

初回受診時 M2BPGi 値が高いほど、コホート経過観察期間中における ALT 値持続正常率は低かった。また経過中の HCV RNA の自然陰性化は、初回受診時 M2BPGi 低値例に多く認めたことから、IL-28B SNP との関連を含め、追加症例でさらに検討する意義があると思われた。

D. 考察

インターフェロン治療歴のない住民ベースの肝炎コホートにおいて、HCV 抗体陽性例の肝線維化進展と新規糖鎖マーカーM2BPGi との関連について検討した。

M2BPGi は FIB-4 index と相関があり、コホート住民における肝発がんや肝病態と関連する可能性が示唆された。一方、経過中の ALT 値の推移やウイルス陰性化との関連についてはさらに多数例での解析を実施中である。

E. 結論

HCV 感染地域における抗ウイルス治療歴のない肝炎住民コホートにおいても、新規糖鎖マーカーである M2BPGi は、線維化進展や肝病態進展に関わる臨床的に有用なマーカーとなりうる可能性があり、次年度に向けてさらに解析を進める必要がある。

F. 研究発表.

1. 論文発表

1. Saito T, Mizuno K, Katsumi T, Tomita K, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, **Watanabe H**, Shao L, Ueno Y. Transmission of hepatitis C virus from a mother to a child carrying IL28B heterozygote rs8099917 among three brothers: A long-term follow-up. *J Med Cases* 5: 227-231,2014.
2. Wada Y, Sato C, Tomita K, Ishii-Aso R, Haga H, Okumoto K, Nishise Y, **Watanabe H**, Saito T, Ueno Y. Possible autoimmune hepatitis induced after chronic active Epstein-Barr virus infection. *Clin J Gastroenterol* 7: 58-61,2014
3. Tomita K, Haga H, Ishii G, Katsumi T, Sato C, Aso R, Okumoto K, Nishise Y, **Watanabe H**, Saito T, Otani K and Ueno Y. Clinical manifestations of liver injury in patients with anorexia nervosa. *Hepato Res* 44(10): E26-31,2014.
4. Tomita K, Haga H, Mizuno K, Katsumi T, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, **Watanabe H**, Saito T and Ueno Y. Epiregulin promotes the emergence and proliferation of adult liver progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307(1): G50-57,2014.

2. 学会発表

1. **Watanabe H**, Sho Ri, Saito T, Mizuno K, Katsumi T, Saito C, Okumoto K, Nishise Y and Ueno Y. Genetic polymorphism in interferon- λ 4 gene and treatment response to peginterferon and ribavirin in Japanese chronic hepatitis C. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 2014.
2. Sugiyama M, Hiramane S, Furusyo N, Ido A, Tsubouchi H, **Watanabe H**, Ueno Y, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Kanto T, Hayashi J, Thomas D, Mizokami M. Association between (TA) $_n$ dinucleotide repeat near IL28B gene and HCV

spontaneous clearance in Japanese and African American. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 2014.

3. 渡辺久剛、阿蘇里佳、上野義之：C 型慢性肝炎 SVR 後の線維化マーカーの推移と肝発癌リスクの検討. 第 40 回日本肝臓学会東部会（パネルディスカッション 3「C 型肝炎：3 剤併用療法の Overview」）、東京；2014 年 11 月.

4. 渡辺久剛、佐藤智佳子、上野義之：生活習慣からみた非 B 非 C 肝臓の臨床的特徴と囲い込みのためのリスクファクター. 第 18 回日本肝臓学会大会、神戸；2014 年 10 月.

5. 佐藤智佳子、渡辺久剛、上野義之：糖尿病患者では潜在的 NASH が混在し、NASH では肝病態進展に糖尿病が促進的役割を果たす. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京；2014 年 5 月.

6. 西瀬雄子、渡辺久剛、富田恭子、勝見智大、佐藤智佳子、奥本和夫、斎藤貴史、上野義之：C 型肝炎患者の肝関連イベントおよび生命予後の予測には ARFI による肝硬度および血清肝線維化スコアが有用である. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京；2014 年 5 月.

7. 水野 恵、渡辺久剛、阿蘇里佳、宇賀神智、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：当科における肝硬変の成因別実態と合併症の臨床的特徴. 第 50 回日本肝臓学会総会、東京；2014 年 5 月.

8. 渡辺久剛、邵 力、上野義之：日本人 C 型肝炎患者におけるインターフェロンλ4 遺伝子多型性の検討. 第 100 回日本消化器病学会総会（シンポジウム 6「難治性 C 型肝炎治療の展望」）、東京；2014 年 4 月.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の
手法を用いた宿主因子の解析に関する研究

研究分担者：本多 政夫 金沢大学医薬保健研究域保健学系 教授

分担研究課題：遺伝子発現解析による IFN- λ シグナルの解析

研究要旨：これまでに、慢性C型肝炎肝組織のISGs誘導はType I-IFNでなくType III-IFNによって主に行われること、肝組織ISGs誘導にはWNT5Aなどの複数の因子が関与することを報告した。本年度はType I-IFNとType III-IFNのシグナル伝達の違いについて検討した。IFN α とIL28Bで誘導される異なる遺伝子の検索から、IL28Bで特異的に誘導される遺伝子群を同定した。その中の分泌蛋白であるLECT2は自然免疫の活性化を活性化しHCVの複製抑制に働いていた。LECT2のウイルス性肝炎やNASHにおける役割、さらには肝癌における役割について更なる検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

肝炎の進展や治療の反応性の違いにはウイルス側因子に加え、宿主側因子の果たす役割が極めて重要と考えられる。また、ゲノム上で認められる変化が実際に遺伝子発現の変化として再現されるかを網羅的遺伝子発現により解析することが病態の解明と治療への応用という観点から重要である。これまでに、慢性C型肝炎肝組織のISGs誘導はType I-IFNでなくType III-IFNによって主に行われること、肝組織ISGs誘導にはWNT5Aなどの複数の因子が関与することを報告した。本年度はType I-IFNとType III-IFNのシグナル伝達の違いについて検討した。

B. 研究方法

初代ヒト肝細胞にIFN α 及びIL28Bを添加し6、12、24時間後に細胞を採取し、Gene Chipにて遺伝子発現を解析した。HCV複製の解析には、ゲノタイプ1a由来H77Sv3のNS2領域にレポーター遺

伝子(*Gussia Luciferase*)を入れ込んだ感染クローンを用いた。

C. 研究結果

IFN α 及びIL28B共通して、ISG誘導、免疫応答遺伝子の強い誘導が認められた。それらの多くの発現誘導はIFN α の方がIL28Bよりも強かった。一方、IL28BでIFN α よりも強い発現誘導を示す41個の遺伝子を同定した。その中でLeukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2)に注目した。LECT2は好中球遊走因子として同定された分泌蛋白であり、成人及び胎児肝で高発現すること、多彩な機能が報告され肝再生、分化、DNA損傷、自己免疫などに関与することが報告されている。しかしながら、これまでにHCV複製に与える影響については明らかではなかった。

LECT2をHuh-7.5細胞に過剰発現させ、HCVccの感染実験を行うとLECT2の発現量依存的にHCVの感染・複製を抑制した。また、HCVの感染下で

LECT2 の過剰発現は IL28B で誘導される ISGs の発現を増強させた。また、LECT2 は IFN- α や IL28B の抗ウイルス効果を有意に増強させた。さらに LECT2 の発現抑制は IL28B で誘導される ISGs の発現を抑制し抗ウイルス効果を減弱させた。臨床症例での検討では SVR 症例では nonSVR に比し、治療前の LECT2 の発現が有意に高値を示した。さらに LECT2 トランスジェニックマウスでの検討では、p-STAT1 及び p-IRF7 の発現は WT マウスより高値を示し、PolyIC によりそれらの発現がより強く誘導された。以上より、LECT2 は自然免疫の活性化を介して、HCV の複製抑制に働いていると考えられた。

D. 考察

今回、IFN α と IL28B で誘導される異なる遺伝子の検索から、IL28B で特異的に誘導される遺伝子群を同定した。LECT2 は自然免疫の活性化を介して、HCV の複製抑制に働いていると考えられた。これまでに LECT2 は肥満症例で高発現すること、肝で高発現する LECT2 が末梢筋の JNK を活性化させインスリン抵抗性を誘導することが報告され (Diabetes 2014)、LECT2 は生活習慣病と関連したヘパトカインの一つとして報告されている。また、LECT2 は Wnt シグナルを抑制し、肝発癌を抑制する可能性も示唆されている。今回の HCV 複製に関する検討では LECT2 は自然免疫の活性化を活性化し HCV の複製抑制に働いていた。LECT2 のウイルス性肝炎や NASH における役割、さらには肝癌における役割について更に検討する必要があると考えられた。

E. 結論

IFN α と IL28B で誘導される異なる遺伝子の検索から、IL28B で特異的に誘導される遺伝子を同定した。LECT2 は自然免疫の活性化を介して、HCV の複製を抑制した。

F. 研究発表

1. 論文発表
 1. Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. Selitsky SR, Baran-Gale J, **Honda M**, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P. Sci Rep. 2015 Jan 8;5:7675. doi: 10.1038/srep07675.
 2. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. Hum Genet. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsushashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, **Honda M**, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y. 2015 Mar;134(3):279-89. doi: 10.1007/s00439-014-1520-7.
 3. Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy. Terashima T, Yamashita T, Iida N, Yamashita T, Nakagawa H, Arai K, Kitamura K, Kagaya T, Sakai Y, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. Hepatol Res. 2014 Oct 16. doi:10.1111/hepr.12436. [Epub ahead of print]
 4. Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway. Shirasaki T, **Honda M**, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Okada H, Takabatake R,

- Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. *Hepatology*. 2014. Nov;60(5):1519-30. doi: 10.1002/hep.27277.
5. Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. Terashima T, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Kitahara M, Nakagawa H, Kagaya T, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. *Hepatol Res*. 2014 Nov;44(12):1179-85. doi: 10.1111/hepr.12266.
 6. Autoantibody status and histological variables influence biochemical response to treatment and long-term outcomes in Japanese patients with primary biliary cirrhosis. Nakamura M, Kondo H, Tanaka A, Komori A, Ito M, Yamamoto K, Ohira H, Zeniya M, Hashimoto E, **Honda M**, Kaneko S, Ueno Y, Kikuchi K, Shimoda S, Harada K, Arai K, Miyake Y, Abe M, Taniai M, Saibara T, Sakisaka S, Takikawa H, Onji M, Tsubouchi H, Nakanuma Y, Ishibashi H. *Hepatol Res*. 2014 Sep 14. doi:10.1111/hepr.12423. [Epub ahead of print]
 7. Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kitamura S, Zen Y, Nakanuma Y, **Honda M**, Kaneko S. *Liver Int*. 2014 Sep 15. doi: 10.1111/liv.12685. [Epub ahead of print]
 8. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Takeshita Y, Takamura T, **Honda M**, Kita Y, Zen Y, Kato KI, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *Diabetologia*. 2014 May;57(5):878-90. doi: 10.1007/s00125-013-3149-9.
 9. P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma. Terashima T, Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Yoshida M, Ota H, Onishi I, Kayahara M, Ohtsubo K, Kagaya T, **Honda M**, Kaneko S. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 May;63(5):479-89. doi: 10.1007/s00262-014-1529-8.
 10. The acyclic retinoid peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro. Shimakami T, **Honda M**, Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiimoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S. *Sci Rep*. 2014 Apr 15;4:4688. doi: 10.1038/srep04688.
 11. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. **Honda M**, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E and Kaneko S. *Hepatology*. 2014 Mar;59(3):828-38. doi: 10.1002/hep.26788.
 12. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma. Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H,

Yamashita T, Mizukoshi M, **Honda M**,
Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y,
Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang XW,
Kaneko S. Hepatology. 2014 Nov;60(5):1674-85.
doi: 10.1002/hep.27093.

13. New susceptibility and resistance HLA-DP alleles to HBV-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, 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, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. PLoS One. 2014 Feb 10;9(2):e86449. doi: 10.1371/journal.pone.0086449.

14. The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. Zeng SS, Yamashita T, Kondo M, Nio K, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Yoshida M, Hayashi T, Oishi N, Ikeda H, **Honda M**, Kaneko S. J Hepatol. 2014 Jan;60(1):127-34. doi: 10.1016/j.jhep.2013.08.024.

2. 学会発表

1. LECT2 Specifically Induced by IL28B Regulates Interferon Response and HCV Replication. (oral presentation) Shirasaki T, **Honda M**, Shimakami T, Murai K, Shiimoto T, Misu H, Takamura T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S. 21st

International Symposium on Hepatitis C
Viruses(HCV2014). 2014年9月7-11日.バンフ
(カナダ)

G. 知的所得権の所得状況

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
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の
手法を用いた宿主因子の解析に関する研究

分担研究者：黒崎 雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科 部長

分担研究課題：肝線維化進行と発がん関連因子の検討

研究要旨：C型慢性肝炎で複数回肝生検を施行した176症例を対象として、肝疾患の病状との関連が報告されている候補SNPをタイピングし、経時的な線維化進行、発がんとの関連性を検証した。海外のGWASで同定されたSNPは、当院症例では肝線維化ステージ、経時的な線維化進行速度と関連がなかった。一方、NAFLDにおいて肝線維化やSteatosisと関連するPNPLA3遺伝子多型は、肝線維化ステージ、経時的な線維化進行速度と有意な関連性を示した。PNPLA3はALTとは関連しなかった。PNPLA3のnon-CCは、年齢とは独立した線維化進行要因であった。PNPLA3と年齢を組み合わせて、線維化進行リスクを3段階で予測すると、若年かつPNPLA3がCCと比較し、高齢かつPNPLA3がnon-CCでは線維化進行リスクが4.5倍であった。

A. 研究目的

C型慢性肝炎においては、線維化が長期間進行しない症例から、比較的短期間に線維化が進行し肝硬変、肝がんに進展する症例も存在する。線維化の進行速度は平均では約 0.1 ステージ/年といわれるが、個々の症例における相違を規定する要因は不明である。本研究では、肝疾患の病状との関連が報告されている候補 SNP と肝線維化進行との関連を検討し、さらに発がんとの関連も検討することを目的とした。

B. 研究方法

C型慢性肝炎で複数回肝生検を施行した 176 症例を対象とした。平均年齢は 56 歳、2 回の肝生検の間隔は平均 6.2 年であった。末梢血リンパ球から DNA を抽出し、Taqman Probe を用いて rs8099917:IL28B、rs738409:PNPLA3、rs4374383:MERTK、

rs9380516:TULP1、rs2629751:GLT8D2 をタイピングし、Genotype と臨床像との関連性を検討した。

C. 研究結果

肝線維化の進行した症例の頻度は、1 回目肝生検 F1、F2、F3 において、それぞれ 40%、40%、28% であった。線維化進行速度 (Stage/year) は、MERTK (AA 0.08, non-AA 0.08)、TULP1 (CC 0.06, non-CC 0.12)、GLT8D2 (GG 0.11, non-GG 0.07) では有意差がなかった。一方 IL28B と PNPLA3 の遺伝子多型と線維化ステージ進行は関連があり、IL28B TT では 0.03 に対し non-TT では 0.14 ($p < 0.01$)、PNPLA3 CC では 0.02 に対し non-CC では 0.10 ($p = 0.005$) であった。

Genotype 以外に肝線維化進行と関連した因子は、年齢、ALT、肝脂肪化であり、多変量解析では年齢 60 歳以上 (HR2.2、95%CI 1.3-3.7)、ALT40 以上 (HR2.2、95%CI 1.3-3.7)、IL28B non-TT (HR2.1、

95%CI 1.3-3.4)、PNPLA3 non-CC (HR2.5、95%CI 1.4-4.9) が独立有意因子であった。

PNPLA3 GG は有意な発がん関連因子であり、GG の5年発がん率14.4%に対して、non-GG では5.7%であった。

D. 考察

非アルコール性脂肪肝炎で線維化進行と関連するPNPLA3 genotype は、C型肝炎においても線維化進行と関連する。さらに肝発がんとも関連したことから、PNPLA3 の機能の解明が重要な課題である。また臨床的には、年齢、ALT に加えてPNPLA3、IL28B のGenotype を測定することで、線維化進行のリスクを把握でき、高リスク症例の囲い込みに有用となる。

E. 結論

C型肝炎における経時的な線維化進行にPNPLA3、IL28B のGenotype が関連し、年齢、ALT と組み合わせることで、線維化進行のリスクを把握できる。さらにPNPLA3 は発がんリスクとも関連することから、重要な診療情報となりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① 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 *Hepatology Res* 2014;44:720-727.
- ② Tamaki N, **Kurosaki M**, Matsuda S, Muraoka M, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J,

Takahashi Y, Asahina Y & Izumi N. Non-invasive prediction of hepatocellular carcinoma development using serum fibrosis marker in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2014; 49:1495-1503.

- ③ Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsushashi H, **Kurosaki M**, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K & Tanaka Y. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet* 2015; 134:279-289.
- ④ Tamaki N, **Kurosaki M**, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H & Izumi N. Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Hepatology Res* 2015 in press.

2. 学会発表

- ① Genetic polymorphism in PNPLA3 gene impacts fibrosis progression and hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C but not in hepatitis B. **Masayuki Kurosaki**, Kaoru Tsuchiya, Nobuharu Tamaki, Yutaka Yasui, Takanori

G. 知的所得権の所得状況

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
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の
手法を用いた宿主因子の解析に関する研究

研究分担者：島田 光生 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部消化器・移植外科学 教授
研究協力者：森根 裕二 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部消化器・移植外科学 講師
宇都宮 徹 大分県立病院外科 部長

分担研究課題：非 B 非 C 肝癌の発癌および進展に関する DNA メチル化異常の解析

研究要旨：これまで、肝細胞癌切除例の非癌部肝組織に着目し、多中心性再発（de novo 肝発癌）との関連および背景肝疾患ごとの分子遺伝学的特徴を DNA マイクロアレイ法および miRNA マイクロアレイ法を用いて解析してきた。今回、非 B 非 C 肝細胞癌 15 例と正常肝 8 例の非癌部肝組織を用いて DNA methylation microarray 解析を行った。Volcano plot 解析にて HBcAb 陰性群関連サイト 87 個と HBcAb 陽性群関連サイト 603 個を同定した。主成分分析にて正常肝とそれぞれの群が判別可能であった。一方、肝癌組織で低メチル化を示すのは 3108 サイト、高メチル化は 31 サイトであり、明らかな Global hypomethylation を確認した。以上より肝発癌および進展の分子機構に非癌部肝組織と肝癌組織における DNA メチル化異常が関与している可能性が示された。

A. 研究目的

これまで field carcinogenesis の概念に基づいて肝細胞癌切除例の非癌部肝組織に着目し、多中心性の残肝再発（de novo 肝発癌）との関連や背景肝疾患ごとの分子遺伝学的特徴を DNA マイクロアレイ法および miRNA マイクロアレイ法を用いて解析してきた。その結果、非癌部肝組織における遺伝子発現や miRNA 発現のプロファイルを用いて肝発癌リスクを予測可能であることを明らかにし報告してきた。

そこで本研究では、非癌部肝組織および肝癌組織における DNA メチル化異常と肝発癌および進展における分子機構との関連を検討する。

B. 研究方法

非 B 非 C 肝細胞癌 15 例（HBcAb 陽性 8 例、HBcAb 陰性 7 例）と転移性肝癌 8 例（正常肝）の肝切除標本における非癌部肝組織と肝癌組織を対象とした。それぞれより DNA を抽出し、Bisulfite 処理後、Infinium Human Methylation 450 BeadChip（illumina）を用いて DNA methylation microarray（485,764 サイト搭載）解析を行った。さらにいくつかの特徴的な DNA メチル化異常については、RT-PCR 法により遺伝子発現との相関および臨床病理学的因子との関連を検討した。

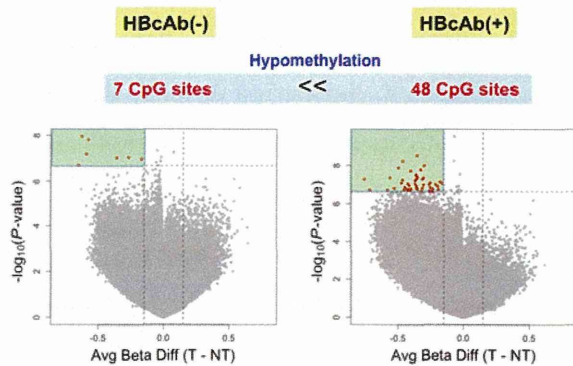
C. 研究結果

(1) 肝癌切除例非癌部肝組織における DNA メチル化異常：Volcano plot 解析にて HBcAb 陰性群

関連サイト 87 個と HBcAb 陽性群関連サイト 603 個を同定した。主成分分析にて正常肝とそれぞれの群がきれいに判別可能であった。

(2) 肝癌切除例の肝癌組織における DNA メチル化異常：まず正常肝と非癌部肝組織の比較の際と同様の条件(beta 値の差 0.2 以上、 $P < 0.05$)で肝癌組織と非癌部肝組織を比較するとわずかの CpG サイトの違いしか検出されなかった。そこで条件を緩和して(beta 値の差 0.15 以上、 $P < 0.10$)比較した結果、肝癌組織において高メチル化のサイトは皆無であり、55 個の低メチル化サイトが同定できた。内訳は、HBcAb 陰性群関連サイト 7 個と HBcAb 陽性群関連サイト 48 個であった (図 1)。

Volcano plot for difference "Non-tumor vs. Tumor" - Beta difference ≥ 0.15 , $p < 0.10$ -

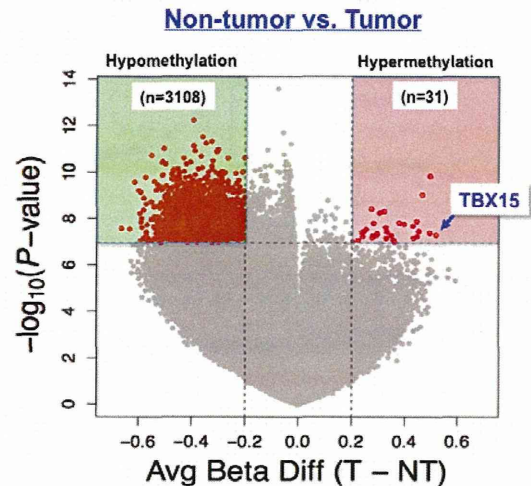


(図 1)

肝癌組織と非癌部肝組織の methylation status の差が小さかったことより、HBcAb の有無にかかわらず非 B 非 C 肝細胞癌 15 例と正常肝 8 例の比較を beta 値の差 0.2 以上、 $P < 0.05$ の条件で試みた。その結果、肝癌組織において有意な低メチル化を認めたのは 3108 サイト、有意な高メチル化を認めたのは 31 サイトであり、明らかな Global hypomethylation が確認できた。

また、最も強い高メチル化を示したのは TBX15 であった (図 2)。

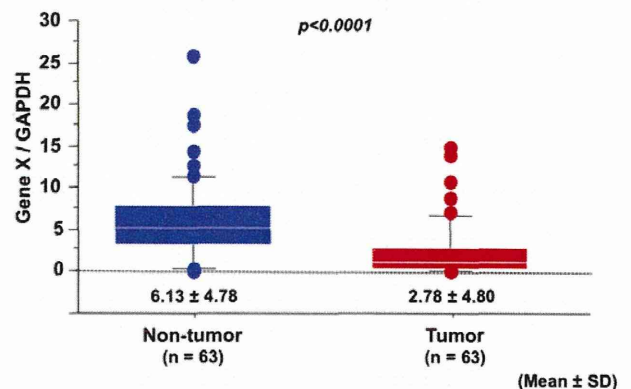
Volcano plot for differential DNA methylation - Beta difference > 0.2 , $p < 0.05$ -



(図 2)

そこで、肝癌切除 63 例の肝癌組織および非癌部肝組織における TBX15 遺伝子の発現量を RT-PCR 法にて解析し、臨床病理学的意義について検討を行った。まず、TBX15 遺伝子発現は肝癌組織で非癌部肝組織に比較し有意に低発現であった (図 3)。

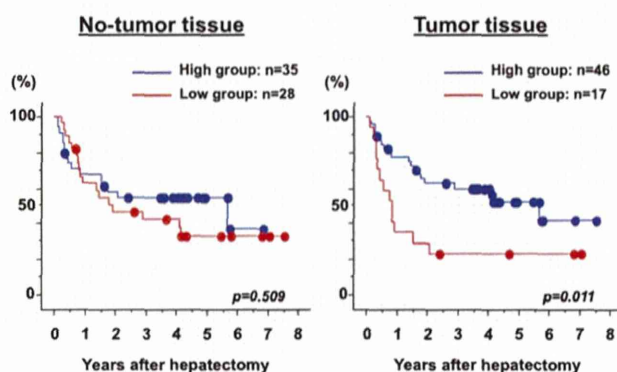
TBX15 gene-expression - Non-tumor vs. Tumor -



(図 3)

さらに、臨床病理学的因子との関連を解析したところ、年齢、性、肝機能、腫瘍因子などでは両群間に有意差を認めないものの肝癌組織での低発現群で有意に無再発生存率が不良であった (図 4)。

Disease-free survival - TBX15 -



(図 4)

D. 考察

今回、非 B 非 C 肝細胞癌例 (HBcAb 陽性例、HBcAb 陰性例) の非癌部肝組織と肝癌組織の DNA メチル化状態を DNA methylation microarray を用いて詳細に解析した。これまでも正常肝から非癌部肝組織、肝癌組織へとメチル化異常が蓄積され肝発癌や癌進展に関与する可能性が示唆されていたが、今回、メチル化状態は正常肝と非癌部肝組織の違いの方が非癌部肝組織と肝癌組織の違いより高度であることが明らかとなった。また、前者で同定された CpG サイトと後者の CpG サイトとは一致するものは検出されなかった。さらに、非癌部肝組織と同様に肝癌組織においても HBcAb 陽性群で陰性群と比較し、より高度の DNA メチル化異常を示すことが明らかとなった。

また、肝癌組織において最も強い高メチル化を示した TBX15 に着目し臨床病理学的特徴を解析した結果、低発現群で有意に予後不良であった。したがって、TBX15 は肝癌における新規の癌抑制遺伝子である可能性が示された。

これまで非癌部肝組織における分子遺伝学的特徴と肝発癌リスクの関連に着目し、研究を進めてきた。そこで、今回解析した 15 例の肝癌切除例において、多中心性再発と非癌部肝組織におけるメチル化異常との関連を調査した。しかしなが

らこれまでに再発した 4 例はいずれも 1 年以内の肝内転移再発と考えられ、多中心性再発を認められた症例はこれまでにない。したがって非癌部肝組織における DNA メチル化異常と肝発癌リスクとの関連を調べるには症例数の増加と観察期間の延長が必要であると考えられた。

E. 結論

非 B 非 C 肝細胞癌例の非癌部肝組織と肝癌組織に特徴的な DNA メチル化異常の同定が可能である。しかしながら、これらと肝発癌との関連を解明するには、さらなる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Utsunomiya T, Shimada M, Kudo M, Ichida T, Matsui O, Izumi N, Matsuyama Y, Sakamoto M, Nakashima O, Ku Y, Kokudo N, Makuuchi M; Liver Cancer Study Group of Japan. Nationwide study of 4741 patients with non-B non-C hepatocellular carcinoma with special reference to the therapeutic impact. *Ann Surg.* 2014; 259(2): 336-45.
- (2) Utsunomiya T, Ishikawa D, Asanoma M, Yamada S, Iwahashi S, Kanamoto M, Arakawa Y, Ikemoto T, Morine Y, Imura S, Ishibashi H, Takasu C, Shimada M. Specific miRNA expression profiles of non-tumor liver tissue predict a risk for recurrence of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2014; 44(6): 631-8.
- (3) Kenjo A, Miyata H, Gotoh M, Kitagawa Y, Shimada M, Baba H, Tomita N, Kimura W, Sugihara K, Mori M. Risk stratification

of 7,732 hepatectomy cases in 2011 from the National Clinical Database for Japan. *J Am Coll Surg.* 2014; 218(3): 412-22.

- (4) Utsunomiya T, Shimada M, Morine Y, Tajima A, Imoto I. Specific molecular signatures of non-tumor liver tissue may predict a risk of hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci.* 2014; 105(7): 749-54.
- (5) Wubetu GY, Utsunomiya T, Ishikawa D, Yamada S, Ikemoto T, Morine Y, Iwahashi S, Saito Y, Arakawa Y, Imura S, Kanamoto M, Zhu C, Bando Y, Shimada M. High STAT4 expression is a better prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Ann Surg Oncol.* 2014; 21 Suppl 4: S721-8.
- (6) Zhu C, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, Morine Y, Imura S, Arakawa Y, Takasu C, Ishikawa D, Imoto I, Shimada M. Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) is associated with poor prognosis via activation of c-MET in hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2014; 21 Suppl 4: S729-35.
- (7) Utsunomiya T, Shimada M, Kudo M, Ichida T, Matsui O, Izumi N, Matsuyama Y, Sakamoto M, Nakashima O, Ku Y, Takayama T, Kokudo N; Liver Cancer Study Group of Japan. A Comparison of the Surgical Outcomes Among Patients With

HBV-positive, HCV-positive, and Non-B Non-C Hepatocellular Carcinoma: A Nationwide Study of 11,950 Patients. *Ann Surg.* 2015; 261(3): 513-20.

2. 学会発表

- (1) 宇都宮 徹、島田 光生、石川 大地、齋藤 裕、岩橋 衆一、金本 真美、荒川 悠佑、池本 哲也、森根 裕二、居村 暁
A significant implication to clarify the association between molecular pathogenesis in non-tumor liver tissue and risks of intrahepatic recurrence after a curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. 第114回日本外科学会定期学術総会（平成26年4月3-5日、京都）
- (2) 宇都宮 徹、島田 光生、石川 大地、齋藤 裕、岩橋 衆一、金本 真美、荒川 悠佑、池本 哲也、森根 裕二、居村 暁
肝細胞癌術後再発リスクにおけるepigenetic修飾の関与と癌部・非癌部同時評価による個別化治療への展開 第69回日本消化器外科学会総会（平成26年7月16-18日、郡山）
- (3) Utsunomiya T, Shimada M, Imura S, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Kanamoto M, Iwahashi S, Saito Y, Ishikawa D, Takasu C, Chengzhan Z, Tajima A, Imoto I
Identification of aberrant DNA methylation profiles in non-tumor liver tissues of patients with non-B non-C hepatocellular carcinoma. 2014 American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium

(January 16-18, 2014, San Francisco)

G. 知的所得権の所得状況

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

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の
手法を用いた宿主因子の解析に関する研究

研究分担者：小森 敦正 国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター 難治性疾患研究部長
研究協力者：橋元 悟 国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター
八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター

分担研究課題：検体及び付帯臨床情報の収集と解析

研究要旨：臨床及び予後情報を付帯した国立病院機構長崎医療センター肝生検/肝
癌手術摘出組織バンクを、肝炎の炎症/線維化進展とその改善、さらには肝発癌過
程に伴う epigenome/miRNA/transcriptome/RNAseq の、1. 班内網羅的変動解析等に
利用した。SVR後発癌に関連する遺伝子変化、さらにはNASH肝内炎症関連遺伝子発
現の解析が可能になった。

A. 研究目的

詳細な臨床及び予後情報を有した国立病院機
構長崎医療センター（以下”長崎医療センタ
ー”）肝生検/肝癌手術摘出組織バンク（以下”肝
組織生体バンク”）を、当班で実施される、肝炎
の炎症/線維化進展とその改善、さらには肝発癌
過程に関するゲノム・遺伝子研究において有効活
用する。

B. 研究方法

2003 年 2 月から長崎医療センターにて OCT
compound 包埋下-80℃保存している肝生検、及び
肝癌手術摘出組織、さらにはその付帯臨床情報を、
1. 班内網羅的 RNAseq 解析、さらには 2. 個別研究
に提供した。

C. 研究結果

1. HCV 駆除 (SVR) 後発癌に関わる RNAseq: 1996
年以降長崎医療センターにて、HCV 駆除 (SVR)
後 1 年以降に発癌した症例は 22 例であった。

この中で、2003 年以降に-80℃保存している
手術摘出 HCC 及び周囲肝組織のペア標本 5 例
中初発 3 例の抽出を行い、班研究での RNAseq
に供した。

2. “肝内 N-of-1 omics 変動” 解析: 肝組織生体
バンクの中で、病態と病理像の経時変化が追
跡可能な症例の”肝内 N-of-1 omics 変動”
解析を開始した。第 1 例は AIH の overlap が
強く疑われ、副腎皮質ステロイドが著効した
女性 NASH 症例の、a. 初診 (T1), b. 寛解 (T2),
c. NASH 再発 (T3) 間の肝内 transcriptome 比較
を行った (TORAY 3D gene human mRNA Oligo
chip)。T2 と比較し、T1、T3 とともに 1.5 倍以
上の発現を認める遺伝子を NASH 炎症関連と
定義し、David Bioinformatics Resources
(Huang DW et al, Nature Protoc, 2009) を用
いて Gene ontology (GO) 解析
(EASE/Benjamini 法) を行った。NASH 関連遺
伝子 (n=2017) の上位アノテーションは、
immune response (1.6xe⁻²¹)、response to

wound(1.4×10^{-10})、defense response(1.4×10^{-10})、inflammatory response(3.2×10^{-9})、positive regulation of response to stimulus (3.1×10^{-8})であった。

D. 考察、結論

1. 平成 25 年度手術摘出 Non BC HCC 及び周囲肝組織標本の epigenome/*miRNA/transcriptome* 解析への提供に引き続き、今年度は SVR 後 HCC および周囲肝組織を、班内網羅的解析 *RNAseq* に提供した。直接抗ウイルス剤の発展により SVR 患者の急増が予想される今日、SVR 後発癌関連網羅的ゲノム・遺伝子研究の臨床的意義は高く、ここにおいても長崎医療センター肝組織生体バンクの有効活用が可能であった。
2. NASH を対象とした”肝内 N-of-1 omics 変動”解析は、C 型肝炎を背景とした発癌過程を理解する上での疾患コントロールとなり、ひいては比較肝炎/発癌プロモーション解析につながるアプローチであると考えられる。さらには個別化した肝抗炎症療法の創生にもつながることが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Yatsushashi H. Elevated serum levels of Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology* 60(5):1563-70, 2014
2. 八橋弘, 中村実可, 釘山有希, 佐々木 龍, 戸次鎮宗, 橋元 悟, 斐 成寛, 大谷正史, 佐伯 哲, 長岡進矢, 小森敦正, 阿比留正剛,

峰川貴之, 神山道信, 大熊 博. 生物発光を用いた高感度免疫測定装置 BLEIA®-1200 による HBs 抗原測定 の 有 用 性 . *肝臓* 55(9):521-529, 2014

2. 学会発表

1. Bekki S, Shiota J, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Sasaki R, Hashimoto S, Saeki A, Nagaoka S, Abiru S, Yamasaki K, Komori A, Yatsushashi H. Relationship between platelet counts and ages of patients with hepatocellular carcinoma. 23rd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2014.03.12-15. Brisbane, Australia.
2. Sasaki R, Abiru S, Yamasaki K, Komori A, Yatsushashi H. Risk factors for hepatocellular carcinoma developed after sustained virological response in hepatitis C patients. 23rd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2014.03.12-15. Brisbane, Australia.
3. Hashimoto S, Nakao R, Mine A, Kugiyama Y, Sasaki R, Bekki S, Saeki A, Nagaoka S, Abiru S, Yamasaki K, Komori A, Yatsushashi H. Analysis of HCV-RNA decrease until one week after the start of the triple therapy including protease inhibitor in patients chronically infected with hepatitis C virus genotype 1. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2014.11.09. Boston, U.S.A.
4. Sasaki R, Yamasaki K, Mine A, Kugiyama Y, Bekki S, Hashimoto S, Saeki A, Nagaoka S, Abiru S, Komori A, Kuno A, Korenaga M, Mizokami M, Narimatsu H, Yatsushashi H. The

relationship of Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein and hepatocellular carcinoma developed after sustained virological response against hepatitis C virus. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2014. 11. 10. Boston, U.S.A.

5. 橋元 悟, 中尾留美子, 塩田純也, 釘山有希, 宮副由梨, 佐々木 龍, 戸次鎮宗, 佐伯 哲, 長岡進矢, 阿比留正剛, 山崎一美, 小森敦正, 八橋 弘. C型慢性肝疾患に対するプロテアーゼ阻害薬を含めた3剤併用療法の治療開始後1週までのHCVRNA減衰の検討. 第50回日本肝臓学会総会. 2014. 05. 29. 東京
6. 釘山有希, 山崎一美, 阿比留正剛, 小森敦正, 長岡進矢, 佐伯 哲, 橋元 悟, 戸次鎮宗, 佐々木 龍, 宮副由梨, 塩田純也, 八橋 弘. 肝硬変・慢性肝不全の病態進展と生命予後. 第50回日本肝臓学会総会. 2014. 05. 29. 東京
7. 山崎一美, 阿比留正剛, 小森敦正, 長岡進矢, 佐々木 龍, 佐伯 哲, 橋元 悟, 戸次鎮宗, 宮副由梨, 釘山有希, 塩田純也, 久野 敦, 成松 久, 八橋 弘. 新規糖鎖マーカー WFA (+) M2BP 値は肝発癌リスクを予測する. 第50回日本肝臓学会総会. 2014. 05. 30. 東京

F. 知的所得権の所得状況

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
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の
手法を用いた宿主因子の解析に関する研究

研究分担者：中島 淳 横浜市立大学附属病院・肝胆膵消化器病学教室 主任教授

分担研究課題：非 B 非 C 肝臓がん発生母地としての過栄養による肝臓の
genetic, epigenetic な異常の解析

研究要旨：C型肝炎ウイルス排除後の発がんや非B非C肝臓がんが増加しており新たな問題となっている。またC型肝炎は肝臓の脂肪化を引き起こすことが知られているが、このことから両者の病態進展には共通の機序の存在が予測される。本研究では非B非C肝臓がんのgeneticおよびepigeneticな異常を解析することを目的とする。1年目から関連施設と協力して非B非C肝臓がん患者の手術検体、血液検体の収集を行っている。またこれに先立ち、nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) / nonalcoholic steato-hepatitis (NASH) 発症に関わる因子についてGWASにより解析を行った。その結果、*PNPLA3*遺伝子、*SAMM50*遺伝子、*PARVB*遺伝子のSNPsの関与が示唆された。また、今年度は*PNPLA3*遺伝子、*PARVB*遺伝子のメチル化がNAFLD進展に関与することも示唆された。

来年度は、非B非C肝臓がんの検体を用いて同様の解析を行い非B非C肝臓がん発生母地としての過栄養による肝臓のgenetic, epigeneticな異常を見いだす。さらにウイルス排除後のC型肝炎患者における発がんの要因を解析する予定である。

A. 研究目的

近年、C型肝炎のウイルス排除の奏効率の目覚ましい向上がある。しかしながら、ウイルス排除後の発がんが新たな問題として浮上している。このため発がんのリスク因子の絞り込みや機序の解明、さらには予防（化学予防）が大きな課題となる。

一方、過栄養による脂肪肝（非アルコール性脂肪肝/非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) / nonalcoholic steato-hepatitis (NASH)）が我が国で著増してきている。さらに欧米に追随して、我が国でも非 B 非 C 肝臓がんが著増してきている。また、C型肝炎における脂肪

肝の進展機序は、脂質合成亢進、脂質排泄低下、脂肪酸代謝の低下など、NASHの病態進展機序と類似している。このため、NASHとC型肝炎の病態には共通の機序が存在することが予測される。両者の合併は肝病態を著しく進展させ、肝線維化や肝臓がん発症へと進展させる可能性がある。しかしながら、過栄養による脂肪肝における genetic, epigenetic な異常の我が国における知見は不十分である。

本研究は、NASHにおける発がんの機序を解析することでC型肝炎、とくにウイルス除去の発がんのリスク因子の絞り込みやその機序の解明に繋げることを目的とする。

B. 研究方法

横浜市立大学および関連施設での非 B 非 C 肝臓がん患者の手術検体, 血液検体を収集し以下の解析を行う。

1.

網羅的遺伝子発現解析 : Genome wide association study (GWAS) による非 B 非 C 肝臓がん発がんの遺伝的原因の検索 : 今回はこれに先立ち, NAFLD/NASH (NASH) 発症に関わる因子について検討した。

2.

網羅的メチル化解析 : DNA のメチル化をインフィニウムを用いて解析する。本方法は全ゲノム増幅を用い, ビーズチップ (BeadChip) 上でゲノム断片と試薬を反応させて行う SNP 型の判定 (ジェノタイピング) 法でゲノム全体の SNP を一度に数万~100 万箇所を検出する。

C. 研究結果

1.

これまでも報告されている Patatin-like phospholipase domain-containing 3 (*PNPLA3*) が NAFLD/NASH の疾患感受性遺伝子として報告されていたが, 我々の検討でも *PNPLA3* の rs738409 の SNP が疾患に関与することが示された。また, 肝生検で診断した NAFLD392 人と健常対照群 934 人で 261,540 個の SNP の解析を行い, replication study を NAFLD172 人と健常対照群 1,012 人を行ったところ, *PNPLA3* 遺伝子の他に, *PNPLA3* 遺伝子と同じ 22 番染色体上に存在する *SAMM50* 遺伝子および *PARVB* 遺伝子の SNPs も NAFLD に影響することが示された。

肝生検で診断した NAFLD28 人において *PNPLA3*, *SAMM50*, *PARVB* を含む遺伝子領域を次世代シーケンサーにて解析し, 163 個の SNP を用いて単純性脂肪肝 (SS:simple steatosis) 52 人と NASH488 人でファインマッピングを行った。これらの遺伝子領域には 4 つの LD block が存在し,

3 つの遺伝子は連鎖不平衡にはなかった。*PNPLA3* の他に *PARVB* の SNP が NASH に相関を示し, また組織学的重症度である ballooning においては *PARVB* の SNP が最も強い相関を示した。*PNPLA3* の他に *PARVB* も NASH 発症に関わる重要な遺伝子であることが示唆された。

2.

NAFLD は metabolic syndrome (MetS) の肝臓における表現型と考えられ, 肥満は NAFLD の最大の要因とされるが, やせ型の NAFLD の症例も存在しており, このことから遺伝因子の関与が示唆されている。我々は 580 人の NAFLD と 1,020 人の健常対照群において体重別に解析を行い, 日本人におけるやせ型の NAFLD の遺伝因子を検討した。男性非肥満群, 男性肥満群, 女性非肥満群, 女性肥満群で解析を行った。男性肥満群, 女性肥満群のどちらも *PNPLA3* の遺伝子多型は NAFLD 発症に相関を認めたが, 特に男性非肥満群では, OR 3.13 (1.92 - 5.12) と非常に強い相関を認めた (男性肥満群 (1.64 (1.13 - 2.40))。

3.

上記の如く, *PNPLA3*, *SAMM50*, *PARVB* の SNPs が NAFLD/NASH の進展に関与することを示した。近年では多くの疾患において genetic factor と同様に epigenetics も重要と考えられてきている。我々は, *PNPLA3*, *SAMM50*, *PARVB* の variant 1 と variant 2 の遺伝子調節領域の CpG 領域における DNA メチル化について検討を行った。肝生検にて診断した NAFLD 患者 33 名とし, Fibrosis stage 0, 1 を mild NAFLD, fibrosis stage 2, 3 を advanced NAFLD と定義し, mild NAFLD 患者 22 人と advanced NAFLD 患者 11 人で, 肝臓ゲノムと血液ゲノムを用いて DNA メチル化および mRNA 発現解析を行った。*PNPLA3* の調節領域にある CpG99 の高メチル化と *PARVB* variant 1 の上流にある CpG26 の低メチル化は NAFLD の疾患感受性に関与することが示唆された。