

研究課題名：肝癌発症リスク予測システムに基づいた慢性C型肝炎に対する
個別化医療の導入及びゲノム創薬への取り組み

課題番号：H23-がん臨床-一般-015

研究代表者：東京大学医科学研究所シーケンス技術開発分野 准教授 松田 浩一

1. 本年度の研究成果

a. サンプル収集

個別化医療の実現へ向けて、新規症例のリクルートとDNA、血清などの試料の収集、データ入力作業を進めている。今年度まで東京大学医科学研究所、東京大学消化器内科、国立国際医療センター3施設あわせて慢性C型肝炎患者7500名、HCV陽性肝癌患者2000名のサンプルを収集した。

b. 新規の発癌関連遺伝子の探索

さらに肝癌発症リスク予測システムの構築を目的に、上記のサンプルを用いたゲノムワイドSNPタイピングを施行中である。今年度中にC型肝炎患者5900名、肝癌症例500名のタイピングが終了予定である。既にタイピング済みの肝癌症例1200例、CHC症例700例を用いた全ゲノム関連解析を行い、新規の発癌感受性遺伝子の同定を試みる。これまでHCV陽性肝癌感受性遺伝子についての全ゲノム関連解析は、世界中でも我々のグループと広島大学のグループからの2つの報告のみである。今回症例数を既報の解析と比べて約3倍に増やすことで、より多くの関連遺伝子が同定できると期待される。

c. 肝機能関連遺伝子の解析

さらに肝機能と関連する表現形（血小板値、飲酒量）について遺伝子の解析を行った。

血小板値関連遺伝子として、BAK1及びMHC領域の多型を同定した（文献1）。

また3万人の飲酒量データを元に全ゲノム関連解析を行った結果、アセトアルデヒド代謝に関わるALDH2多型が飲酒量と関連することを明らかとした（論文準備中）。高飲酒群、低血小板群は肝障害のリスクが高くなる可能性があるため、発がんリスクに与える影響について今後検討する。

d. MICAの制御機構の解明

さらに我々が肝癌感受性遺伝子として同定したMICAについて、創薬ターゲットとしての検証を進めている。まず遺伝子多型によってMICAの発現がどの様に調節されているかの解析を行った。MICAのプロモーターの解析の結果、protectiveアレル特異的に転写因子SP1が結合する事が示された。さらに、SP1の過剰発現によってMICAの発現を上昇させること、またその転写誘導にはSNP周辺領域が関与することをレポーター、CHIPアッセイにて証明した。またHeat shock等のストレス刺激によって、MICAの発現量が上昇することを示した（文献2）。これらの結果より、がん組織における発現上昇には、SP1のアレル特異的結合が関与することが示唆された。

さらにmiRNAによる制御機構の解明を目指して、MICAの5'UTRに結合するmiRNAを探索した結果、miR25-93-106bクラスターが発現制御に関与する事が明らかとなった（文献3）。今回の結果より、MICAのがんでの発現調節には複数の機構が存在する事が示された。

e. 肝癌発症関連遺伝子の解析

また肝癌組織において発現低下している遺伝子としてISCUとPARM1を同定した。

ISCUはDNAダメージ依存的にp53によって転写誘導され、Fe-Sクラスター形成を促進する。Fe-S

クラスターはIRP1と結合することでRNAとの結合を抑制する。肝癌組織においては、p53-ISCU経路が高頻度に不活性化されており、IRP1とRNAの結合が亢進する結果、鉄制御タンパク質であるFerritinの減少とTransferin受容体の上昇が引き起こされる。Transferin受容体の上昇及びFerritinの減少によって細胞内遊離鉄が増加する。これらの機序を介して、肝癌組織において高頻度に認められる鉄の蓄積や肝毒性の原因となると考えられる（文献投稿中）。

また肝癌組織で高頻度にDNAメチル化によって発現低下している遺伝子としてPARM1を同定した。PARM1の過剰発現によって癌細胞の増殖が抑制されることから、ISCU, PARM1の発現低下が肝癌発症に寄与していると考えられる（文献準備中）。

一方肝癌組織で発現上昇している遺伝子として、WHSC1L1を同定した。WHSC1L1は正常組織で発現が低下している一方、膀胱癌や肺癌でも発現が上昇している。またヒストンリジンメチル化酵素であるWHSC1L1の発現を抑制することで癌細胞の増殖が有意に抑制された。これらの結果より、WHSC1L1の阻害薬が様々な癌の治療薬となりうることが示された（文献4）。

2. 前年度までの研究成果

1) 個別化医療の実現へ向けた研究としては、現在協力医療機関において、慢性C型肝炎患者、HCV陽性肝癌患者のDNA、血清の収集と臨床情報の整理をすすめている。これまで東京大学医科学研究所、東京大学消化器内科、国立国際医療センター3施設あわせて慢性C型肝炎患者6500名、HCV陽性肝癌患者1600名のサンプルを収集した。

また既存の症例を持ちいた解析により、新たな発癌リスク予測因子の探索を進めた。慢性C型肝炎から肝硬変への進展と関連する遺伝子を同定する目的で、HCV陽性肝硬変患者682名、慢性C型肝炎患者943名を用いて約60万箇所の遺伝子型を決定し、相関解析を行った。その結果、10箇所のSNPが肝硬変の発症リスクと強く関連することが明らかとなった。さらにこれらのSNPについて、肝硬変936症例、慢性C型肝炎3786症例で検討した結果、MHC領域上の5SNPが強い関連を示した。またこれまで肝障害、肝組織の線維化との関連が報告されているHLA遺伝子についても検討を進めた所、複数のHLAアレルが肝硬変のリスクとなることが明らかとなった。多変量解析の結果、最終的に3つの遺伝子多型が肝硬変の発症リスクと独立して関連することを明らかとした。またこれらの遺伝子は、インターフェロン治療の有無や性別、アルコールと関連なく肝硬変のリスクと相関することから、独立した予後因子であることが示された（文献5）。またヨーロッパを中心とした他施設共同研究に参加し、肝機能酵素値と関連を示す42の遺伝子を同定した。

さらにmicroRNAの肝癌発症における意義についても検討を進めており、肝癌組織でmiR-122やmiR-140の発現が低下する結果AFP値の上昇や予後不良因子となりうること、RACK1がmicroRNAの機能に重要な因子であることを示した。以上の成果により、慢性C型肝炎の予後とかわる複数の新規遺伝因子が明らかとなっている。

またHBV陽性肝癌における、MICAの意義についても検討を行なった。まずHBV陽性肝癌患者において血中のMICA上の濃度を測定した所、健常人コントロールに比べて、HBV陽性肝癌患者ではMICA値の上昇が認められた。またHCV陽性肝癌患者と同様、MICAの遺伝子型と血清MICA値とは相関を示した。またHBV陽性肝癌407名、慢性B型肝炎患者699名、健常者5657名についてMICAのSNPを解析した結果、MICAがHBV陽性肝癌の発症リスクにも関与することを明らかとした。興味深いことに、HCV陽性肝癌とHBV陽性肝癌ではリスクアレルが逆転しており、さらに分泌型MICAが高値のHBV陽性肝癌症例では予後が不良となっていた。以上の結果より、

分泌型 MICA が HBV 陽性肝癌では癌遺伝子的に機能していると考えられた。

3. 研究成果の意義及び今後の発展性

今回の解析によって、MICA を含む複数の遺伝子多型が HCV 陽性肝癌の発症と関連することが示された。さらに HBV 陽性肝癌においても、血清 MICA 及び MICA の SNP が発癌リスク、予後と関連を示したことより、MICA はウイルス性肝炎にとって有用なバイオマーカーとなりうることが示された。現在症例数を約 3 倍に増やして、新たな疾患関連遺伝子の探索を進めている。これらの解析結果及び飲酒や血小板値と関連する遺伝因子との組み合わせにより、より精度の高い発癌リスク予測システムの構築が可能になると期待される。

ゲノム創薬については、まず転写因子や miRNA を介した MICA の発現調節機構が明らかとなり、今後慢性 C 型肝炎、肝癌患者に対する MICA の活性化を介した治療法の開発を目指している。HCV 陽性肝癌患者の解析結果からは、膜型 MICA を誘導することで発癌リスクを下げられると期待できる。一方 HBV 陽性肝癌の解析結果より、分泌型 MICA の阻害が肝癌の治療に応用できる可能性も示唆された。MICA は HCV 陽性肝癌、HBV 陽性肝癌共に高発現していることから、MICA に対する抗体を用いることによって、分泌型 MICA の中和活性、及び膜型 MICA に対する ADCC 活性を介して、抗腫瘍効果が期待できると考えられる。さらに MICA の切断に寄与するマトリックスメタロプロテアーゼの阻害によって膜型 MICA/分泌型 MICA 比を高めることにより、より強い治療効果が得られると期待できる。

また肝癌組織で発現以上を示す遺伝子として、ISCU, PARM1, WHSC1L1 を同定した。WHSC1L1 に対する阻害薬や、PARM1 の活性化を目指した DNA メチル化阻害薬、瀉血などによって肝癌の治療や予防に寄与すると期待される。

4. 倫理面への配慮

本研究の遂行にあたり、各医療機関、研究施設において倫理審査委員会の承認を得た上で実施しており、また参加者全員よりインフォームドコンセントを取得している。研究参加にあたり患者の負担は年に一回の採血のみであり、健康上の不利益は殆ど生じないと考えられる。本研究で用いた症例は、各病院で連結可能匿名化済みで、解析実施機関に送られる情報には個人情報は一切含まれていない。その為、万一患者情報が外部に漏れたとしても、患者の不利益になる可能性は著しく低いと考えられる。

5. 発表論文

1. A. Aarnink, H.J. Garchon, Y. Okada, A. Takahashi, K. Matsuda, M. Kubo, Y. Nakamura, A. Blancher, Comparative analysis in cynomolgus macaque identifies a novel human MHC locus controlling platelet blood counts independently of BAK1. *Journal of thrombosis and haemostasis* : **JTH** 11 (2013) 384-386.
2. P.H. Lo, Y. Urabe, V. Kumar, C. Tanikawa, K. Koike, N. Kato, D. Miki, K. Chayama, M. Kubo, Y. Nakamura, K. Matsuda, Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. **PloS one** 8 (2013) e61279.
3. T. Kishikawa, M. Otsuka, T. Yoshikawa, M. Ohno, A. Takata, C. Shibata, Y. Kondo, M. Akanuma, H. Yoshida, K. Koike, Regulation of the expression of the liver cancer

susceptibility gene MICA by microRNAs. **Scientific reports** 3 (2013) 2739.

4. D. Kang, H.S. Cho, G. Toyokawa, M. Kogure, Y. Yamane, Y. Iwai, S. Hayami, T. Tsunoda, H.I. Field, K. Matsuda, D.E. Neal, B.A. Ponder, Y. Maehara, Y. Nakamura, R. Hamamoto, The histone methyltransferase Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (WHSC1L1) is involved in human carcinogenesis. **Genes Chromosomes Cancer** 52 (2013) 126-139.
5. Y. Urabe, H. Ochi, N. Kato, V. Kumar, A. Takahashi, R. Muroyama, N. Hosono, M. Otsuka, R. Tateishi, P.H. Lo, C. Tanikawa, M. Omata, K. Koike, D. Miki, H. Abe, N. Kamatani, J. Toyota, H. Kumada, M. Kubo, K. Chayama, Y. Nakamura, K. Matsuda, A genome-wide association study of HCV-induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at the MHC region. **Journal of hepatology** (2013).

6. 研究組織

①研究者名	②分担する研究項目	③所属研究機関及び現在の専門 (研究実施場所)	④所属研究 機関にお ける職名
松田 浩一	研究の統括、臨床情報の収集、 解析。発癌予測システムの構 築・検討、MICA を用いた癌治 療薬開発に向けた検討	東京大学医科学研究所、シーケ ンス技術開発分野・遺伝学 (同上)	准教授
谷川 千津	前向きコホートの検討、個別化 医療の実施、血清・DNAの採取、 臨床情報の収集・管理	東京大学医科学研究所・遺伝学 (同 上)	助教
加藤 直也	個別化医療の実施、血清・DNA の採取、臨床情報の収集・管理	東京大学医科学研究所・消化器病学、 肝臓病学 (同上)	准教授
小池 和彦	臨床情報の収集・整理、発癌関 連因子の検討	東京大学医学部附属病院・消化器内科 学 (同上)	教授
溝上 雅史	臨床情報の収集・整理、発癌関 連因子の検討	国立国際医療研究センター肝炎・免 疫研究センター 肝臓病学 (同上)	研究センタ ー長
徳永 勝士	発癌予測システムの構築	東京大学大学院医学系研究科、人類遺 伝学 (同上)	教授
高橋 篤	統計解析全般	理化学研究所・遺伝統計学 (同上)	チームリー ダー