

**サブテーマ 1 : ウイルス発がんの機序解明と予防・治療法の創出****小テーマ 1-1: ウイルス肝炎からの肝発がん機構・進展因子の解明とその予防・治療法の開発****a) コホート研究等を用いた肝炎進展予測法及び肝がん発症前診断法の確立とその検証****サブテーマリーダー** 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科：教授 坪内博仁**研究従事者** 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科：講師 宇都浩文、医員 上村修司、医員 玉井努、

助教 森内昭博、助教 長谷川将、講師 桶谷真、准教授 井戸章雄

宮崎大学医学部：教授 林克裕

宮崎県産業支援財団：研究員 高濱由香、石田洋一、高見陽一郎、技術スタッフ 佐藤悠子

**研究の概要、新規性及び目標****①研究の概要**

C型肝炎ウイルス（HCV）感染に起因する肝がんは、ウイルス因子と宿主因子が関与していると考えられるが、ウイルス肝炎からの肝発がん機序や進展因子の詳細は不明である。本研究では、HCV 高浸淫地区住民のコホート研究の試料や進行度の異なる HCV 陽性肝疾患患者の血清を用いて肝発がんに関与するウイルス因子及び宿主因子を解析し、予防・治療法の開発を目指す。さらに培養細胞などを用いて遺伝子や蛋白質発現を網羅的に解析し、肝炎の病態進展因子・肝発がん機序の解明を行う。また、本邦で増加中の慢性肝疾患のひとつである非アルコール性脂肪肝炎（NASH）は、酸化ストレスなどの因子で単純性脂肪肝から進展していき、肝がんの原因となる。NASHの病態進展因子を解明することは、肝発がんの機序を解明する上で重要と考えられるため、NASHの診断マーカー探索と病態解明も行う。

**②研究の独自性・新規性**

HCV 既感染者や HCV 持続感染者で肝機能持続正常者は医療機関を受診する機会が少なく、医療機関の受診者の解析だけでは真の肝炎進展因子や肝発がん関連因子を明らかにすることはできない。本研究では 10 年以上継続しているコホート研究により種々の病態の経時的なサンプルを多数得ており、この点は極めて独自性が高い。また、本研究では、遺伝子発現及び蛋白質発現を網羅的に解析する最先端の研究手法も導入されており、真に有用な肝炎進展因子・肝発がん関連因子を同定できるだけでなく、発症前診断など新規性に優れた結果が得られる可能性が高い。遺伝子発現と蛋白質発現を同一サンプルで網羅的に解析する点も独創的かつ新規性が高い。さらに、臨床的に用いられている NASH の特異的診断マーカーはなく、NASH を解析することで慢性肝疾患に関係する病態進展因子を解明でき、あらゆる肝疾患に共通の増悪因子の解明につながる可能性がある。また、本研究で用いた安定同位体標識法である<sup>13</sup>C-NBS 標識法は、新規性が高く新たなタンパク質の同定が期待できる。

**③研究の目標**

- ・フェーズⅠ：コホート研究の HCV キャリアを対象に、HCV 遺伝子配列、HLA 及び SNP 解析を行い、病態進展に関連する因子を明らかにする。また、培養細胞、実験動物および HCV 関連肝疾患のサンプルを用いたマイクロアレイ解析やプロテオーム解析により、肝炎進展因子および肝発がん関連因子を同定する。
- ・フェーズⅡ：フェーズⅠで得られた病態進展因子をもとに新たな肝がん診断法を確立する。その診断法の有用性を前向き研究により確認する。さらに、同定した遺伝子および蛋白質の機能を解析し、これらの分子を標的とする新しい治療法（分子標的療法）の創出を目指す。
- ・フェーズⅢ：新たな肝がん診断法の臨床試験を行う。分子標的治療法の開発を目指した前臨床試験を行う。

**研究の進め方及び進捗状況**

コホート研究サンプルなどを用いて、ウイルス因子（コア領域および NS3 領域の遺伝子配列）、宿主因子（HLA、肥満、炎症反応、一塩基多型（SNP））に着目して検討した。その結果、検討した SNP の一部は肝線維化、肝炎の進展や、HCV 排除に関連する可能性があることを明らかにし、酸化ストレスが肝炎進展に重要であることも示した。また、インターフェロン・リバビリン併用療法をうけた患者の治療前、治療早期の末梢血リンパ球を用いた網羅的遺伝子発現解析では、早期に治療効果を予測できる候補遺伝子を同定した。また SELDI 解析装置を用いて、HCV 関連肝疾患患者血清のタンパク質発現解析を行い、肝がんに関連するタンパクを同定し、7 個の蛋白質を用いた新たな肝がん診断法も確立した。本法は、肝がん発症前診断法として有用性である可能性もコホートサンプルを用いて確認した。一方、NASH を含む、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）患者のプロテオーム解析では、NAFLD 患者血清で増加する複数個のタンパク質ピークを検出し、診断に有用なタンパク質については、臨床応用を視野に入れた ELISA 測定系を構築中である。また、酸化ストレスは C 型慢性肝炎や NAFLD の病態進展に関与していることから、酸化ストレスマーカーも探索した。<sup>13</sup>C-NBS 標識法を用いて、肝細胞に対する酸化ストレス前後でのタンパク質の発現の変化を網羅的に探索し、4 つの酸化ストレスマーカー候補を同定した。

**主な成果****具体的な成果内容：**

HCV 高感染地域コホートの HCV キャリアを対象として、HCV コア領域および NS5B 領域の遺伝子配列を解析した。ウイルス因子として、HCV 遺伝子距離は肝機能正常キャリアでは大きく、異常キャリアでは小さいことを明らかにし、感染拡大時期が推定出来たが病態との関連は明らかにできなかった。宿主因子として HLA 解析を行い、HCV 自然排除に強く関連する DRB1\*0101 を、肝障害と関連する B\*3501、C\*0303、DQB1\*0602 を見出した。また、SNP 解析では TNF- $\alpha$ (-238G/A)と肝線維化の進展、HFE(H63D)と肝炎進展、ENPP1(K121Q)が HCV 自然排除や HCV 量と関連することを見出した。さらに、HCV 感染者における肝がんの発生率は ALT 値と強く関連し、ALT 値は血清フェリチンやチオレドキシシンと相関することを明らかにした。インターフェロン・リバビリン併用療法をうけた患者の治療前、治療早期のリンパ球を用いた網羅的遺伝子発現解析では、

PI3K/mTOR/PAK1 経路や JAK/STAT 経路に關与する遺伝子が、治療早期の效果予測因子として有用である可能性を明らかにし、特許出願した（特願 2008-17738）。また、HCV 肝疾患患者血清のプロテオーム解析から、感度・特異度が 80%以上の肝がん診断法を確立し、この診断法が肝がんと肝硬變の判別だけでなく、肝疾患患者の肝がん発症前診断法となる可能性を明らかにした。

NAFLD 患者血清を用いたプロテオーム解析では、健常者と比べ NAFLD 患者で増加するタンパク質として、キニノーゲン断片を同定し、NAFLD や NASH の診断マーカーとして特許出願した。さらに、同定した部位をエピトープとする抗体を作成し、ELISA 測定系を構築し、診断キット開発に向けて企業と共同研究を進めている。

酸化ストレスが病態進展に大きく關与することを動物モデルで明らかにし、初代培養ヒト肝細胞に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加することで酸化ストレスを誘導し、MnSOD などの酸化ストレスマーカー候補を同定した。さらに、MnSOD の血清中濃度は健常者及び単純性脂肪肝と比較して NASH で有意に高値を示し、血清 MnSOD が NASH の診断マーカーとして有用であると考えられ、特許出願した。

特許件数:3

論文数:35

口頭発表件数:43

**研究成果に関する評価**

**1 国内外における水準との対比**

SNP と HCV 關連肝疾患との關連性を検討した報告はあるが、關連性があるかどうかは結論が出されていない。人種や環境が異なった対象者を用いた報告や、対象数が限られた検討が多いことが一つの理由であり、我々の検討が同じ地域に居住している多数例を解析対象者としている点は極めて信頼性の高い解析結果である。また、多数の HCV 既感染者や HCV 持続感染者で肝機能正常者を対象者とし、かつ日本人での検討を行った点でも、本研究は水準の高い研究と言える。ペグインターフェロン・リバビリン併用治療患者における遺伝子発現に着目した早期治療効果予測法もいくつか報告されているが、臨床応用された手法はなく、われわれの予測法は今後の展開が期待できる。さらに、NAFLD や NASH は今後増加が予想されるが、NAFLD/NASH 特異的な血清マーカーはなく、有用なマーカーが発見できれば、臨床的有用性は高い。また新たなプロテオミクス手法を順次導入することにより、高い研究水準が維持されている。

**2 実用化に向けた波及効果**

本研究により明らかにした HCV に關連した肝炎進展に關与する SNP や遺伝子群は、肝がんの高リスク群を同定する手段としてオーダーメイド医療に展開できる可能性がある。NASH 患者は世界で 1 億 6000 万人にのぼり、肝硬變、肝がんに進展する可能性が高く、NASH の簡便な診断法は、臨床現場において需要性は高い。また、酸化ストレスを血清で簡便に評価できる特異的マーカーが同定できれば、実用性は高い。我々がすでに報告しているいくつかの肝疾患のバイオマーカーは臨床的有用性と市場性が高いと考えられ、実用性に向けた波及効果が期待できる。

**残された課題と対応方針について**

SNP、HCV 遺伝子をより迅速、簡便かつ安価に測定できる手法やチップの開発が望まれる。網羅的遺伝子発現解析で発現の変動を明らかにした遺伝子群は、リアルタイム PCR などの他の発現解析手法を用いて、多数例でその再現性を確認する必要がある。また、SELDI を用いたプロテオーム解析では、解析装置自体の再現性に問題があり、SELDI のピーク値のみでの診断手法には限界があり、診断マーカーとしての実用化には、タンパク同定が必要である。NAFLD 患者血清から同定したキニノーゲン断片は NASH と単純性脂肪肝を区別できる可能性は低く、MnSOD は C 型慢性肝炎などの酸化ストレスが關与する肝疾患でも上昇する可能性があり、いくつかのマーカーを組み合わせた NASH に特異性の高い診断法の開発が必要である。また、肝疾患と關連する可能性が高い遺伝子やタンパク質については、肝疾患の病態にどのように關与しているかを明らかにすることも今後の検討を継続する必要がある。

	JST 負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計
	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	15年度	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	小計	
人件費	0	4,117	4,117	6,297	6,483	4,342	25,356	0	0	0	0	0	0	0	25,356
設備費	14,199	17,305	16,610	14,047	12,619	9,464	84,244	0	0	0	0	0	0	0	84,244
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)	2,006	5,631	11,540	8,432	4,578	2,600	34,787	0	0	0	0	0	0	0	34,787
旅費	0	338	216	1,361	354	210	2,479	0	0	0	0	0	0	0	2,479
その他	27	46	32	438	470	278	1,291	0	0	0	0	0	0	0	1,291
小計	16,232	27,437	32,515	30,575	24,504	16,894	148,157	0	0	0	0	0	0	0	148,157

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

JST 負担による設備: プロテインチップシステム (ProteinChip)、プロテオーム解析装置 (autoflex TOF/TOF)、DNA マイクロアレイ (GeneChip Scanner 3000)、DNA シークエンサー (CEQ-8000)、ナノ LC システム (DiNaS)  
地域負担による設備: