

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：19390202

研究課題名（和文）

C 型肝炎からの肝発がんに関わる酸化的 DNA 損傷修復遺伝子群の解析

研究課題名（英文）

Analyze of DNA repair gene in carcinogenesis from chronic hepatitis C

研究代表者

加藤 淳二 ( Kato Junji )

札幌医科大学 医学部 教授

研究者番号：20244345

研究成果の概要：

MutYH 遺伝子 SNP が肝発がんの予測マーカーとしての有用であることが示唆された。また ChIP on chip アッセイにより接着分子、転写因子および血管新生因子などをはじめとする 101 種類の遺伝子が損傷を受けることが明らかとなった。さらに治療・予防実験として、鉄キレート剤が酸化的 DNA 損傷を介した肝発がんの阻止に有効であることを検証した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2008 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード：①C 型肝炎、②肝発がん、③酸化的 DNA 損傷、④SNP、⑤DNA 修復酵素

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は肝細胞癌(HCC)の主原因であるが、肝発がん機序にはHCV感染によって引き起こされる酸化的DNA障害、特に8-OH-dGの生成が重要な役割を担っていることをこれまでに申請者は明らかにしてきた。生体には種々の修復遺伝子群が存在するが、8-OH-dGを特異的に切出して修復する酵素としてhOGG1、8-OH-dGとの対を成しやすいアデニンミスペアリングを特異的にcut修復するMutYH酵素があるが、このうち、MutYH遺伝子のSNPが肝発がんに関与している可能性をpreliminaryながら確認してきた。

## 2. 研究の目的

C型肝炎で検出される MutYH 遺伝子 SNP の意義について患者検体を用いて発現量を調べ SNP のパターンと比較し、また MutYH SNP が肝発がんの予測マーカーとしての有用性についてサンプルサイズを増やして検討する。一方のアプローチとして、ChIP on chip アッセイにより、HCC 発症患者と未発症患者における損傷遺伝子をスクリーニングする。さらに治療・予防実験として、鉄キレート剤が酸化的 DNA 損傷を介した肝発がんの阻止に有効であるか否かを、肝癌自然発症 LEC rat<sup>2)</sup>を用いた in vivo 実験で検証することを目的とする

### 3. 研究の方法

定法に従い患者抹消血から分離した PBMC より genomic DNA を抽出し、MutYH に関して real time PCR 法で多量のサンプルを同時スクリーニングすることとする。TaqMan 法では major allele を VIC, minor allele を FAM で蛍光標識した TaqMan probe を用い、ABI PRISM 7700 sequence detection system によって real time PCR を施行し Genotyping Assays を行う。さらに RT-PCR により MutYH 発現の genotype 間での差違について検討する。一方 ChIP on chip アッセイにより、HCC 発症患者と未発症患者における損傷遺伝子をスクリーニングする。さらに LEC ラットは肝の ROS 産生増加によって肝炎・肝癌を自然発症することが申請者ら (J Clin Invest) を含めた複数の研究から明らかにされている。とくに生後 16-20 週で肝炎を、65 週で HCC を発症することがわかっており ROS 産生抑制剤 (鉄キレート剤 ICL-670) によって肝硬変および肝癌の発症を阻止できるか否かを検討する (図 1)。

#### Study design

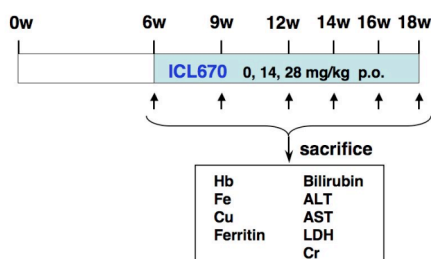


図 1. LEC rat に対する ROS 産生抑制剤の発癌抑制効果の検討 (study design)

### 4. 研究成果

C 型肝癌で有意に検出されることを我々が新たに見出した Mutyh 遺伝子

SNP(rsXXXXXXXX) について sample number を増やし検討したところ、hetero/minor homo 保有者が有意に肝癌患者に多いことが示された (表)。

	肝癌患者 (n=26)	非肝癌患者 (n=58)
major homo	17(65.3%)	51(87.9%)
minor homo	3(11.5%)	1(1.7%)
hetero	6(23.0%)	6(10.3%)

$p = 0.0150$   
(chi - square test)

ついで hetero/minor homo 形質の持つ意義を検討する目的で、real time PCR 法により RNA 発現量を測定し、major homo 形質と比較し発現の低下を確認した。ただし発現の消失はみとめられなかった。

一方のアプローチとして、ChIP on chip アッセイにより、HCC 発症患者と未発症患者における損傷遺伝子をスクリーニングしたところ、接着分子、転写因子および血管新生因子などをはじめとする以下の遺伝子が損傷を受けることが明らかとなった。

#### Adhesion molecules and related molecules

- NM\_016279: cadherin 9, type 2
- NM\_014459: protocadherin 17
- NM\_033056: protocadherin 15
- NM\_001797: cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)
- NM\_001257: cadherin 13, H-cadherin (heart)
- NM\_181501: integrin, alpha 1
- NM\_004438: EphA4
- NM\_001002264: epithelial stromal

interaction 1

NM\_012302: latrophilin 2

### Transcription factors

NM\_002051: GATA binding protein 3 (GATA3)

NM\_012153: ets homologous factor (EHF)

NM\_002699: POU domain, class 3, transcription factor 1 (POU3F1)

NM\_012182: forkhead box B1 (FOXB1)

NM\_005853: iroquois homeobox protein 5 (IRX5)

NM\_152629: GLIS family zinc finger 3 (GLIS3)

NM\_203394: E2F transcription factor 7 (E2F7)

NM\_152573: RAS and EF hand domain containing (RASEF)

NM\_025184: EF-hand domain (C-terminal) containing 2 (EFHC2)

NM\_002126: hepatic leukemia factor (HLF)

NM\_014707: histone deacetylase 9 (HDAC9)

NM\_002417: Ki-67 (MKI67)

### Soluble factors and angiogenic factors

NM\_001147: angiopoietin 2 (ANGPT2)

NM\_178127: angiopoietin-like 5 (ANGPTL5)

NM\_001704: brain-specific angiogenesis inhibitor 3 (BAI3)

NM\_007191: WNT inhibitory factor 1 (WIF1)

NM\_002187: interleukin 12B (IL12B)

NM\_170735: brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

### Signal transducers and modifiers

NM\_031305: Rho GTPase activating protein 24

NM\_001332: catenin delta 2 (CTNND2)

NM\_145203: casein kinase 1, alpha 1-like

NM\_006823: protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha

NM\_018249: CDK5 regulatory subunit

associated protein 2

NM\_198399: cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21 kD (ARPP-21)

NM\_178815: ADP-ribosylation factor-like 8 (ARL8)

さらに肝の ROS 産生増加によって肝炎・肝癌を自然発症する LEC ラットに ROS 産生抑制剤 (ICL-670) を投与し治療実験を行ったところ、ICL-670 を 20mg/kg および 30mg/kg 投与で肝炎の鎮静化が得られることが明らかとなった(図 2,3)。

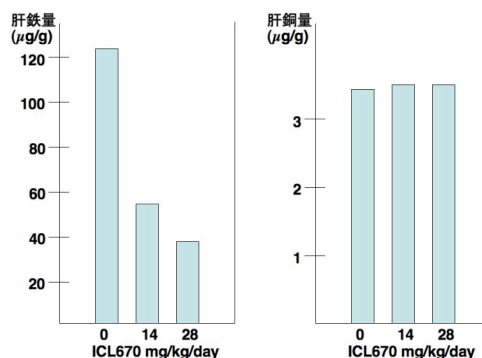


図 2. ROS 産生抑制剤による肝鉄量の変化

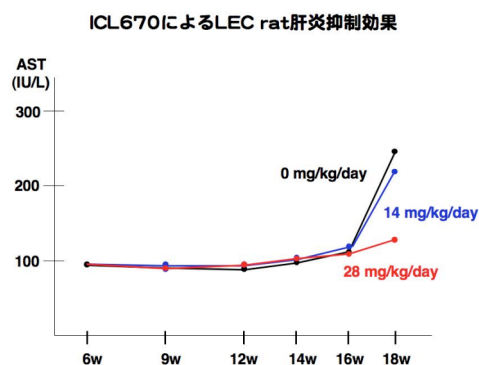


図 3. ROS 産生抑制剤による肝炎鎮静効果

これらの結果は Mutyh 発現異常により各種の遺伝子損傷が惹起され発癌にかかわることを示唆し、易発癌者の囲い込みならびに

Mutyh 発現是正による発癌抑制治療の可能性そして ROS 産生抑制剤による発癌抑制治療の可能性を示したものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Sato Y., Kato J., Kobune M., Miyaniishi K., et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. Nature biotechnology 26 (4), 431-442, 2008 査読あり。

② Sagawa T., Kato J., Kobune M., Miyaniishi K., et al. Treatment of hepatocellular carcinoma by AdAFPep/rep, AdAFPep/p53, and 5-fluorouracil in mice. Hepatology 48 (3), 828-840, 2008 査読あり。

③ Kato J., Miyaniishi K., Kobune M. et al. Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lower risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C. J Gastroenterology. 42,830-836, 2007 査読あり。

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 淳二 ( Kato Junji )

札幌医科大学医学部 教授

研究者番号：20244345

(2) 研究分担者

小船 雅義 ( Kobune Masayoshi )

札幌医科大学医学部 講師

研究者番号：90336389

宮西 浩嗣 ( Miyaniishi Koji )

札幌医科大学医学部 講師

研究者番号：60372819