

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22501059

研究課題名（和文） 肝臓癌発症メカニズムと薬物代謝酵素の遺伝子多型との関連

研究課題名（英文） Association between genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and factors of liver cancer

研究代表者

安原 一 (YASUHARA HAJIME)

昭和大学・医学部・名誉教授

研究者番号：70053999

研究成果の概要（和文）：肝臓癌発症と薬物代謝酵素 CYP2C19 の遺伝子変異との関連性を明らかにするため、同意を得た肝臓癌患者 21 名の肝組織、血液を用いて検討を行った。その結果、転移性肝臓癌患者で高頻度に認められる本遺伝子変異は、腫瘍周辺部位で癌病態により後天的に生じるのではなく、先天的な変異が肝臓癌発症に関与する可能性が示された。また、CYP2C19 酵素活性は遺伝子型にかかわらず全例で低下し、その程度は種々サイトカインの変動と関連した。今後、得られた結果の意義やメカニズムを解明し、癌病態における CYP2C19 の役割を明らかにすることにより、肝臓癌の治療や転移の予防に役立てることが重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study was conducted to clarify the association between drug-metabolizing enzyme CYP2C19 gene mutation and liver cancer susceptibility. 21 liver and blood samples were donated from Japanese liver cancer patients who received partial hepatectomy. The results indicated that the gene mutation found in high frequency in metastatic liver cancer patients occur congenitally rather than arise in peripheral tumor site acquired by cancer condition. CYP2C19 activity decreased in all samples and the degree was associated with changes in several cytokines, but did not correlate with the genotype of the enzyme. For the prevention of metastasis and for the proper treatment of liver cancer, further studies elucidating the mechanisms and significance of the results obtained and clarifying the role of CYP2C19 in cancer patients are needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：臨床薬理

科研費の分科・細目：腫瘍学・がん疫学・予防

キーワード：CYP2C19、肝臓癌、遺伝子多型、サイトカイン、転移

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓癌は日本人で多く発症しているが、初期には特有の自覚症状はなく、また、確実かつ簡便な診断方法がないことから、早期発見

は困難であると考えられる。

これまで我々は、肝臓癌治療のために部分切除された肝組織の病理学的に正常な部分を用い、薬物代謝研究への利活用を検討して

きた。その過程で、薬物代謝酵素であるチトクローム P450 2C19 (CYP2C19) の活性が著しく低下することを見出した。CYP2C19 は遺伝子多型性を有しており、日本人の約 20% が変異遺伝子 (CYP2C19\*2、CYP2C19\*3) をホモでもつ poor metabolizer (PM) であることが知られているが、転移性肝臓癌患者では、PM を示す遺伝子型頻度が 31.8% であり、これまで報告されている日本人健康成人での頻度 (18.8%) に比べて高いことが示された。このことから、特に転移性肝臓癌と CYP2C19 の発現・変異に何らかの関連性があることが示唆された。

肝臓癌と CYP2C19 遺伝子多型との関連についてはこれまでも報告されているが、疫学的調査や末梢血リンパ球を試料とした遺伝子解析にとどまっている。これらは末梢血液と肝組織の DNA が同一の遺伝子多型を示すという前提のもとに行われているが、実際にこれを確認した報告はない。また、癌の肝臓への転移と CYP2C19 遺伝子多型との関連性は検討されていない。すなわち、転移性肝臓癌において、CYP2C19 遺伝子変異が先天的に生じているのか、あるいは病態に起因する何らかの要因によって後天的に生じているのかは不明である。

## 2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では肝臓癌発症と CYP2C19 酵素発現・変異との関連性およびその要因を明らかにすることを目的とし、下記の項目について検討した。

(1) 末梢血および肝臓癌病巣付近組織の CYP2C19 遺伝子多型を解析・比較し、遺伝子変異が先天的に起こっているのか、あるいは癌病態に起因して病巣付近の遺伝子修飾が行われているのかを明らかにする。

(2) 肝組織における CYP2C19 の mRNA 量、蛋白量および活性と遺伝子多型の関連性を検討し、CYP2C19 活性低下の原因を明らかにする。

(3) 癌病態において影響を受けることが予測される細胞内サイトカイン類の変動を検討し、CYP2C19 活性の調節および遺伝子修飾に関与する因子を明らかにする。

以上を検討し、得られた結果を総括して評価することにより、肝臓癌発症における CYP2C19 の関与および役割を考察し、原発性あるいは転移性肝臓癌の早期発見や安全かつ有効な抗癌剤治療に役立てることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、昭和大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会の審査・承認を得た後に行った。

### (1) 試料の入手および保存

肝臓および血液試料は、昭和大学医学部外科学(消化器一般外科)において肝部分切除術を受ける原発性あるいは転移性肝臓癌患者より、倫理的配慮を十分に行った所定の手続きを経て提供された。肝臓試料は病理医の判断の下、みかけ上正常と思われる明らかな癌病巣を含まない部分を使用した。また、同患者より血液約 1 mL の提供を受けた。これら試料は、使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

### (2) CYP2C19 遺伝子多型の解析

末梢血および肝組織より Qiamp DNA kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。野生型である CYP2C19\*1、変異型で日本人の CYP2C19 活性低下の原因とされている CYP2C19\*2 および CYP2C19\*3 は PCR-RFLP 法により判定した。一方、高い活性を示す変異型である CYP2C19\*17 は Taqman gene expression assay により real-time PCR を用いて検討した。

### (3) CYP2C19 酵素活性、蛋白量の測定

肝試料を用いて常法に従い、マイクロソーム画分を調製し、CYP2C19 の酵素源とした。21 例中 2 例 (No. 7, 20) はマイクロソーム画分の調製に必要な量の肝試料が得られず、酵素活性および蛋白量の測定は不可能であった。

CYP2C19 酵素活性は指標薬物として S-メフェニトインを用い、4' 位水酸化活性を測定した。代謝物の定量は高速液体クロマトグラフィーにより行った。

また、抗ヒト CYP2C19 抗体を用いて Western blot 法により、CYP2C19 蛋白量を測定した。

なお、コントロール活性および蛋白量はブールドヒト肝マイクロソーム画分 (BD Bioscience) を用い同様に検討した。

### (4) CYP2C19 mRNA 量の測定

肝組織より RNesay Mini (Qiagen) を用いて RNA を抽出し、Taqman 試薬を用いて real-time PCR 法により CYP2C19 mRNA 量を測定した。

ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用い、補正した。

### (5) サイトカイン量測定

肝臓試料より、Bio-Plex cell lysis kit (Bio-Rad) を用いてライセートを調製した。

27 種のサイトカイン (IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-BB, RANTES, TNF- $\alpha$ , VEGF) の含量は Bio-Plex Pro サイトカインアッセイキット (Bio-Rad) を用い、Bio-Plex Suspension Array System により測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 肝臓および血液試料

本研究に対し同意を得た 21 名の肝臓癌患者より肝臓および血液試料の提供を受けた。原発性肝臓癌 7 名（肝細胞癌 5 名、肝内胆管癌 2 名）、転移性肝臓癌 14 名（上行結腸癌 2 名、S 状結腸癌 4 名、直腸癌 7 名、肝門部胆管癌 1 名）であった（表 1）。

また、年齢は  $68.5 \pm 9.7$  歳で、男性 19 名、女性 2 名であった。

##### (2) 肝臓および血液で判定した CYP2C19 遺伝子型の比較

CYP2C19 の遺伝子型は、21 名の同一患者より得られた肝臓および血液の両試料で一致した（表 1）。このことから、肝臓癌患者の CYP2C19 遺伝子変異は、病態に起因する何らかの要因によって後天的に生じているのではなく、先天的なものであることが示された。このような検討を癌病巣付近および血液の両試料で確認したのは我々が初めてであり、得られた結果は、薬物代謝酵素である CYP2C19 の先天的な変異の肝臓癌発症に対する関連性を示唆するものと考えられる。

原疾患	遺伝子型		年齢	性別
	血液	肝臓		
1 肝細胞癌	*1/*1	*1/*1	62	M
2 肝細胞癌	*1/*1	*1/*1	77	M
3 肝内胆管癌	*1/*1	*1/*1	69	M
4 上行結腸癌肝転移	*1/*1	*1/*1	63	M
5 S状結腸癌肝転移	*1/*1	*1/*1	43	M
6 直腸癌	*1/*1	*1/*1	78	M
7 直腸癌	*1/*1	*1/*1	85	M
8 直腸癌	*1/*2	*1/*2	78	M
9 肝内胆管癌	*1/*2	*1/*2	55	M
10 直腸癌	*1/*2	*1/*2	69	M
11 直腸癌	*1/*2	*1/*2	68	M
12 肝門部胆管癌	*1/*2	*1/*2	73	M
13 肝細胞癌	*1/*3	*1/*3	69	M
14 肝細胞癌	*1/*3	*1/*3	70	M
15 上行結腸癌肝転移	*1/*3	*1/*3	63	M
16 S状結腸癌肝転移	*1/*3	*1/*3	76	F
17 直腸癌	*1/*3	*1/*3	53	F
18 肝細胞癌	*2/*2	*2/*2	80	M
19 S状結腸癌肝転移	*2/*2	*2/*2	67	M
20 S状結腸癌肝転移	*2/*3	*2/*3	75	M
21 直腸癌	*2/*3	*2/*3	65	M

表 1 患者背景および CYP2C19 遺伝子型

今回検討した 21 名の遺伝子型頻度は、変異のない \*1/\*1 が 33.3%、ヘテロで変異をもつ \*1/\*2 または \*1/\*3 は 47.6%、ホモで変異をもつ \*2/\*2 または \*2/\*3 は 19.1% であり、報告されている日本人健康成人のデータ（\*1/\*1:34.9%、\*1/\*2 または \*1/\*3:46.3%、\*2/\*2 または \*2/\*3:18.8%）と同様であった。一方、これら 21 名のうち、転移性肝臓癌患者 14 名では、\*1/\*1 が 28.6%、\*1/\*2 または \*1/\*3 が 50.0%、\*2/\*2 または \*2/\*3 が 21.4% であり、健康成人と比較すると著明な違いは認められなかったが、原発性肝臓癌患者 7 名

の各遺伝子型頻度（\*1/\*1:42.9%、\*1/\*2 または \*1/\*3:42.9%、\*2/\*2 または \*2/\*3:14.3%）と比較すると、ホモあるいはヘテロで変異を起こしている割合が高いことが示された。

これまでの我々の研究においては、転移性肝臓癌患者（22 名）で CYP2C19 の遺伝子変異が高頻度に認められることを明らかにしており、ホモで CYP2C19 の変異型を有する PM は 31.9% であったことを報告している。今回の結果により同頻度は 21.4% と健康成人と同様であったが、これは 14 名と少ない検討例数であったことが原因と考えられた。癌患者における CYP2C19 遺伝子の変異は胃癌、肺癌、食道癌などにおいても健康成人に比べ、頻度が高いことが報告されているが、我々の研究の結果から、原発性肝臓癌患者に比べ、転移性肝臓癌患者で本遺伝子の変異の割合が高いことが明らかにされたことは興味深い。今後、より多くの例数を用いて解析することが必要であると考えられる。

一方、CYP2C19 活性が高くなることが明らかにされている CYP2C19\*17 をホモあるいはヘテロで有する患者は今回の肝臓癌患者 21 例中には認められなかった。

##### (3) 肝臓癌患者における CYP2C19 酵素活性

CYP2C19 の指標である S-メフェニトイン 4' 位水酸化活性は、コントロール活性に比べ、測定が可能であった全例（19 例）で低値を示した（図 1）。原発性肝臓癌患者では、本活性は 7 例全てにおいてコントロールの 10% 以下であった。また、CYP2C19 \*1/\*1 を有する 6 例の活性は、いずれもコントロール活性の 15% 以下と低値を示した。

一方、ヘテロで変異を有する患者の中にはコントロールとほぼ同様の活性を示す例が認められた（sample No. 8, 10, 11, 16）。近年、CYP2C19 の高い活性を示す変異として CYP2C19\*17 が明らかにされているが、著明な活性低下のなかった 4 名に本変異は示されなかった。

以上の結果より、肝臓癌患者においては、遺伝子型と本酵素活性の関連性は認められなかった。

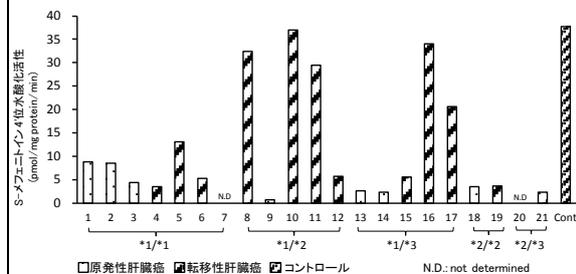


図 1 肝臓癌患者における CYP2C19 酵素活性

##### (4) CYP2C19 酵素活性と蛋白量および mRNA 量との関連性

CYP2C19 酵素活性が低値を示す原因を明らかにするため、蛋白量および mRNA 量を測定した。その結果、本活性と蛋白量あるいは mRNA 量の間に関連性は認められなかった(図2)。このことから、活性低下は、蛋白量や mRNA 量に関係なく生じていることが示された。

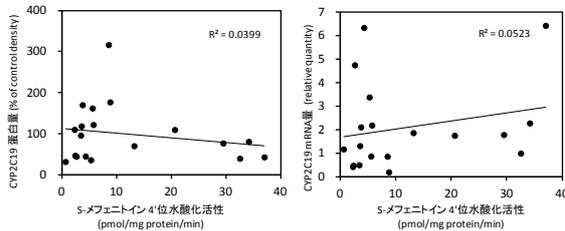


図2 肝臓癌患者における CYP2C19 酵素活性と蛋白量および mRNA 量との関連性

### (5) CYP2C19 酵素活性とサイトカイン発現量との関連性

炎症性サイトカインは癌病態により上昇し、これが酵素活性低下の原因となることが予測される。そこで、代表的な炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  と本活性の関連性を検討した結果、著明な相関性は認められなかった(図3)。

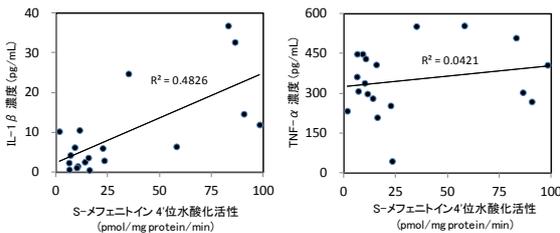


図3 肝臓癌患者における CYP2C19 酵素活性と炎症性サイトカイン量の関連性

また、各 CYP2C19 遺伝子型でこれらサイトカイン量の著明な違いは認められなかった(図4)。

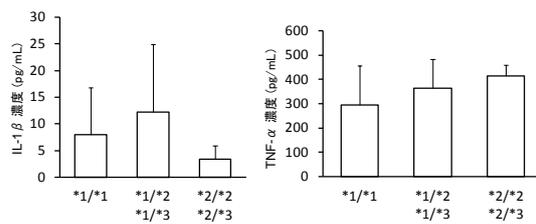


図4 肝臓癌患者における CYP2C19 遺伝子型と炎症性サイトカイン量の関係

癌病態においては IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインのみならず、免疫調節性サイトカイン(IL-2, IL-12, INF- $\gamma$ )、抗炎症性サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-10, IL-13)、多機能性サイトカイン(IL-6)、造血コロニー刺激因子(G-CSF, GM-CSF)、ケモカイン(IL-8, RANTES)など多くのサイトカインが変動すると考えられる。そこで 27 種類のサイトカイン量の変動をクラスタ分析により解析した

結果、5つの群に分類された(図5)。

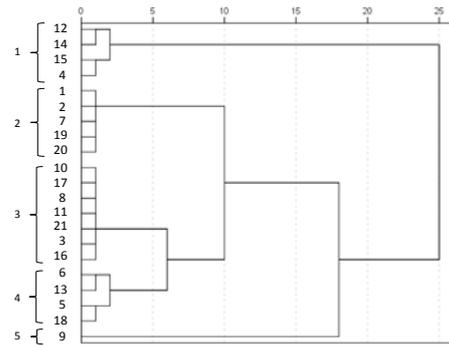


図5 肝臓癌患者における 27 種サイトカイン量のクラスタ解析

これらグループ間で CYP2C19 酵素活性を比較したところ、cluster No.5 に分類されたのは最も活性が低い患者 1 名のみ(活性 1.67 pmol/mg protein/min)であったため、その後の解析からは除外した。本活性の平均値は cluster No.3 で  $62.00 \pm 38.37$  pmol/mg protein/min と最も高値を示したのに対し、cluster No.1 では  $12.09 \pm 4.66$  pmol/mg protein/min と有意な低値を示した( $p < 0.05$ ) (図6)。

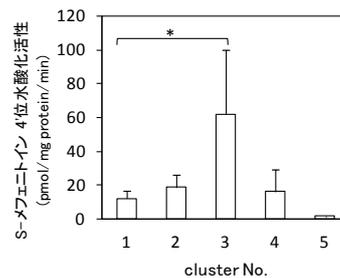


図6 肝臓癌患者における 27 種サイトカイン量のクラスタ分類による S-メフェニトイン 4位水酸化活性の比較

以上のように、種々サイトカイン量の変動の類似性により分類された群間で、CYP2C19 酵素活性が有意に異なることが示された。活性が高い cluster No.3 では健康成人と比較し、多種類のサイトカインが変動している一方、活性が低い cluster No.1 では逆に変動が小さい傾向が示された。このことから、CYP2C19 酵素活性を維持するためには、種々サイトカインの変動が必要であることが示唆された。さらに個々のサイトカイン量の発現を検討した結果、IL-1ra, FGFbasic, VEGF, MIP-1 $\alpha$  量は cluster No.1 に比べ cluster No.3 で有意に高値を示し、また G-CSF 量は逆に cluster No.1 と比較し cluster No.3 で有意に低値を示した。これらサイトカインの発現と CYP2C19 酵素活性に何らかの関連性があることが示されたが、その意義やメカニズムについては現段階では不明であり、今後、癌病態における CYP2C19 の役割を解明する 1 つの因子になると考える。

本研究により、肝臓癌患者において CYP2C19 遺伝子の変異は先天的に生じることが示されたが、肝臓癌発症や肝臓への癌転移の早期発見に応用するためには、転移のない患者の遺伝子型を検討するなど検討例数を増やし、更に詳細な解析が必要である。

今後、本研究で得られた結果、すなわち肝臓癌患者における CYP2C19 酵素活性低下や種々サイトカインの変動との関連性などの現象の意義やメカニズムを解明し、癌病態における CYP2C19 の役割を明らかにすることにより、肝臓癌の治療や転移の予防に役立てることが重要である。

また、肝臓癌患者で CYP2C19 酵素活性が遺伝子型に関わらず低下することが明らかにされたことは、本酵素で代謝される抗癌剤 (tamoxifen、cyclophosphamide など) を用いた化学療法を安全かつ適切に行うための重要な情報となると考える。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

① 西村有希、倉田知光、岩瀬万里子、安原 一、小林靖奈、山元俊憲、青木武士、村上雅彦、齋藤光次、小林真一

CYP2C19 遺伝子変異と肝臓癌発症リスクの関連

第 32 回日本臨床薬理学会年会

平成 23 年 12 月 2 日、浜松

② 西村有希、倉田知光、岩瀬万里子、小林靖奈、山元俊憲、安原 一

CYP2C19 遺伝子変異の発癌への関与

第 84 回日本薬理学会年会

平成 23 年 3 月 24 日、横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安原 一 (HAJIME YASUHARA)

昭和大学・医学部・名誉教授

研究者番号：70053999

### (2) 研究分担者

倉田 知光 (NORIMITSU KURATA)

昭和大学・教養部・教授

研究者番号：80231299

西村 有希 (YUKI NISHIMURA)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：40276572

岩瀬 万里子 (MARIKO IWASE)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：70424273