

令和 元年 9 月 3 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09388

研究課題名(和文)2型糖尿病合併非肝炎ウイルス発癌の宿主因子解析

研究課題名(英文) Association between host factor and hepatocellular carcinoma in non-viral patients with type 2 diabetes

研究代表者

是永 匡紹 (MASAAKI, KORENAGA)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：70420536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：倫理委員会に承認済みである「糖代謝異常に伴う肝疾患増悪因子に関する宿主因子と糖関連マーカーの解析」に沿って「糖代謝異常合併肝病態進行例(肝硬変・肝がん)」と「糖代謝異常を長期間合併しながら線維化・発癌進展を認めない症例」のsample収集を行った。非発癌330例と発癌59例の比較検討では、肝病態促進SNPであるPNPLA3と糖尿病関連SNPであるJAZF1遺伝子が独立して肝発癌に関与することがわかったが、これらの遺伝子はC型慢性肝疾患の肝発癌には影響を及ぼさないこと、また期間の観察でも両リスク因子を持っていても1例しか発がんせず、糖尿病合併発癌の予測マーカーには更なる探索が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、2型糖尿病合併症例から肝発癌・予後の実態が明らかとなった。また十分とは言えないものの、わが国でも増加中の2型糖尿病患者さんに対してPNPLA3、JAZF1という遺伝子を用いることで肝発癌危険群が抽出可能となることで、我が国の肝炎治療後・脂肪肝・2型糖尿病医療の均てん化に貢献でき、更なる遺伝子検索と礎となった。更に今後欧米化が顕著となり、糖代謝異常が増加すると予測される東アジア地域医療にも利用可能であると考えられ、多くの地域に貢献できると推測する

研究成果の概要(英文)：Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is an established independent risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC). We recruited 389 patients with T2DM. These patients were divided into two groups, T2DM patients with HCC (DM-HCC, n = 59) or those without HCC (DM-non-HCC, n = 330). The SNP rs738409 located in PNPLA3 was the greatest risk factor associated with HCC in non-viral hepatitis patients with T2DM. The frequency of the PNPLA3 G allele was significantly higher among DM-HCC individuals than DM-non-HCC individuals. Among individuals homozygous for the PNPLA3 G allele, the frequency of the JAZF1 rs864745 G allele was significantly higher among DM-HCC individuals than DM-non-HCC individuals. The influence of PNPLA3 and JAZF1 was independent of age, sex, and body mass index after multivariable logistic regression analysis. There were no HCC patients who had risk SNPs after 5 years observation. To explore HCC patients with DM, we used other markers such as M2BPGi, IL-34, Fibroscan, and MRI.

研究分野：消化器・肝臓病学

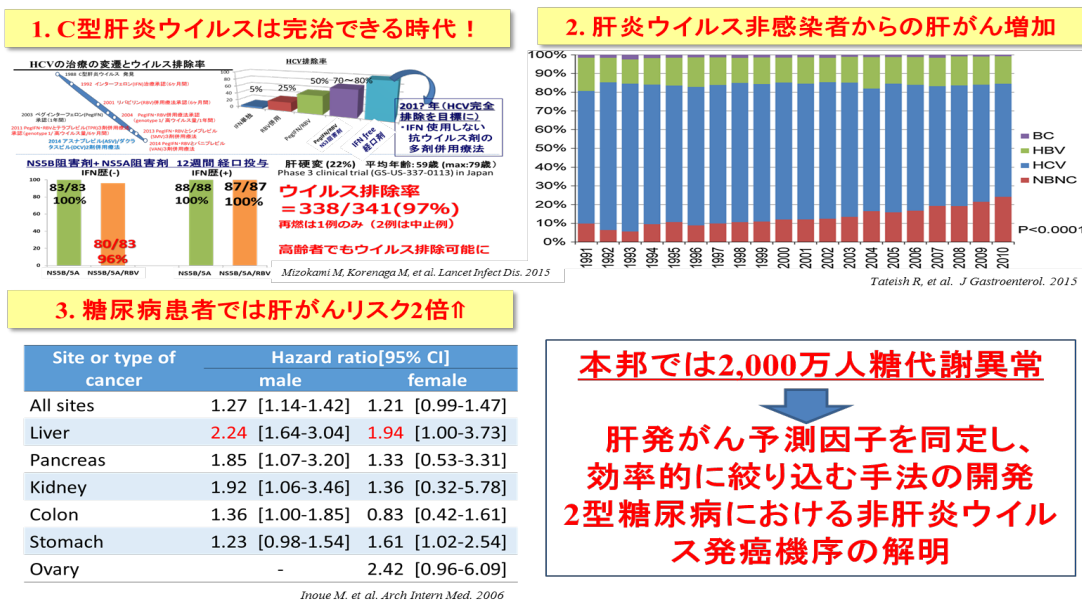
キーワード：2型糖尿病 肝細胞癌 PNPLA3 JAZF1

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(HCC)は本邦の悪性新生物による死因の第4位を占める疾患であり、その大半はC型肝炎ウイルス(HCV)が70%、約10%がB型肝炎ウイルス(HBV)感染に起因していた。近年、副作用が少ない抗肝炎ウイルス剤の内服が使用可能となり、2015年からは1日1錠12週間で99%ウイルス排除可能な薬剤が認可となった。(Mizokami M, Korenaga M et al. Lancet Infect Dis. 2015) HCVがcontrol可能となりHCV関連HCCは減少すると予想される一方で、非肝炎ウイルス感染者からの肝発癌も増加が確認された。この事は、HCV,HBVを中心とした肝発癌機構が変化している可能性がある。疫学的コホートからは、非肝炎ウイルス感染発癌者の多くが肥満、糖尿病といった代謝異常を合併していること、中でも2型糖尿病の死因として、肝炎ウイルス患者が含まれる検討であるが、癌死が第1位で臓器別でも肝臓が最も多く、発癌率も約2倍と増加する。したがってポストウイルス時代の肝発癌機構を糖代謝異常の観点から明らかにし、多くの糖尿病合併症例の中から肝病態進行例を抽出すること、またその治療戦略を確立することは急務である(図1)

図1: 2型糖尿病合併非肝炎ウイルス発癌の宿主因子解析



2. 研究の目的

経口抗ウイルス剤の開発により肝炎ウイルスのcontrolが容易となり、肝発癌は抑制されると考えられる一方、非肝炎ウイルス感染者からの肝発癌は増加している。その危険因子に2型糖尿病が報告されているが、わが国の糖代謝異常例は、肝炎ウイルス感染者の10倍の約2000万人と推測され、肝病態促進例を抽出することは重要な課題である。本研究では、2型糖尿病症例より発癌群と非進展群のゲノム(血液・組織)・血清を用いて、肝病態促進因子を同定しその有効性と機序を明らかにすることを目的とする

3. 研究の方法

DigTag 2 / Tagqman を用いて疾患関連 SNPs の解析

倫理委員会に承認済みである「糖代謝異常に伴う肝疾患増悪因子に關与する宿主因子と糖関連マーカーの解析」「肝疾患病態指標血清マーカーの開発と迅速、簡便かつ安価な測定法の実用化に関する研究」に沿い全国肝炎拠点病院のネットワークを行かした協力者研究協力者より本研究について書面と口頭で説明し、「糖代謝異常に伴った肝病態進行例」「糖代謝異常を長期間伴いながら肝線維化・肝発癌進展を認めない症例」sample 収集し、疾患関連 SNPs を測定し、その risk allele の頻度や合計数を比較検討すると、同時に肝線維化マーカー、肝硬変マーカーの糖鎖抗原マーカーを測定し、解析する。

次世代シーケンサーによるゲノム、エピゲノム解析

ゲノムワイド SNP 解析用装置 (Illumina, iScan system)、大規模シーケンシング用装置 (Life technologies, Ion Proton sequencer) を用いて解析を行う。また、比較的安価であり、かつ広く利用されているゲノムワイド SNP 解析用試薬である Illumina HumanOmniExpress v1.1 を使用する。ゲノム解析で差異を認めなかった場合には、肝組

織 DNA より、メチル化 DNA 結合タンパクを用いた メチル化 DNA シークエンスを行い、代謝異常に伴う変化を検討する。

4. 研究成果

「糖代謝異常に伴った肝病態進行例」「糖代謝異常を長期間伴いながら肝線維化・肝発癌進展を認めない症例」には、脂肪肝炎の線維化亢進に關与する *PNPLA3* とわが国での 2 型糖尿病関連遺伝子である *JAZF1* が抽出された。それらの遺伝子は、BMI、年齢、肝硬変の有無と独立して肝がん発症に關与していた。その一方で前向きに経過観察しえた 8 例の危険 SNPs からの発癌は認められず、更なる大規模な研究でその重要性を確認する必要がある(下図)。その他のゲノム、エピゲノム解析でも有意な data は得られていなかった。

Variables	DM-HCC vs DM-non-HCC	
	Adjusted OR [95%CI]	p value
PNPLA3[G]	2.33 [1.42-3.84]	0.0009
BMI	1.04 [0.94-1.15]	0.4930
Sex (male)	3.76 [1.72-8.22]	0.0009
Age	1.11 [1.06-1.17]	6.03E-06
Cirrhosis	22.32 [9.58-52]	6.12E-13

The association tests that only involved individuals homozygous for the *PNPLA3* G allele

Variables	DM-HCC vs DM-non-HCC	
	Adjusted OR [95%CI]	p value
JAZF1[G]	5.53 [2.11-14.52]	0.0005
BMI	1.02 [0.86-1.21]	0.8257
Sex (male)	7.15 [1.71-29.89]	0.0070
Age	1.09 [1.01-1.18]	0.0296
Cirrhosis	45.32 [8.94-229.72]	4.12E-06

またこれらの集団の肝発がんには線維化マーカーである M2BPGi のみならず、FibroScan, IL-34, YKL-40, EOBMRI の組み合わせが必須であることも報告した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

1. Yoshio S, Mano Y, Doi H, Shoji H, Shimagaki T, Sakamoto Y, Kawai H, Matsuda M, Mori T, Osawa Y, Korenaga M, Sugiyama M, Mizokami M, Mita E, Katayama K, Tanaka J, Kanto T Cytokine and chemokine signatures associated with hepatitis B surface antigen loss in hepatitis B patients. *JCI Insight*. 2018 Oct 18;3(20). pii: 122268. doi: 10.1172/jci.insight.122268
2. Lin YJ, Chang CL, Chen LC, Hu HH, Liu J, Korenaga M, Huang YH, Jen CL, Su CY, Nishida N, Sugiyama M, Lu SN, Wang LY, Yuan Y, L'Italien G, Yang HI, Mizokami M, Chen CJ, Lee MH A Glycomarker for Short-term Prediction of Hepatocellular Carcinoma: A Longitudinal Study With Serial Measurements. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018 Sep 20;9(9):183. doi: 10.1038/s41424-018-0050-3.
3. Wagatsuma T, Kuno A, Angata K, Tajiri K, Takahashi J, Korenaga M, Mizokami M, Narimatsu H. Highly Sensitive Glycan Profiling of Hepatitis B Viral Particles and a Simple Method for Dane Particle Enrichment. *Anal Chem*. 2018 Sep 4;90(17):10196-10203. doi: 10.1021/acs.analchem.8b01030.
4. Tamori A, Abiru S, Enomoto H, Kioka K, Korenaga M, Tani J, Enomoto M, Sugiyama M, Masaki T, Kawada N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Mizokami M. Low incidence of hepatitis B virus reactivation and subsequent hepatitis in patients with chronic hepatitis C receiving direct-acting antiviral therapy. *J*

Viral Hepat. 2018 May;25(5):608-611. doi: 10.1111/jvh.12840.

5. Liu J, Hu HH, Lee MH, Korenaga M, Jen CL, Batrla-Utermann R, Lu SN, Wang LY, Mizokami M, Chen CJ, Yang HI. Serum Levels of M2BPGi as Short-Term Predictors of Hepatocellular Carcinoma in Untreated Chronic Hepatitis B Patients. *Sci Rep.* 2017 Oct 30;7(1):14352. doi: 10.1038/s41598-017-14747-5.
6. Masugi Y, Abe T, Tsujikawa H, Effendi K, Hashiguchi A, Abe M, Imai Y, Hino K, Hige S, Kawanaka M, Yamada G, Kage M, Korenaga M, Hiasa Y, Mizokami M, Sakamoto M. Active assessment of liver fibrosis reveals a nonlinear association with fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease. *ol Commun.* 2017 Nov 27;2(1):58-68. doi: 10.1002/hep4.1121.
7. Tamaki N, Kuno A, Matsuda A, Tsujikawa H, Yamazaki K, Yasui Y, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Korenaga M, Mizokami M, Kurosaki M, Sakamoto M, Narimatsu H, Izumi N. Wisteria Floribunda Agglutinin-Positive Sialylated Mucin 1 as a Marker of Progenitor/Biliary Features in Hepatocellular Carcinoma. *Sci Rep.* 2017 Mar 21;7(1):244. doi: 10.1038/s41598-017-00357-8.
8. Kumagai E, Mano Y, Yoshio S, Shoji H, Sugiyama M, Korenaga M, Ishida T, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Kawaguchi T, Torimura T, Nozaki Y, Watanabe S, Mizokami M, Kanto T. Serum YKL-40 as a marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2016 Oct 14;6:35282. doi: 10.1038/srep35282.
9. Yamagiwa Y, Asano M, Kawasaki Y, Korenaga M, Murata K, Kanto T, Mizokami M, Masaki N. Pretreatment serum levels of interferon-gamma-inducible protein-10 are associated with virologic response to telaprevir-based therapy. *Cytokine.* 2016 Dec;88:29-36. doi: 10.1016/j.cyto.2016.07.004
10. Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Kumagai E, Sugiyama M, Korenaga M, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aikata H, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Nozaki Y, Kawaguchi T, Torimura T, Abe M, Hiasa Y, Fukai M, Kamiyama T, Taketomi A, Mizokami M, Kanto T. Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Sci Rep.* 2016 Jul 1;6:28814. doi: 10.1038/srep28814.
11. Tamada T, Korenaga M, Yamamoto A, Higaki A, Kanki A, Nishina S, Hino K, Ito K. Assessment of clinical and MRI features of de novo hypervascular HCC using gadoxetic acid-enhanced MRI. *Hepatol Res.* 2016 May 10. doi: 10.1111/hepr.12742.
12. Nishida N, Ohashi J, Khor SS, Sugiyama M, Tsuchiura T, Sawai H, Hino K, Honda M, Kaneko S, Yatsushashi H, Yokosuka O, Koike K, Kurosaki M, Izumi N, Korenaga M, Kang JH, Tanaka E, Taketomi A, Eguchi Y, Sakamoto N, Yamamoto K, Tamori A, Sakaida I, Hige S, Itoh Y, Mochida S, Mita E, Takikawa Y, Ide T, Hiasa Y, Kojima H, Yamamoto K, Nakamura M, Saji H,

- Sasazuki T, Kanto T, Tokunaga K, Mizokami M. Understanding of HLA-conferred susceptibility to chronic hepatitis B infection requires HLA genotyping-based association analysis. *Sci Rep*. 2016 Apr 19;6:24767. doi: 10.1038/srep24767.
13. Kumagai E, Korenaga K, Korenaga M(corresponding Author), Imamura M, Ueyama M, Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Kanto T, Mizokami M, Watanabe S. Appropriate use of virtual touch quantification and FibroScan® M and XL probes according to the skin capsular distance. *J Gastroenterol*. 2016 May;51(5):496-505. doi: 10.1007/s00535-015-1127-3.
 14. Ueyama M, Nishida N, Korenaga M (corresponding Author), Korenaga K, Kumagai E, Yanai H, Adachi H, Katsuyama H, Moriyama S, Hamasaki H, Sako A, Sugiyama M, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Kawaguchi T, Torimura T, Hyogo H, Aikata H, Ito K, Sumida Y, Kanazawa A, Watada H, Okamoto K, Honda K, Kon K, Kanto T, Mizokami M, Watanabe S. The impact of PNPLA3 and JAZF1 on hepatocellular carcinoma in non-viral hepatitis patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol*. 2015 in press *J Gastroenterol*. 2016 Apr;51(4):370-9. doi: 10.1007/s00535-015-1116-6.
 15. 是永匡紹, 考藤達哉 肝臓の“硬さ”を診療に生かす 血液検査による肝臓の硬さの評価～M2BPGiと新規血清マーカー～ **肝臓クリニカルアップデート** 4(2):147～152. 2018
 16. 是永匡紹, 溝上雅史 消化器疾患の最新医療 非侵襲的肝線維化診断 肝線維化の血清診断 **先端医療シリーズ** 49 201-205. 2018
 17. 是永圭子、澤部 祥子, 呉屋 薫, 伊藤 里美, 金沢 あずさ, 是永 匡紹, 溝上 雅史 高度線維化 NASH のスクリーニングにおける FibroScan の有用性 *Rad Fan* 15(15):64-68. 2017
 18. 是永匡紹, 溝上雅史【臨床応用を見据えた肝線維化研究の新展開】診断 M2BPGi測定と肝線維化 **肝・胆・膵**. 74:55-63. 2017.
 19. 是永匡紹, 溝上雅史【臨床検査の最新情報】生化学検査 肝線維化マーカー 新規肝線維化マーカーM2BPGiの有効性 **臨床と研究** 93(8).1067-1073.2016.
 20. 是永匡紹, 是永圭子, 溝上雅史 新しい診断・薬の情報 慢性肝疾患におけるM2BPGiの有用性 **肝臓クリニカルアップデート** 2(1) .85-94. 2016.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Korenaga M et al The risk of Hepatocellular Carcinoma development after Sustained Virologic Response are similar between Japanese patients with HCV Genotype 1 Infection treated Ledipasvir/Sofosbuvir and Protease inhibitor with Peg-Interferon Plus Ribavirin AASLD 2018 第 69 回米国肝臓学会議 San Francisco. 2018.11.
2. 是永匡紹他 B 型、C 型ウイルス肝炎治療をまとめる DAA 治療早期発癌の特徴 IFN 治療との比較と DAA 治療前 EOBMRI の有効性 第 42 回日本肝臓学会東部会東京(品川) 2018.12.
3. Korenaga M et al Sustained virologic response by ledipasvir/sofosbuvir reduces the incidence of hepatocellular carcinoma in Japanese patients with HCV genotype 1 infection. - Comparison with Simeprevir with peginterferon plus ribavirin AASLD 2017 第 68 回米国肝臓学会議 Washington. 2017.11.
4. Korenaga M et al Sustained virologic response by ledipasvir/sofosbuvir reduces the incidence of hepatocellular carcinoma in Japanese patients with HCV

- genotype 1 infection. - Comparison with Simeprevir with peginterferon plus ribavirin The International Liver Congress™ 2017 Netherlands 2017.4.
5. 是永匡紹他 DAA 治療後早期発癌予測を目指した EOBMRI と CXCL12 の有用性 第 42 回 日本肝臓学会西部会 福岡 2017.11
 6. 是永匡紹他 レジパスビル/ソホスブビル配合剤による肝発癌抑制効果(中間報告) 第 53 回日本肝臓学会総会 広島 2017.5.
 7. 是永匡紹他 レジパスビル/ソホスブビル治療後発癌は予測可能か? 第 53 回日本肝臓学会総会 広島 2017.5.
 8. 是永匡紹他 Sofosbuvir レジメンにおける HBV 再活性化の実態 第 103 回 日本消化器病学会総会 新宿 2017.4.
 9. 是永匡紹他 M2BPGi を用いた DAA 治療予後予測と導入選択 第 103 回 日本消化器病学会総会 新宿 2017.4.
 10. Korenaga M, et al. Deferasirox prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis in a mouse model with inhibition of hepatic fibrosis and hepatocellular ballooning. AASLD 2016 第 67 回米国肝臓学会議 Boston, U.S.A. 2016 11.
 11. Korenaga M et al UTILITY OF MAC-2 BINDING PROTEIN GLYCOSYLATION ISOMER (M2BPGI) FOR ADVANCED FIBROSIS AND HEPATOCELLULAR CARCINOMA IN PATIENTS WITH NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE. The International Liver Congress™ 2016, Barcelona, Spain, 13-17 .2016.4.
 12. 是永匡紹他 nonSVR/HBV 再活性化/SVR 発癌の検討 第 4 1 回日本肝臓学会東部会 東京 2016.12.
 13. 是永匡紹他 Real world のレジパスビル・ソホスブビル 第 20 回日本肝臓学会大会・第 58 回日本消化器病学会大会. 神戸. 2016.11.
 14. 是永匡紹他 明日から役立つ肝臓病理 Viral Hepatitis SVR 後発癌を考慮した C 型慢性肝疾患の DAAs 治療前肝生検の重要性 第 52 回日本肝臓学会総会. 千葉. 2016 05.
 15. 是永匡紹他 HCV 排除可能時代の課題～再治療と SVR 後発癌予測～ 第 52 回日本肝臓学会総会. 千葉. 2016. 05
 - 16.

〔図書〕(計 1 件)

是永匡紹、「HBV ,HCV キャリアの指導 ,管理および院内感染対策事業 ,再活性化の対策」「今日の治療指針」2019 年版

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 無

6 . 研究組織

(1)研究代表者

是永 匡紹 (MASAAKI KORENAGA)

所属研究機関名: 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター

所属部局名: その他部局等

職名: その他

研究者番号: 70420536

(2)研究分担者

西田 奈央 (NAO NISHIDA)

所属研究機関名: 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター

所属部局名: その他部局等

職名: その他

研究者番号:

50456109

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。