

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09159

研究課題名（和文）自然免疫因子を新規バイオマーカーとした非ウイルス性肝がんの早期診断法開発

研究課題名（英文）Development of method detecting early stage non-viral liver cancer using innate immune factors as new biomarker.

研究代表者

田邊 剛（Tanabe, Tsuyoshi）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80260678

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）：近年急増している非ウイルス性肝がんは、ハイ・リスク群が同定できず早期診断が困難であるため、ステージの進んだ段階で発見されるケースが多い。このため、早期診断を行うためのスクリーニング法の確立が求められている。本研究では、非ウイルス性肝がんの発症と自然免疫因子の遺伝子多型および血中microRNA発現量との関連を調べた。その結果、血中microRNAのうちmiR-150およびmiR-210の発現量の変化が統計的に有意に関連していた。これらの結果はより大きな集団で検証すべきである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、非ウイルス性肝がん症例および糖尿病症例より得られた血液検体を用いて自然免疫因子の遺伝子多型および血中microRNAの発現解析を行い、非ウイルス性肝がん症例で発現量が有意に変化するmicroRNAを明らかにした。今後、より大きな集団で検証することにより、本研究結果を早期診断のためのバイオマーカーとして応用することを目指す。ウイルス性肝がんと比較して、非ウイルス性肝がんのバイオマーカーに関する知見はまだまだ乏しいことから、本研究は学術的・社会的に意義があるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Non-viral hepatocellular carcinoma, which has been rapidly increasing in recent years, is often discovered at an advanced stage because high-risk groups cannot be identified and early diagnosis is difficult. Therefore, establishment of a screening method for early diagnosis is desired. In this study, we investigated the relationship between the development of non-viral hepatocellular carcinoma and the gene polymorphisms of innate immune factors and the expression levels of circulating microRNAs. As a result, changes in the expression levels of miR-150 and miR-210 among circulating microRNAs were associated with statistical significance. These results should be validated in larger populations.

研究分野：疫学、免疫学、生化学

キーワード：非ウイルス性肝がん

## 1. 研究開始当初の背景

近年 C 型肝炎ウイルスへの新規感染が減少しているのに加えて、インターフェロン治療により C 型肝炎ウイルスの排除が可能となっている。結果として、C 型肝炎ウイルスを原因とする肝癌が減少しているのに対し、非ウイルス性肝がんが急増しており、肝がん全体の約 30%を占めている。非ウイルス性肝がんはハイ・リスク群が同定できず早期診断が困難であるため、ステージの進んだ段階で発見されるケースが多い。このため、早期診断を行うためのスクリーニング法の確立が求められている。

筆者らはこれまで、自然免疫因子の中でも特に細胞質内で機能する NLR について、クローン病 (Bonen et al, Gastroenterol, 2003)、サルコイドーシス (Tanabe et al, BBA, 2006)、急性骨髄性白血病 (Tanabe et al, Int J Hematol, 2011) などの疾患の発症との関連や、その分子機序 (Tanabe et al, EMBO J, 2004) について報告してきた。肝がん発症の基盤である炎症と繊維化の機序には、セラミドなどの脂質や LPS に対する自然免疫系の活性化が深く関与している。近年、NOD Like Receptors (NLR) がインフラマソームと呼ばれる炎症誘導系を形成し、肥満に伴う心血管炎や肝脂肪変成を引き起こすことが報告された。また本邦でのインフラマソームの SNPs が免疫関連疾患のハイリスク群の同定に有用であることが報告されている。

最近、がんの早期診断を目的とした microRNA の探索が行われており、肝がん患者において血中濃度が変化する microRNA についても報告があるが、非ウイルス性肝がんに焦点をあてた研究は少ない。

## 2. 研究の目的

本研究では、自然免疫因子の遺伝子多型および血中 microRNA をバイオマーカーとした、非ウイルス性肝がんのハイリスク群の同定および早期診断法の開発を目指し、ウイルス性肝がんの発症と強く関連する自然免疫因子の遺伝子多型および血中 microRNA を明らかにすることを目的とした。具体的な目的は以下の通りである。

- (1) 自然免疫因子を中心とした日本人の免疫能に影響する遺伝子を主な標的として、非ウイルス性肝がんの発症と強く関連する遺伝子多型を明らかにする。
- (2) 非ウイルス性肝がん罹患群において末梢血で特異的に発現が変化する血中 microRNA を網羅的に解析し、非ウイルス性肝がん発症と強く関連して変化する microRNA を明らかにする。

## 3. 研究の方法

山口大学医学部附属病院において、IRB の承認と患者の同意を得て、非ウイルス性肝がん症例および糖尿病症例の血液検体を得た。非ウイルス性肝がん症例の選択基準は、造影 CT もしくは造影 MRI にて肝癌が認められる、HBs-Ag 陰性、HCV-Ab 陰性かつ HCV-RNA 検出感度以下、アルコール摂取量: エタノール換算で 60g/da 未満とした。糖尿病症例の選択基準は、膵癌の有無を確認する目的で造影 CT もしくは造影 MRI が施行され肝癌を認めない、糖尿病学会の基準にて糖尿病と診断されている、HCV-Ab 陰性かつ HCV-RNA 陰性、HBs-Ag 陰性とした。

- (1) 非ウイルス性肝がん症例および糖尿病症例の血液から DNA を抽出し、遺伝子多型解析に供した。候補遺伝子は自然免疫因子 NLRP3 および NLRP6 とした。NLRP3 については、発現量を変化させるという報告のある多型 1 つを選択した。NLRP6 については、アミノ酸置換を生じる多型 1 つを選択した。SNP 解読は、DNA を PCR で増幅して直接シーケンスにより解読した。
- (2) 非ウイルス性肝がん症例および糖尿病症例の血液検体から血清を分離し、血中 microRNA 解析に供した。非ウイルス性肝がんステージ I (糖尿病有、n=10)、ステージ II + III (糖

尿病有、n=11)、糖尿病(n=9)の各群のプール血清から Cell-free の低分子 RNA を精製し、179 種類の microRNA について qRT-PCR (Serum/Plasma Focus microRNA PCR panel, V4.M, Exiqon 203843) により定量を行った。糖尿病群に比較して非ウイルス性肝がんステージ I 群あるいはステージ II + III 群で発現量が 2 倍以上差のある microRNA は 27 種類であった。このうち、Ct 値が 35 未満である 13 種類の microRNA について、個別血清計 47 検体を用いた解析を行った。血液検体より Cell-free の低分子 RNA を精製し、qRT-PCR (miRCURY LNA miRNA PCR Assay, Exiqon 339306) により microRNA を定量した。miRNA 発現解析は相対定量法 (Ct method) にて行い、Dunnett の方法を用いて糖尿病群を対照として有意性の検定を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) 遺伝子多型解析については、研究期間中に目標症例数に達しなかったために各群のアレル頻度についての統計解析を行っていない。今後症例が集まり次第、統計解析を行う予定である。
- (2) 非ウイルス性肝がん 38 例と糖尿病症例 9 例について 13 種類の microRNA の血中発現量を解析した。そのうち miR-150 については、対照群である糖尿病症例  $0.55 \pm 0.25$  に対し、非ウイルス性肝がんステージ I で  $1.3 \pm 0.24$  ( $p=0.076$ )、ステージ II で  $1.04 \pm 0.86$  ( $p=0.57$ )、ステージ III で  $1.72 \pm 0.81$  ( $p=0.0067$ )、ステージ IV で  $1.60 \pm 0.62$  ( $p=0.081$ ) だった。有意水準  $p=0.05$  として、ステージ III で有意な高値を認め、ステージ I でも高い傾向を認めた。miR-210 については、対照群である糖尿病症例  $2.63 \pm 0.18$  に対し、非ウイルス性肝がんステージ I で  $2.48 \pm 0.17$  ( $p=0.984$ )、ステージ II で  $2.10 \pm 0.20$  ( $p=0.56$ )、ステージ III で  $1.88 \pm 0.27$  ( $p=0.160$ )、ステージ IV で  $1.12 \pm 0.79$  ( $p=0.011$ ) だった。有意水準  $p=0.05$  として、ステージ IV で有意な高値を認めた。
- (3) 以上のように、本研究では、非ウイルス性肝がん症例における血中 microRNA について、糖尿病症例に対し、miR-150 および miR-210 で発現量が有意に変化することを示した。このうち、miR-210 については、有意な変化を示したのはステージ IV の症例のみであった。一方、miR-150 については、ステージ III の症例で有意な変化を示し、またステージ I においても糖尿病症例に対して変化する傾向がみられたことから、非ウイルス性肝がんの早期診断マーカーとして有用である可能性があり、今後症例数を増やしさらに検証を行う必要がある。

#### <引用文献>

- 1) Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nuñez G. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology*, 24:140-6, 2003.
- 2) Tanabe T, Ishige I, Suzuki Y, Aita Y, Furukawa A, Ishige Y, Uchida K, Suzuki T, Takemura T, Ikushima S, Oritsu M, Yokoyama T, Fujimoto Y, Fukase K, Inohara N, Nunez G, Eishi Y. Sarcoidosis and NOD1 variation with impaired recognition of intracellular *Propionibacterium acnes*. *Biochim Biophys Acta*, 1762:794-801, 2006.
- 3) Tanabe T, Yamaguchi N, Matsuda K, Yamazaki K, Takahashi S, Tojo A, Onizuka M, Eishi Y, Akiyama H, Ishikawa J, Mori T, Hara M, Koike K, Kawa K, Kawase T, Morishima Y, Amano H, Kobayashi-Miura M, Kakamu T, Nakamura Y, Asano S, Fujita Y., Association analysis of the NOD2 gene with susceptibility to graft-versus-host disease in a Japanese population. *Int J Hematol*, 93:771-778, 2011.
- 4) Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, Ghosh P, Moran A, Predergast MM, Tromp G, Williams CJ, Inohara N, Núñez G. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J.*, 23:1587-97, 2004.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okazaki Fumiko, Wakiguchi Hiroyuki, Korenaga Yuno, Nakamura Tamaki, Yasudo Hiroki, Uchi Shohei, Yanai Ryoji, Asano Nobuyuki, Hoshii Yoshinobu, Tanabe Tsuyoshi, Izawa Kazushi, Honda Yoshitaka, Nishikomori Ryuta, Uchida Keisuke, Eishi Yoshinobu, Ohga Shouichi, Hasegawa Shunji	4. 巻 19
2. 論文標題 A novel mutation in early onset sarcoidosis/Blau syndrome: an association with Propionibacterium acnes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Rheumatology	6. 最初と最後の頁 18-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12969-021-00505-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hidekazu Takahashi, Naoko Okayama, Natsu Yamaguchi, Yuta Miyahara, Yasuo Morishima, Yutaka Suehiro, Takahiro Yamasaki, Koji Tamada, Satoshi Takahashi, Arinobu Tojo, Shigetaka Asano & Tsuyoshi Tanabe	4. 巻 7
2. 論文標題 Associations of interactions between NLRP3 SNPs and HLA mismatch with acute and extensive chronic graft-versus-host diseases	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-13506-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iida Michihisa, Takeda Shigeru, Nakashima Chiyo, Nishiyama Mitsuo, Watanabe Yusaku, Suzuki Nobuaki, Yoshino Shigefumi, Nakagami Yuki, Tanabe Tsuyoshi, Nagano Hiroaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Risk factors for non gastric cancer related death after gastrectomy in elderly patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 753 ~ 766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ags3.12588	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakagami Yuki, Hazama Shoichi, Suzuki Nobuaki, Yoshida Shin, Tomochika Shinobu, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Matsukuma Satoshi, Watanabe Yusaku, Iida Michihisa, Tsunedomi Ryouichi, Takeda Shigeru, Fujita Tomonobu, Tanabe Tsuyoshi, Nagano Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 CD4 and FOXP3 as predictive markers for the recurrence of T3/T4a stage II colorectal cancer: applying a novel discrete Bayes decision rule	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-10181-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 奈津  (Yamaguchi Natsu)  (40450671)	山口大学・大学院医学系研究科・助教   (15501)	
研究分担者	高橋 秀和  (Takahashi Hidekazu)  (90450402)	山口大学・大学院医学系研究科・講師   (15501)	
研究分担者	中上 裕有樹  (Nakagami Yuki)  (30843304)	山口大学・大学院医学系研究科・助教   (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------