

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15964

研究課題名(和文) B型肝炎スクリーニング再構築に向けたmicroRNAによる発癌予測手法の確立

研究課題名(英文) Circular microRNA profiles as biomarkers for early stage hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis B virus

研究代表者

吉田 雄一 (Yoshida, Yuichi)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：70727685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス持続感染者における肝発癌の早期診断・発癌予測は困難である。そこで、マイクロアレイを用い、B型肝炎関連肝癌の早期診断に有用なバイオマーカーの候補となる末梢血中のmicroRNAを探索した。B型肝炎のため通院中に肝発癌を来した患者10人(発癌群)の肝発癌時の血清とマッチングさせた非発癌患者10人(対照群)の血清からmicroRNAを抽出し、2群間で有意な差異を認められた5種類のmicroRNA(miR-548aおよびmiR-1281, miR-4634, miR-4646-3p, miR-4659a)を早期診断のバイオマーカー候補として見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

B型肝炎関連肝癌の早期発癌に関連する5種類の血清miRNAを候補miRNAとして見出した。今後validationを行い臨床的にB型肝炎関連肝癌の早期段階での変動を確認できれば、早期肝癌の血清バイオマーカー実現への大きく近づくこととなる。本研究の成果はその基礎的な資料となりえる。また、本研究では多数のmiRNAの中からB型肝炎関連肝癌のドライバー変異たるTP53変異との関連が報告されているmiRNAが候補として抽出された。癌抑制遺伝子とmiRNAとの関係を示唆する結果であり、miRNAの発癌過程への作用を解明するうえで示唆に富む結果であった。

研究成果の概要(英文)：we identify circulating microRNAs (miRNAs) allowing identification of early stage HCC patients among Hepatitis B virus (HBV) carriers at low to high risk of hepatocarcinogenesis. We conducted a case-control study to estimate serum microRNA levels in hepatitis B surface-antigen(HBsAg)-positive patients with early-stage HCC for comparison with controls matched according to ethnicity, age, sex, presence or absence of hepatitis B e antigen, treatment with a nucleoside/nucleotide analogue, and presenting with clinical forms of HBV infection, including inactive carrier, chronic hepatitis, or cirrhosis. We recruited and obtained sera from 20 HBsAg-positive patients [HCC group and controls (n = 10 each)] and performed microarray analysis, which identified five candidate miRNAs (miR-548a, miR-1281, miR-4634, miR-4646-3p, and miR-4659a) exhibiting significantly different levels between the two groups.

研究分野：消化器内科学

キーワード：B型肝炎 肝癌 micro RNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

B型肝炎は肝癌の原因として高頻度であり、世界的にB型肝炎患者における肝発癌の予知、早期治療導入は大きな課題である。B型肝炎患者の臨床的指標を用いた肝発癌予測モデルが報告されているが、特にB型肝炎患者の大多数を占める肝障害のないHBe抗原陰性B型肝炎ウイルス(HBV)キャリアからの発癌予測は不十分である。B型肝炎関連肝癌スクリーニングの事前確率を高めるため、新たな肝発癌バイオマーカーの確立が必要とされている。

### 2. 研究の目的

本研究は、肝癌発生前の患者血清中のエクソソームに含まれるmiRNAやB型肝炎ウイルス遺伝子のintegrationを起源とするnon-coding RNAを検出し、B型肝炎関連肝癌の新規出現に前駆的な発現異常を見出し、将来のB型肝炎関連肝発癌バイオマーカーの探索を目的とした。

### 3. 研究の方法

以下の(1)(2)の課題に対して実験を行った。

#### (1) 肝発癌に関連したB型肝炎特異的キメラnon-coding RNAの測定

B型肝炎遺伝子のHBx領域と宿主トランスポゾン遺伝子Long interspersed nuclear element-1(LINE1)との特異的キメラnon-coding RNAであるHBx-LINE1遺伝子は肝発癌との関連を指摘されている。新規に開発したHBx-LINE1の特異的な測定系を用いることで、HBx-LINE1遺伝子を組み込んだ細胞上清中においてHBx-LINE1が検出されることが確認されている。この測定系を用いてB型肝炎関連肝癌患者の保存血清中のHBx-LINE1の検出を試みた。

#### (2) miRNA panelを用いたB型肝炎関連肝癌患者の血清でのcirculating miRNAの測定

肝発癌と各種のmiRNAとの関連が報告されており、circulating miRNAは発癌の血清マーカーとして期待されている。しかし、報告により発癌の候補miRNAが異なり、結論は一致していない。既報では癌以外の患者背景が十分調整されておらず、肝発癌に特異的なmiRNA検出の障害となっていると推定された。そこで、肝発癌患者B型肝炎患者と非肝発癌B型肝炎患者(対照)の各10人の年齢、性別、臨床病型、HBe抗原、核酸アナログ製剤投与の有無をマッチングさせたうえで、miRNAパネルのGeneChip miRNA 4.0 array(Affymetrix)を用いて、肝発癌時の血清miRNAを比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) B型肝炎関連肝癌患者血清におけるHBx-LINE1遺伝子の検出

予備実験として、HBx-LINE1融合遺伝子を発現させた細胞株の培養上清中からエクソソームを濃縮し、同RNAをreal-time PCR法で検出することにin vitroで成功した。しかし、肝癌患者に対する肝癌治療前の時点と肝癌細胞が破壊される肝動脈化学塞栓術後の時点の血清を検体として血清中のHBx-LINE1遺伝子測定したが、両群ともにHBx-LINE1は検出されなかった。測定条件を調整したものの有意なHBx-LINE1検出には至らず、HBx-LINE1発現肝癌細胞の発生頻度が少ない、または発現していても血清中で検出可能な濃度までには増加しないことが推定された。肝癌発生を予知する血清マーカーは、肝癌が画像検査で検出される前後に血清中に高率かつ容易に検出されることが求められ、現時点ではHBx-LINE1の肝発癌予測マーカーとしての実用化は難しいとの結論に達した。以後、B型肝炎関連肝癌のバイオマーカー候補となるmiRNAの検討に移行した。

#### (2) マイクロアレイ解析の対象患者のマッチング

2011年1月から2018年2月までに岩手医科大学附属病院肝臓内科外来に通院したHBs抗原陽性患者から、肝臓以外の他臓器の癌合併患者、HCV抗体陽性者、HIV抗体陽性者を除外した236人から対象とした。期間中に肝発癌を12人に認めた。非肝発癌患者の中から性別、年齢±5歳、臨床病型(HBVキャリア、慢性肝炎、肝硬変)、HBV genotype、HBe抗原の有無、核酸アナログ内服の有無をマッチさせた対照群を設定した。マッチング結果、20人のB型肝炎患者(肝発癌群10人、対照群10人)を設定した。対象患者の背景をTable 1に示す。Alpha fetoprotein、body mass index、肝腎コントラストの有無については、両群に差異を認めなかった。

#### (3) マイクロアレイ解析の結果

GeneChip miRNA 4.0 arrayを用いて、上記対象患者血清中の6599種類のncRNAが解析された。対照群と比較して肝発癌群の血清のmiRNAの発現が標準偏差の2倍以上の有意な変化を示したものを候補miRNAとした。最終的にmiR-548aおよびmiR-1281、miR-4634、miR-4646-3p、miR-4659aの発現の有意な変化を認めた( $p < 0.05$ )。miR-548a and miR-4646-3pの2種類は肝発癌群の血清でupregulateされ、残り3種類(miR-1281、miR-4634、and miR-4659a)はdownregulateされていた(Table 2)。

Table 1. Patient characteristics.

Variables	HCC group (n = 10)	Controls (n = 10)	p
Age [y]#	60 [41-77]	60 [45-77]	0.80
Male, n (%)	6 (60)	6 (60)	1.00
Clinical phenotypes, n			
Inactive carrier/CH/LC	1/ 5/ 4	1/ 5/ 4	1.00
HBeAg-positive, n (%)	1 (10)	1 (10)	1.00
HBV genotypes, n			
Genotype B/C/Undetermined	3/ 3/ 4	3/ 5/ 2	0.56
Antiviral therapy, n			
ETV/LAM+ADV/Free	8/ 1/ 1	8/ 1/ 1	1.00
Alpha-fetoprotein [ng/mL]#	3.2 [1.1-22.9]	2.2 [1.3-19.2]	0.78
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]#	23 [19-29]	23 [18-27]	0.41
Hepatorenal echo contrast, n (%)	1 (10)	1 (10)	1.00
Tumor size [mm]#	13 [7-40]	N/A	
Single tumor, n (%)	10 (100)	N/A	
BCLC stage 0 or A, n (%)	10 (100)	N/A	

# Presented as median and range.

ADV, adefovir dipivoxil; CH, chronic hepatitis; ETV, entecavir; LAM, lamivudine; LC, liver cirrhosis; N/A, not applicable.

Table 2. Candidate miRNAs identified by a microarray analysis.

Variables	Fold change	p
miR-548a    Upregulated	1.36	0.01
miR-1281   Downregulated	-1.69	0.03
miR-4634   Downregulated	-1.65	0.03
miR-4646-3p Upregulated	1.27	0.02
miR-4659a   Downregulated	-1.33	0.01

#### (4) B型肝炎関連肝癌の肝発癌早期に変動する miRNA と癌抑制遺伝子との関連について

B型肝炎患者における肝発癌早期のバイオマーカー候補 miRNA として特定された 5 種類の miRNA の中で、癌抑制遺伝子との関連が報告されているのは miR-1281 である。骨肉腫細胞のアポトーシス誘導において p53 と miR-1281 との関係が報告されている<sup>1)</sup>。TP53 は B 型肝炎関連肝癌のドライバー変異として報告されており、miR-1281 の潜在的な p53 に関連した作用により、肝癌細胞のアポトーシスと関連している可能性がある。他の 4 種類の miRNA と発癌との関連性については未解明であり、今後本研究の validation とともに、miRNA と発癌・がん抑制機序について検討を進める必要がある。

本研究は、岩手医学雑誌に accept され、現在 in press である。

#### <引用文献>

1) Jiang J, et al. Am J Cancer Res 8, 1764-1774, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miki Yonezawa, Yuichi Yoshida, Yasuhiro Takikawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Circular microRNA profiles as biomarkers for early stage hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis B virus: A pair-matched case-control study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 岩手医学雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） -	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----