

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07896

研究課題名（和文）糖脂質代謝異常にフォーカスした多層オミックス解析による糖尿病関連肝発癌機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of diabetes-related liver carcinogenesis through multilayer omics analysis focusing on abnormal glycolipid metabolism

研究代表者

相方 浩（AIKATA, HIROSHI）

広島大学・医系科学研究科（医）・専門研究員

研究者番号：30403512

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：近年、HBV、HCV感染のない非肝炎ウイルス性肝発癌患者が増加しているが、これらの患者の多くは、糖・脂質代謝異常をはじめとする生活習慣病を合併していることが判明している。本研究では、糖・脂質代謝異常に関連の深いメタボローム、リポドーム、そしてメタゲノム情報を追加して、これまでに蓄積された複数のオミックス情報を統合し、非肝炎ウイルス性肝発癌高リスク群の囲い込みに有用なバイオマーカー同定など、臨床応用に資する成果の創出を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における糖尿病、脂肪肝など生活習慣病を有している患者は、増加傾向にある。近年、これらの生活習慣病を背景とした脂肪性肝疾患のみならず、肝発癌の増加が社会問題となっている。糖尿病患者における肝発癌高リスクグループのスクリーニング法は未だ確立されていないが、本研究は、肝発癌機構の解明や非肝炎ウイルス性肝発癌高リスク群のスクリーニングに資することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the number of patients with non-hepatitis viral liver cancer who are not infected with HBV or HCV has been increasing, but many of these patients have been found to have lifestyle-related diseases such as abnormalities in glucose and lipid metabolism. In this study, we add metabolome, lipidome, and metagenomic information that are closely related to abnormalities in glucose and lipid metabolism, integrate multiple omics information accumulated to date, and identify high-risk groups for non-hepatitis viral hepatocarcinogenesis. The aim was to generate results that would contribute to clinical applications, such as the identification of useful biomarkers.

研究分野：肝臓内科

キーワード：肝発癌 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

近年、HBV、HCV 感染のない非肝炎ウイルス性肝癌患者が増加しているが、これらの患者の多くは、糖・脂質代謝異常をはじめとする生活習慣病を合併していることが判明している。一方、これらの患者における肝発癌機構は不明な点が多く、肝発癌高リスク症例を効率的に囲い込むスクリーニング法は確立されていない。

我々は、これらの非 B 非 C 型肝癌症例には、糖・脂質代謝異常を有する症例や、背景に非アルコール性脂肪肝/脂肪性肝炎 (NAFLD/NASH) などの生活習慣病を合併している症例が多いことを、報告してきた。また、ヒトゲノムに存在する一塩基多型 (SNP) についてゲノムワイド関連解析 (GWAS) を実施し、HCV 関連肝発癌のリスク因子となる遺伝子多型を報告した。さらに、国際がんゲノムコンソーシアムに参画して、がん種横断的全ゲノム解析プロジェクトにおける肝癌全ゲノムシーケンス (WGS) に関わった結果、癌になった後のゲノムは etiology による特徴を示さないことが明らかとなった。並行して参画した、非ウイルス性肝発癌機構の解明を目指すエピゲノム国際共同研究 (日仏米独豪) では、動物モデルおよび臨床検体を検討した結果、HCV 排除後 (SVR) にもエピゲノムと遺伝子発現の変化が持続して肝発癌のリスクとなり、同様の変化が NASH においても認められることを明らかにした。こうした自らの研究背景の傍らで、近年はオミックス計測技術および情報解析手法の進歩によって、単層情報を多層化して統合することで、疾患を含む生命現象・生体システムをより深く理解しようとする試みが、世の趨勢となってきた。生命活動である代謝の中間・最終産物 (メタボローム) を含めた多層オミックスからは、肝細胞や脂肪細胞における糖代謝機構の詳細が明らかにされた一方、宿主のみならず、腸管内に共生する微生物 (腸内細菌叢) の乱れが、肥満や糖尿病などの生活習慣病や、それらと関連する NAFLD/NASH にも関係することが示唆されており、メタゲノムの情報も一つの層として、多層化情報に統合する試みがなされている。このような背景の中、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

これまでのヒトゲノム、がんゲノム、エピゲノム、トランスクリプトの網羅的研究では、十分に明らかにすることができなかった非ウイルス性肝発癌機構について、本研究では、糖・脂質代謝異常に関連の深いメタボローム、リピドーム、そしてメタゲノム情報を追加して、これまでに蓄積された複数のオミックス情報を統合することで、その一端を明らかにすることを旨とし、非肝炎ウイルス性肝発癌高リスク群の囲い込みに有用なバイオマーカー同定など、臨床応用に資する成果の創出を旨とした。

## 3. 研究の方法

2 型糖尿病を有する症例について、糖尿病罹病期間、治療内容、肝線維化や脂肪肝の程度などの臨床情報を集積し、肝発癌の有無により、層別化した。また、これらの対象症例の糞便検体を収集して、DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて、順次、腸内細菌叢解析を進めた。具体的には、PCR 反応で 16S rRNA の標的配列を増幅し、次世代シーケンサーで塩基配列を決定した。可変領域の相同性を細菌データベースの参照配列に照らし、分類・同定を行い、組成比を評価した。さらに、血液検体を質量分析装置にかけて、メタボロミクス・リピドミクス解析を行った。

## 4. 研究成果

1) 非ウイルス性肝癌の割合は、増加傾向にあり、2021 年度は 66.3% まで増加した。臨床的背景の特徴として、C 型および B 型肝炎と比較し、高齢、男性、アルコール多飲者、生活習慣病合併患者が多く、糖尿病合併例は 55% であった。FIB-4 index は有意に低値である一方、肝予備能良好例が多かった。切除例における病理学的検討では、非アルコール性脂肪肝炎 15%、アルコール性肝障害 29%、Cryptogenic 56% であった。

2) 糖尿病合併肝癌症例、糖尿病非合併肝癌症例、肝癌非合併糖尿病症例をそれぞれ 20 例ずつ抽出し、糖尿病罹病期間、治療内容、肝線維化や脂肪肝の程度などの臨床情報を集積し、データクリーニングを行った。

3) 16SrRNA 解析とメタボロミクス・リピドミクス解析を行い、出力されたデータについて、まずはそれぞれ単層での解析を行い、群間比較を行った。まず、メタゲノムに関しては、想定した以上に個人間の差が大きく、糖尿病や肝癌の有無といった病態によって有意に異なると言える細菌叢は得られなかった。メタボロミクス・リピドミクス解析に関しては、糖尿病合併群、肝癌合併群において、脂肪酸あるいはトリグリセライドの一部に両群に共通するような動きが観察されたものの、いずれも軽微な変化であり、それぞれの群を特徴付けるような有意な違いとは言えなかった。このようなこともある程度想定されていたため、引き続き、主成分分析や階層・非階層クラスター分析など多変量解析の手法を用いて探索的な検討も行ったが、試行錯誤の末、現段階では各群を特徴付けるような結果を得ることはできなかった。

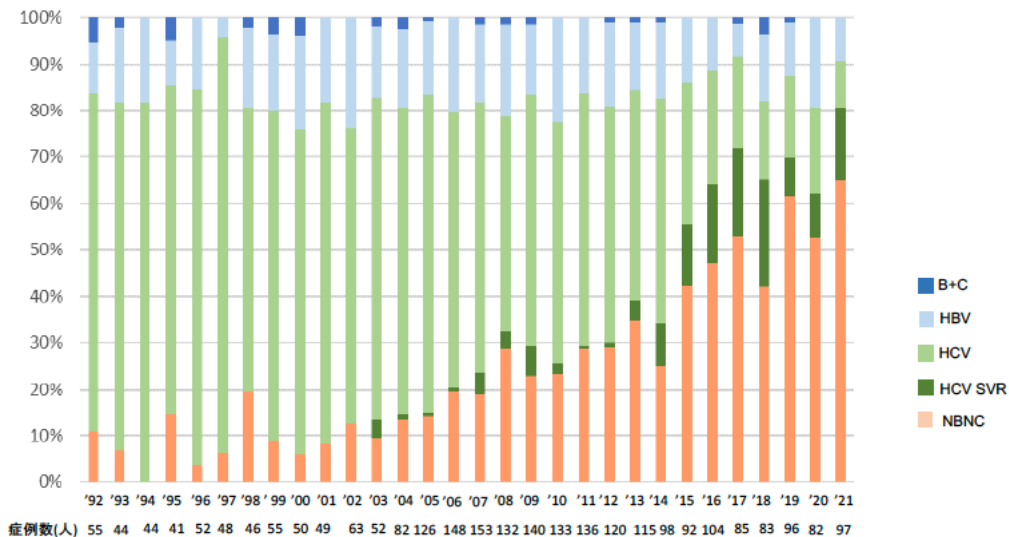
4) 最後に、これら単層のデータを同時に用いて、各層の相関関係を基本としたネットワーク解析による情報の統合・集約を試みた。現時点で、糖尿病患者における、発癌あるいは担癌状態に寄与する糖代謝・脂質代謝の異常の検出に有用と言える、トランスオミックスネットワークモデルの構築には至っていない。

5) 今回の一連の結果からは、個々人の単層データにはかなりのばらつきが存在していることが分かった。その上で、生物学的にも統計学的にも確からしい結果に近づくためには、測定技術自体の問題よりも、解析症例数を増やして検出力を上げることが必要だと考察された。一方で、データ解析の手法や解釈についても、まだまだ改善の余地がある。以上のように、いくつかの課題が明らかになった一方で、各単層解析では他施設からの報告とも合致するような傾向が確認されるなど、一定の成果は上がっているものと考えており、今後も本研究を継続していく予定である。検出力の増加によって、肝発癌高リスク群の囲い込みに有用なモデルができた後は、あらためて独立した症例群での検証を行う必要がある。

### 当院における初発肝癌 肝炎ウイルス別の推移

n=2621例 1992年1月～2021年12月

NBNC HCC  
症例数(人)



初発肝癌における臨床的背景 n=2621例

	NBNC n=717	HCV n=1456	HBV n=419	P value NBNC vs HCV	P value NBNC vs HBV
診断時年齢 (歳, range)	72 (21-95)	69 (28-86)	60 (31-82)	<0.001	<0.001
性別 (男性/女性)	580/137	978/478	343/76	<0.001	N.S
BMI (Kg/m <sup>2</sup> , range)	24.7 (13.9-44.1)	22.5 (13.4-38.3)	22.5 (14.4-35.8)	<0.001	<0.001
ALT (IU/L, range)	31(5-435)	38 (2-847)	38 (10-644)	<0.001	<0.001
Plt ( × 10 <sup>4</sup> /μl, range)	15.6 (2.7-75.7)	10.4 (1.1-54.5)	13.4 (1.9-39.5)	<0.001	<0.001
HBc抗体 (with)	266 (37.0%)	524 (37.1%)	419 (100%)	0.036	<0.001
アルコール多飲 (with)	439 (61.2%)	649 (44.5%)	235 (56.0%)	<0.001	0.041
II型糖尿病 (with)	376 (52.4%)	430 (29.5%)	82 (19.6%)	<0.001	<0.001
高血圧 (with)	392 (54.7%)	607 (41.7%)	94 (22.4%)	<0.001	<0.001
高脂血症 (with)	321 (44.8%)	329 (22.5%)	113 (26.8%)	<0.001	<0.001
FIB-4 index (range)	3.65 (0.25-32.41)	5.58 (0.71-39.67)	4.32 (0.36-38.69)	<0.001	<0.001
ALBI grade (1/2a/2b/3)	314/145/192/66	526/307/529/96	203/73/104/39	<0.001	<0.001
Child-Pugh grade (A/B/C)	535/143/39	1056/344/56	308/86/25	N.S	N.S
抗核抗体 (with)	254 (35.4%)	310 (21.9%)	81 (19.3%)	N.S	N.S
抗ミトコンドリア抗体 (with)	16 (2.2%)	25 (1.7%)	3 (0.7%)	N.S	N.S
AFP (ng/ml, range)	10.2 (0.5-1938000)	26.8 (0.5-7105000)	76.0(0.5-2770200)	<0.001	<0.001
DCP (mAU/ml, range)	252.3 (1.6-4673500)	57.8 (7.7-1160000)	136.2(10-741100)	<0.001	<0.001
HCC stage (I/II/III/IVa/IVb)	84/257/192/94/90	365/548/356/131/51	76/113/102/69/63	0.006	N.S
腫瘍数 (single/ multiple)	356/361	793/663	188/231	0.047	N.S
主腫瘍径 (mm, range)	54.8 (6.0-265)	25.0 (6.8-220)	32.0 (7.0-190)	<0.001	<0.001
門脈侵襲 (0/1/2/3/4)	569/16/31/42/59	1280/28/42/49/57	295/15/26/34/49	<0.001	N.S
肝外転移 (with)	105 (14.6%)	80 (5.9%)	72 (17.1%)	<0.001	N.S

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagaoki Y, Hyogo H, Ando Y, Kosaka Y, Uchikawa S, Nishida Y, Teraoka Y, Morio K, Fujino H, Ono A, Nakahara T, Murakami E, Yamauchi M, Okamoto W, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Miki D, Imamura M, Takahashi S, Chayama K, Aikata H.	4. 巻 21
2. 論文標題 Increasing incidence of non-HBV- and non-HCV-related hepatocellular carcinoma: single-institution 20-year study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-021-01884-5.	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 Johira Y, Nakahara T, Kinami T, Yamasaki S, Kosaka M, Shirane Y, Miura R, Murakami S, Yano S, Amioka K, Naruto K, Ando Y, Kosaka Y, Kodama K, Uchikawa S, Fujino H, Ono A, Murakami E, Okamoto W, Yamauchi M, Kawaoka T, Hayes CN, Tsuge M, Imamura M, Aikata H, Oka S	4. 巻 23
2. 論文標題 Impact and usefulness of the transition to the new MAFLD classification for non-B, non-C HCC: a retrospective cohort study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 23(1):222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-023-02851-y	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上片祐輔、中原隆志、相方浩
2. 発表標題 NBNC-HCCにおけるMetabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) とNAFLDの比較検討
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長沖祐子、相方 浩
2. 発表標題 非B非C型肝炎細胞癌における臨床的特徴とスクリーニングにおけるFIB4-indexの可能性について
3. 学会等名 第57回日本肝臓研究会
4. 発表年 2021年

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

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
---------	---------