

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20910

研究課題名（和文）慢性肝疾患におけるPersonalized肝発癌予測リスクモデルの開発

研究課題名（英文）Development of a Personalized Hepatocellular Carcinoma Risk Prediction Model for Chronic Liver Disease

研究代表者

金子 俊（kaneko, Shun）

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：60801959

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：核酸アナログ製剤治療中B型慢性肝疾患において、肝細胞癌の発生を予測する上で男性、高齢、血小板数低値に加え、肝硬度は最も高い識別力を示し、肝脂肪量ではなく肝硬度が有用な予測指標となることを明らかにした。基礎的検討では、B型肝炎ウイルス(HBV)関連肝細胞癌において、発癌機序の一つとされている宿主肝細胞にHBVゲノムが組込まれることについて、組込み頻度が2番目に多いKMT2B領域に注目し、健康者ヒトiPS細胞に対してゲノム編集を行い、HBVゲノム組み込みを再現した株を樹立した。肝細胞系譜への分化誘導した細胞を用いて解析し、KMT2B領域へのHBVゲノム組み込みの機能的意義を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果からB型慢性肝疾患の肝発癌においては、男性、年齢、血小板数、肝硬度といった宿主因子を主とした因子が抽出されること、既存のHBV検査項目では検知できない因子がありうることも示唆され、その社会的意義は大きいと考えられた。

また肝発癌機序として、宿主肝細胞にHBVゲノムが組込まれることがあるが、今回の基礎的検討によって、機能的意義が不明であったKMT2B-HBV integrationによる肝発癌機構解明を進めることにより、HBV肝発癌の病態解明、及び慢性肝疾患の進展を阻止しうる個人差を踏まえた精緻医療開発へ向けた学術・技術的な基盤形成に貢献すると考えられ、学術的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：A multivariate analysis with chronic hepatitis B (CHB) patients revealed that gender, older age, lower platelet counts at the baseline and liver stiffness measurement (LSM) levels significantly associated with hepatocellular carcinoma (HCC) development from our clinical database. The LSM was a most valuable for a stratification. It suggests that any time LSM but not CAP might yield better surveillance for CHB patients.

As basic analysis, we focused on that KMT2B is the second most frequent locus of HBV-DNA integration in HCC. To elucidate the oncogenic mechanism, we identified the HBV integrated sequence from the HCC specimen with HBV-KMT2B integration and reproduced the integration in human induced pluripotent stem cells. From analysis for the functional significance of HBV-KMT2B integration in HBV-associated HCC by differentiating them into hepatic lineages, HBV-KMT2B integration involved oncogenic processes of normal hepatocytes.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 B型肝炎ウイルス 慢性肝疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルス(HBV)は世界的に蔓延するウイルスであり、世界で約2億4千万人が持続感染し、肝硬変や肝癌の原因となっている。近年は核酸アナログ治療により、ウイルス複製の抑制が可能にはなったが、現在の治療ではウイルス複製の鋳型となるHBV covalently closed circular DNA (cccDNA)を完全排除し、ウイルスを体内から排除することは極めて困難である。また核酸アナログ製剤治療ではHBs抗原の消失率は3-4%であり、肝癌を完全に抑制することも困難である。それは血清HBV-DNAが検出感度以下になっても、cccDNAや宿主ゲノムにintegrationされたHBVゲノムが肝細胞に残存してしまうことがその原因である。

研究代表者はこれまでの独自の肝疾患データベースに基づく研究により、核酸アナログ治療中の肝癌因子は宿主因子(年齢、性別)、線維化関連因子(肝硬変、肝硬度、血小板、アルブミン、ビリルビン)、ウイルス因子(HBV-DNA、HBcAgなど)であること(Kaneko et al, J Gastroenterol Hepatol 2021)。また多施設共同研究として16施設で1年以上核酸アナログ内服治療を受けている1,183例を集計し、男性、年齢、血小板数低値と治療期間中のHBVDNAが検出されることが肝癌に関連する独立因子であったこと(Kaneko et al, Sci Rep 2020)、加えて、治療naïve B型慢性肝疾患905例における核酸アナログ製剤治療導入後の肝予備能の推移と肝癌に関する因子について検討を行い、核酸アナログ製剤治療は肝予備能を改善すること、肝癌因子として治療前の年齢、血小板、肝硬変、治療開始1年後のALBI score、AFPが有意な因子であることを示した。これらをリスク因子として含む既存のPAGE-B、mPAGE-B、aMAP、APA-B、REAL-BなどのB型慢性肝疾患リスクモデルに関してその精度を検証した結果、aMAPとREAL-B risk scoreは日本人集団を中心としたコホートにおいても高い精度で有用であることが示してきた(Kaneko et al. JMV 2023)。

核酸アナログ治療中のB型慢性肝疾患のみならず、ウイルス排除後のC型慢性肝疾患、非ウイルス性慢性肝疾患においても共通のリスク因子であることが報告されており、肝癌リスク因子を解明することが、慢性肝疾患全般における肝癌病態の理解へ繋がることが予測される。さらに、これらの臨床研究成果は肝癌サーベイランスへの応用が見込まれるが、さらに慢性肝疾患進展の阻止を目標とするのであれば、基礎研究アプローチと融合させる必要があると考えた。

所属する研究室独自の肝癌ゲノム情報 database に基づき、HBV integrationはKMT2B領域などに集積して多いことが示されている。そこで、研究協力者らはKMT2B領域にみられるHBV組込みを再現したヒトiPS細胞の樹立を進め、HBV integration(Int)再現株では、iPSレベルでは増殖性は不変であるが、肝細胞系譜に誘導されると増殖性の有意な亢進が認められること、さらに一部のChIPPCRではヒストンメチル化に異常を誘導することが示されている。これらの結果は、KMT2B領域へのHBV integrationがHCCの発生に根源的な役割を持つ可能性を示していた。

2. 研究の目的

研究代表者らは、これまでに確立してきたヒト induced pluripotent stem cells (iPS細胞)の肝前駆細胞誘導・肝細胞成熟化誘導および肝炎ウイルス感染機構研究の学術・技術基盤および独自に構築した2000例以上からなる慢性肝疾患患者のコホートデータベースに基づいて、基礎臨床の融合研究を企図して以下の目的を設定した。

(1)独自の慢性肝疾患患者のコホートデータベースからB型肝炎関連肝癌に関して有意な背景因子とバイオマーカーを探索する。(2)同時に並行して、HBVゲノムの宿主ゲノムへの組込み好発部位の一つであるKMT2Bに着目し、肝癌におけるKMT2Bの機能解析を進める。これらの知見を基盤に、(3)さらなる発展的な研究として、ヒト・ウイルスゲノムの統合解析による発がんリスク評価および精緻なHBV肝癌発癌予測モデルを開発する。

本研究の基礎的検討ではヒトiPS細胞の利用により、従来の肝癌細胞株を用いた解析では困難であったこれらの知見を得ることで、HBV肝癌の病態解明、及び慢性肝疾患の進展を阻止する個人差を踏まえた精緻医療開発へ向けた学術・技術的な基盤形成に貢献することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1)臨床情報データベースを用いた探索解析と検証解析

本研究は、申請者らのグループで独自に構築したコホートから抽出される有意因子に対して基礎的検討を行う基礎・臨床融合研究である。前述の如く、毎年定期的に行う追跡調査により更新されるデータベースから網羅的な因子の解析を行った。

2)KMT2B exon 領域のゲノム編集 iPS-HPC の樹立と解析

研究室独自の肝癌ゲノム情報 database に基づき、KMT2B の特定 exon 領域に HBV integration があると相互排他的にこれらの変異はないこと、HBV integration は KMT2B 領域などに集積して多いことが示されていた。そこで肝細胞癌自験例症例より、HBV integration があるゲノムを同定し、KMT2B 領域への組込みをゲノム編集によって再現した iPS 細胞を樹立した。作成した iPS 細胞を肝細胞系譜へ誘導し、iPS-HPC あるいは iPS-Hep として、形質を比較検討し、癌発生プロセスの一部を再現できるかについて、検証・解析した。独自に樹立した KMT2B 欠損 iPS 細胞株も利用して、KMT2B の分子標的をマルチオミクス解析によって網羅的に解析し、標的分子の同定を進めた。標的分子については、Gain-of-Function、Loss-of-function の双方で検証解析を行うこととした。

3)基礎的解析結果の臨床検体における検証

得られた結果に基づいて、コホートデータベースの血清サンプルを用いて、臨床検体における検証を行い、Proof-of-concept を得る。さらにはデータベースより抽出された臨床的な肝発癌リスク因子と合わせた画期的な肝発癌リスクモデルの精度をコホートデータベースで検証。さらにはウイルス排除後 C 型肝炎患者、脂肪性肝疾患も含めた前向き検証を行うこととした。

4 . 研究成果

1)臨床情報データベースを用いた探索解析と検証解析

臨床情報データベースを用いた探索解析として、B 型慢性肝疾患における肝細胞癌の解析を行った。当院にてエラストグラフィ(Fibroscan)を施行した 352 名の B 型肝炎陽性症例のうち、HBV キャリア(ASC)176 名と核酸アナログ製剤治療を受けている B 型慢性肝疾患症例(NA-CHB)176 名について HBV の動態と肝発癌リスク因子を調査した。

観察期間中央値 5.91 年の間に NA-CHB では 16 名が肝細胞癌を発症したが、ASC 群では発症しなかった。肝硬度測定(LSM)、肝脂肪量測定(CAP)については ASC では $4.9 \pm 2.7 \text{ kPa} / 236 \pm 59 \text{ dB/m}$ 、NA-CHB では $6.1 \pm 5.0 \text{ kPa} / 227 \pm 5.7 \text{ dB/m}$ 、肝細胞癌発症例では $12.2 \pm 11.1 \text{ kPa} / 260 \pm 49 \text{ dB/m}$ であった。B 型慢性肝疾患の肝発癌における多変量解析では、男性、高齢、血小板数低値、LSM 値が HCC 発症と有意に関連することが明らかになった。

さらに LSM (cut off 7.0kPa) は、肝細胞癌の発生を予測する上で最も高い識別力を示した。これら、男性、年齢、血小板数からなる既報の PAGE-B スコア(J. Hepatol 2016)で PAGE-B 中等度リスク群は 55.6%と多くなる傾向があったが、本検討で抽出された LSM 因子を用いると、中等度リスク群の中でもさらに層別化された (HR 5.203; 95%CI 1.308-20.8, $p=0.019$)。B 型慢性肝疾患の肝発癌においては肝脂肪量ではなく肝硬度が有用な肝発癌の予測指標となることが明らかとなった (JDDW2023)。

2)KMT2B exon 領域のゲノム編集 iPS-HPC の樹立と解析

基礎的検討においても、研究グループ独自の肝癌ゲノム情報に基づき、KMT2B の特定 exon 領域の HBV integration に注目した。ついで、ゲノム編集により標的遺伝子を改変したヒト iPS 細胞を用いて、発癌病態の一部を再現しうる新たな肝疾患病態解析モデル構築を進めた。標的領域へ HBV ゲノムを knock in することによって新規のヒト iPS 細胞株を樹立、肝細胞系譜に誘導して、前駆細胞レベルでの増殖能を比較検討した。標的領域としては前述のように、KMT2B 領域を用いた。

結果として、ゲノム編集によって KMT2B 領域へ HBV-DNA が挿入されたゲノムを再現したヒト iPS 細胞を樹立することに成功した。またその対照となる KMT2B ヘテロ欠損細胞、機能低下の可能性を検討する KMT2B ホモ欠損細胞をそれぞれ複数株樹立した。それらの iPS 細胞株は、そのまま肝細胞系譜へ誘導することが可能であり、また、ヒト iPS 細胞の未分化状態で解析した場合、特に遺伝子型によって、未分化性や増殖性には有意な差を認めなかった。

次に、肝細胞系譜に誘導し、かつ、増殖性を確認するために肝前駆細胞へ分化誘導して肝前駆細胞株 (iPS-HPC) を樹立した。その結果、KMT2B のホモ欠損のノックアウトでは、細胞増殖性が有意に低下したのに対して、KMT2B HBV knock in の融合型遺伝子型の iPS-HPC はコントロール株と比較して有意に増殖性が高くなっていた。同時にこの細胞株では細胞周期関連遺伝子群の発現が高く変化し、肝発癌病態の一部が再現されていることが示された。

これらの結果に基づいて、現在はその発癌病態の詳細を解明すべく、網羅的な遺伝子発現解析と網羅的な Long-read RNA シークエンス解析を行って、その詳細を検討している。継続する研究課題でさらに明らかにしてゆく予定である。

3)基礎的解析結果の臨床検体における検証

基礎的解析結果の臨床検体における Proof-of-concept 検証を継続的にすすめた。臨床検体を利用した Long-read RNA シークエンス解析によって、2)で同定した transcript variant との同一性を検討した。結果として、同一性のある配列の候補が同定されており、スタートアップに継続する次の研究課題にて、さらにその機能的意義を解明してゆく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kaneko Shun, Kurosaki Masayuki, Mashiba Toshie, Marusawa Hiroyuki, Kondo Masahiko, Kojima Yuji, Uchida Yasushi, Fujii Hideki, Izumi Namiki et al	4. 巻 95
2. 論文標題 Risk factors for hepatocellular carcinoma at baseline and 1 year after initiation of nucleos(t)ide analog therapy for chronic hepatitis B	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	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） 10.1002/jmv.28210	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 Takahama Shokichi, Yoshio Sachiyo, Masuta Yuji, Murakami Hiroto, Sakamori Ryotaro, Kaneko Shun, Honda Takashi, Murakawa Miyako, Sugiyama Masaya, Kurosaki Masayuki, Asahina Yasuhiro, Takehara Tetsuo, Appay Victor, Kanto Tatsuya, Yamamoto Takuya	4. 巻 14
2. 論文標題 Hepatitis B surface antigen reduction is associated with hepatitis B core-specific CD8+ T cell quality	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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） 10.3389/fimmu.2023.1257113	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 Kaneko Shun, Asahina Yasuhiro, Murakawa Miyako, Azuma Seishin, Inada Kento, Mochida Tomohiro, Watakabe Keiya, Shimizu Taro, Tsuchiya Jun, Miyoshi Masato, Kawai-Kitahata Fukiko, Nitta Sayuri, Takahashi Marie, Fujioka Tomoyuki, Kishino Mitsuhiro, Anzai Tatsuhiko, Kakinuma Sei, Nakagawa Mina, Okamoto Ryuichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Analysis of prognosis and background liver disease in non-advanced hepatocellular carcinoma in two decades	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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） 10.1371/journal.pone.0297882	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 Kaneko Shun, Asahina Yasuhiro, Murakawa Miyako, Ueyama Shunsuke, Maeyashiki Chiaki, Nakagawa Mina, Kakinuma Sei, Okamoto Ryuichi. et. al. Ochanomizu Liver Conference Study Group	4. 巻 54
2. 論文標題 Prognostic significance of C reactive protein in unresectable hepatocellular carcinoma treated with atezolizumab and bevacizumab	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 562 ~ 574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hepr.14001	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子 俊、朝比奈 靖浩、岡本 隆一
2. 発表標題 肝疾患診療の時間依存的解析と肝細胞癌の治療戦略
3. 学会等名 第44回肝臓学会東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shun Kaneko, Yasuhiro Asahina, Miyako Murakawa, Ryuichi Okamoto
2. 発表標題 Liver stiffness stratify the disease progression and hepatocellular carcinoma predictive risk score on chronic hepatitis B patients.
3. 学会等名 JDDW 2023
4. 発表年 2023年～2024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
---------	---------