

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590985

研究課題名(和文)フリーラジカルおよび酸化のDNA損傷修復遺伝子MUTYHを介した肝発癌機序の解明

研究課題名(英文)Analysis of relation between oxidative DNA repair genes,MUTYH and hepatocarcinogenesis

研究代表者

宮西 浩嗣 (Miyanishi, Koji)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：60372819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：C型慢性肝炎患者におけるrs3219487のminor homo形質保有者においてMUTYH発現が低下しており、同形質保有者において有意に肝発癌率が高いことを示した。また発現が低下する機序は同配列のpromoter領域への干渉であることも確認した。MUTYHホモ欠損マウスに鉄過剰食を与えると肝発癌率が有意に増加することも示した。治療の進歩により、HCV現感染者数は減少するが、既往感染者における肝発癌が今後問題である。本研究の結果はrs3219487 minor allele保有が肝発癌の危険因子であることを示唆し、早期発見あるいは抗酸化療法の治療介入が肝発癌阻止に有用である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In one of MutYH SNPs (s3219487), the frequency of minor homo or hetero allele carrier in the HCC group significantly higher than that in HCC group. In addition, the expression of MUTYH mRNA in minor homo allele tended to be lower than that in major homo allele. Multivariate Cox regression analysis indicated that Age and the minor allele of this SNP in MUTYH factors were significantly associated with hepatocarcinogenesis independently. These results indicated that the minor hetero allele of this SNP in MUTYH could be a significant risk factor of liver carcinogenesis from CHC and could be a predictive marker of HCC development in CHC patients.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝発癌危険因子 肝癌予防 酸化のDNA損傷 肝癌診断

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(HCC)の多くは慢性肝炎ならびに肝硬変を背景に発生するが、その発癌機序はいまだに明らかではない。申請者らはこれまでに科学研究費補助金(平成14-15年度基盤研究C「HCV導入肝細胞を用いたラジカル誘導性DNA障害機構の解明」、平成17年度特定領域研究C「慢性炎症および鉄過剰で誘導される肝発がん機構の解明とその防御」および平成20-22年度基盤研究C「C型肝炎における鉄代謝調節因子GDF15-ヘプシジン制御機構の解明とその治療応用」)の助成を受け検討を重ねてきた結果、C型慢性肝炎患者では肝での鉄代謝ペプチドであるヘプシジンの発現低下と十二指腸粘膜の鉄吸収関連分子の発現増加により鉄吸収が亢進することによって肝内鉄過剰沈着が生じており、慢性肝炎において細胞内の過剰遊離鉄が活性酸素種(ROS)の産生を亢進させ、肝細胞傷害や肝線維化を惹起する原因になることや、肝内に8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OH-dG)が増加することによりG:C→A:T型の遺伝子変異を誘発しHCCの原因となることを見出し、瀉血療法に鉄制限食事療法を併用する除鉄療法により肝炎を鎮静化でき、肝の線維化を改善させ、増加している8-OH-dG量を正常化できること(Cancer Res, 2001)、さらに実際に除鉄療法をC型慢性肝炎(F2/F3 grade)に約12年間行ってきた結果、HCCの発生率が年率0.9%(対照群では3.9%)に低下することを明らかにした(J.Gastroenterology,2007)。

その後、新たな肝線維化改善治療(Nat Biotechnol,2008)、HCC遺伝子治療(Hepatology,2008)を報告した。更に平成19-20年度基盤研究B「C型肝炎からの肝発がんに関わる酸化的DNA損傷修復遺伝子群の解析」において肝癌患者でMutyh SNP(rs3219487)のhetero/minor homo形質が有意に検出されること、ならびに右図に示すように、このminor allele保有者の肝発癌率はmajor homo形質保有者のそれに比べて有意に高いことを新たに見出した。DNAの酸化損傷に対して、MutYHは、DNA複製時にアデニンが誤って鋳型鎖に存在する8-oxoGに対して取り込まれた際に、このアデニン:8-oxoGの誤対合からアデニンを切除することで突然変異の生成を回避する。さらに、アデニンの酸化体2-ヒドロキシアデニン(2-OH-A)が鋳型鎖のグアニンに対して取り込まれた場合も、同じくMutYHが2-OG-A:G誤対合を認識して2-OH-Aを切除する。

従って、このDNA修復酵素活性の低下した個体では慢性炎症を背景とした発癌の危険がより高いものと予測されるが、肝発癌において遺伝子修復能の意義はこれまで検討されていない。

2. 研究の目的

1) rs3219487はintron SNPであるため、その差異がもたらす機能異常は不明である。preliminaryな結果ではあるが申請者らはMutYH遺伝子SNP(rs3219487)のhetero/minor homo形質保有者のMutYH mRNA発現がmajor homo形質保有者のそれと比較して低下していることを見出している。症例数を増やし、hetero/minor homo形質保有者のMutYH mRNA発現の低下を確認し、さらにMutYH活性自体の差違についても検討する。2) MutYH遺伝子の発現制御部位と転写因子を特定し、当該SNPのminor allele配列とそれらの関係を解析することによりこのSNPがMutYH発現異常を惹起する機序を明らかにする。3) MutYHノックアウト(KO)マウスを用い、鉄過剰食あるいは通常食を与え肝発癌の差違を検討することにより、肝発癌における過剰鉄によるラジカル負荷とMutYH機能の因果関係を明らかにする。併せて抗酸化療法の有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 酸化DNA損傷修復遺伝子(MutYH)のSNP検索

TaqMan法でmajor alleleをVIC, minor alleleをFAMで蛍光標識したTaqMan probeを用い、ABI PRISM 7700 sequence detection systemによってreal time PCRを施行しGenotyping Assaysを行う。

(2) SNP変異を導入したLUC発現ベクター系を用いたMutYHの発現解析

Long PCR(TAKARAのExTaqなどを使用)を用いて、エンハンサー・プロモーターからSNP rs3219487とその3'側のエクソンまでの領域をPCRで一括増幅する。PCR産物をTOPO pCR2.1にTA cloningし、pCR2.1-MYH promoter-major homo SNPおよびpCR2.1-MYH promoter-major-homo SNPを作成する。pGL4.10[luc2CP/Hygro]vectorのmultiple cloning regionにcloningし、pGL4-MYH promoter-major homo SNPおよびpGL4-MYH promoter-minor homo SNPを構築する。肝臓由来の細胞株HuH7ならびにHepG2を用いて、major homoとminor homoのMutYH発現解析をLuciferase dual reporter assayによって行う。

(3) MutYH KOマウスを用いた肝発癌機構の検討

鉄過剰食(鉄450mg/kg diet)群、鉄過剰食+鉄キレート剤投与(鉄450mg/kg diet + ICL-670 30mg/kg/day)群ならびに通常食群(コントロール)において約6か月間にわたり、腫瘍の発生を観察する。鉄過剰食による組織へのラジカル負荷、DNA損傷ならびに発癌へのMutYHの関与の有無と抗酸化剤の発癌抑制効果を証左する。

(4) MutYH KO マウス肝組織における鉄含量, DNA 損傷の評価

総鉄量は塩酸処理後, non-heme 鉄は 50%硫酸の沈殿分画を塩酸で可溶化後, それぞれ 2-2' bipyridyl および sodium sulfate にて発色させ 520 nm の吸光度より鉄量を測定する. 組織内 free 鉄量は, bleomycin 結合鉄を tiobarbiturate で発色させ 532 nm の吸光度で測定する. 肝組織 Ferritin 鉄は, ホモジネートの ferritin 濃度を ELISA 法で測定し, 標準蛋白の鉄含量より鉄量を換算する. DNA 損傷は高分子 DNA 5-10 μ g を nuclease P1 で消化し spin column で精製した後, HPLC で分画して electro chemical detector (ECD) によって 8-OHdG ピークを検出する. なお定量には, 8-OHdG および dG 標準品 (和光) を同様にロードして行い, dG との含有比率を算出する.

4. 研究成果

C 型慢性肝炎患者における rs3219487 の hetero/minor homo 形質保有者において MUTYH 発現が低下しており, 同形質保有者において有意に肝発癌率が major homo 形質保有者と比較して高いことを示し, 更にこれが他の患者背景因子との多変量解析により独立した肝発癌危険因子であることを明らかにした.

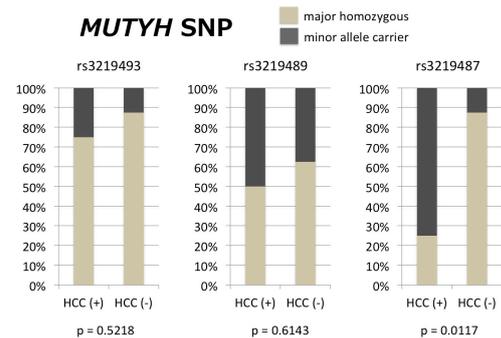
Cox Proportional Hazards Model (multivariate analysis)

	HR	95%CI	P value
Gender, M	1.13	0.71-2.70	0.7368
Age	1.12	1.07-1.19	< 0.0001
Platelet count	0.95	0.87-1.02	0.1392
Liver histology, F factor	1.57	1.01-2.51	0.0440
rs3219487, A carrier	2.52	1.22-5.05	0.0131

また rs3219487 minor 配列保有により MUTYH 発現が低下する機序は同配列の promoter 領域への干渉であることも確認した. なお次世代シーケンサー ION PGM を用いて MUTYH の他の SNP を解析し, 日本人においては rs3219493 と rs3219489 の minor allele 保有が一定頻度認められるものの, 肝発癌には関与しておらず, rs3219487 との間に連鎖

不平衡が存在しないことも確認した.

MUTYH が酸化ストレスに伴う肝発癌に關与することの証左として MUTYH ホモ欠損マウスおよびヘテロ欠損マウスに鉄過剰食を与え, C57BL/6J 雄マウスと比べて肝発癌率が有意に増加することも示した. C 型慢性肝炎ウイルスの排除治療の進歩により, HCV 現感染者数の低下が進むものと予測されるが, 既往感染者における肝発癌が今後問題である. 本研究の結果は rs3219487 minor allele 保有が肝発癌の危険因子であることを示唆し, 早期発見あるいは抗酸化療法の治療介入が肝発癌阻止に有用である可能性を示した.



5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Prevention of hepatocellular carcinoma: Focusing on antioxidant therapy.

Miyanishi K, Hoki T, Tanaka S, Kato J. World J Hepatol. 2015 Mar 27;7(3):593-9. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.593. 査読あり

② Increased duodenal iron absorption through up-regulation of divalent metal transporter 1 from enhancement of iron regulatory protein 1 activity in patients with nonalcoholic steatohepatitis.

Hoki T, Miyanishi K, Tanaka S, Takada K, Kawano Y, Sakurada A, Sato M, Kubo T, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Hepatology. 2015 Mar 7. doi: 10.1002/hep.27774. 査読あり

③ Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma.

Tanaka S, Miyanishi K, Kobune M, Kawano Y, Hoki T, Kubo T, Hayashi T, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kato J. J Gastroenterol. 2013 Nov;48(11):1249-58. doi: 10.1007/s00535-012-0739-0. 査読あり

④鉄代謝異常と肝細胞癌
宮西 浩嗣, 加藤 淳二
細胞 (1346-7557)46 巻 1 号 2013 Page12-14

[学会発表] (計 10 件)

①宮西浩嗣, 河野豊, 加藤淳二
酸化了的 DNA 傷害修復酵素 MUTYH の genotype
による肝発癌危険群の囲い込み
日本肝臓学会大会. 2014 年 10 月 23 日, 神戸国
際会議場(兵庫県神戸市)

宮西浩嗣, 小船雅義, 加藤淳二
②C 型慢性肝炎からの肝発癌における酸化了的
DNA 傷害修復能の関与について
日本鉄バイオサイエンス学会. 2014 年 9 月 6
日, 仙台国際センター(宮城県仙台市).

③宮西浩嗣, 保木寿文, 加藤淳二
鉄過剰を伴う慢性肝障害からの肝発癌にお
ける酸化了的 DNA 傷害修復能の関与
日本肝臓学会総会. 2014 年 5 月 29 日, ホテル
ニューオータニ(東京都, 千代田区)

④田中信悟, 宮西浩嗣, 河野豊, 保木寿文,
久保智洋, 高田弘一, 林毅, 佐藤勉, 佐藤康
史, 小船雅義, 瀧本理修, 加藤淳二.
非アルコール性脂肪肝炎からの発癌にお
ける酸化ストレスの関与についての検討.
日本肝臓学会大会. 2013 年 10 月 9-10 日. グ
ランドプリンスホテル新高輪(東京都, 品川
区)

⑤田中信悟, 宮西浩嗣, 河野豊, 林毅, 佐藤
勉, 佐藤康史, 小船雅義, 瀧本理修, 加藤淳
二. 非アルコール性脂肪肝炎からの発癌にお
ける酸化了的 DNA 傷害の関与についての検討.
日本内科学会講演会. 2013 年 4 月 12-14 日,
東京国際フォーラム(東京都, 千代田区)

⑥Kato J. Increased hepatic oxidative DNA
damage in patients with nonalcoholic
steatohepatitis who develop
hepatocellular carcinoma. Fifth Congress
of the International BioIron Society
(IBIS), Biennial World Meeting
(BioIron2013) : 2013 Apr 14-18 : London, UK

⑦宮西浩嗣, 田中信悟, 加藤淳二. C 型慢性
肝炎と非アルコール性脂肪肝炎における鉄
代謝異常の発生機序の検討.
日本消化器病学会総会. 2013 年 3 月 23, 城山
観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

⑧田中信悟, 宮西浩嗣, 加藤淳二. NASH にお
ける鉄代謝異常の機序と肝発癌危険因子の
検討.
日本肝臓学会東部会. 2012 年 12 月 6-7 日.
グランドプリンスホテル新高輪(東京都, 品
川区)

⑨宮西浩嗣, 小船雅義, 加藤淳二. C 型肝炎
からの肝発癌における酸化了的 DNA 損傷修復遺
伝子 SNP の関与.

日本消化器病学会大会・日本肝臓学会大会・
消化器外科学会大会 合同. 2012 年 10 月
10-13 日. 神戸国際展示場(兵庫県, 神戸市)

⑩宮西浩嗣, 田中信悟, 加藤淳二. NASH にお
ける鉄代謝異常の機序と肝発癌への関与の
検討.
日本微量元素学会. 2012 年 7 月 5-6 日. シェ
ーンバッハ サボア(東京都, 千代田区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮西 浩嗣 (Koji Miyanishi)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 60372819

(2) 研究分担者

加藤 淳二 (Junji Kato)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20244345

田中 信悟
札幌医科大学・医学部・研究員
研究者番号 : 60564024