

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461017

研究課題名(和文) 非B非C肝がんの新規危険因子同定：GWASとデータマイニングによる網羅的解析

研究課題名(英文) Identification of new risk factor for nonB, nonC hepatocellular carcinoma: Global analysis using GWAS and data-mining analysis

研究代表者

佐田 通夫 (Sata, Michio)

久留米大学・先端癌治療研究センター・教授

研究者番号：10162398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、B型およびC型肝炎ウイルスが関与しない肝がん(NBNC-HCC)の患者数が増加している。我々は、223名のNBNC-HCC患者と、人間ドックを受診した669名を対象とし、データマイニングとGWASによりNBNC-HCCに関わる危険因子を解析した。その結果、血清 GTP値、Brinkman index、血清アルブミン値が独立危険因子であることを明らかになった。また、patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) のvariant (I148M) がNBNC-HCC患者に高頻度に認められることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recently, the number of patients with hepatocellular carcinoma without infection of hepatitis B and C virus (NBNC-HCC) is increasing. We aimed to identify risk factor for NBNC-HCC by GWAS and data-mining analysis. Subjects are 223 NBNC-HCC patients and 669 healthy subjects. We demonstrated that serum level of gamma-GTP, Brinkman index, and serum level of albumin were independent risk factor for NBNC-HCC. We also found that variant (I148M) of patatin-like phospholipase domain containing 3 gene (PNPLA3) is frequently seen in patients with NBNC-HCC.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝臓がん 遺伝子異常 代謝異常 網羅的解析

## 1. 研究開始当初の背景

肝がんは、年間3万人以上が死亡する本邦の主要な死亡原因である。これまでの主な原因はC型とB型肝炎ウイルスによる肝癌が全体の80%を占めていた。我々は、1996年より九州地区の肝がんの成因につき多施設共同研究による年次調査を継続して行い、B型およびC型肝炎ウイルスが関与しない非B非C肝がん(NBNC-HCC)の患者数は近年増加傾向を認め、現在では全肝がんの約38%を占めている。NBNC-HCCの危険因子として、肥満、非アルコール性脂肪性肝障害、糖尿病などがこれまでに明らかとなっているが、未だ進行肝がんで見られ、予後が不良であることが少なくない。このため、NBNC-HCCに関与する危険因子の探索が必要である。

ゲノムワイド関連解析(GWAS)は一塩基多型(SNP)ジェノタイピングに基づき、疾患に関わる遺伝的変異を網羅的に探索する手法である。すでにB型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルスが起因する肝がんにおいてSNPが同定されている。本邦における肥満や糖尿病の有病率は高いが、それらの疾患における肝がん率は高くないことから、SNPがNBNC-HCCの発症に関与していることが推察される。ただし、生活習慣が関与する疾患では、同定された個々のSNPの影響が必ずしも強くない場合もあり、環境要因についても併せて検討する必要がある。

データマイニングは、データベースの中に潜在している規則性や相関関係を発見する「仮説発見型」統計学的手法である。本手法は、仮説を立て、一定条件を満たした対象者を用いて仮説を検証する従来の方法とは異なり、日常臨床において蓄積された大量のデータを網羅的に解析し、目的変数に関与する要因を同定する方法である。我々は、これまでに、生活習慣や代謝異常といった環境要因と肝がんの関連について一貫した研究を行っており、本手法を用いて、NBNC-HCCの病期進展に関与する因子を明らかにしてきた経験を有する。

GWASとデータマイニングの両手法を用いることで、遺伝的要因と環境要因の両側面から、既知の概念にとらわれずに危険因子を同定することが可能となるだけでなく、その解析結果はNBNC-HCCのスクリーニング法の開発と病態解析においても有用であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、NBNC-HCCの新規危険因子をGWASとデータマイニングを用いて同定することである。また、新規に同定された危険因子と肝がんの関係についても分子生物学的手法を用いてその病態を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) NBNC-HCC患者の遺伝子収集

NBNC-HCC患者を対象に十分なインフォームドコンセントを行い、同意の得られた患者より専用採血管を用いて末梢白血球より遺伝子を収集する(久留米大学 生命の倫理審査 承認番号 132)。

収集した遺伝子を用いて、GWASによりNBNC-HCCの発症に関わる遺伝子変異を解析する。GWASは、ゲノム全体に分布する約60万個のSNPをカバーするDNAチップ(Illumina社: HumanHap 610 - Quad BeadChip)を用いて解析する。候補SNPに対してインベンダー法により再現性を確認する。

### (2) データマイニングによるNBNC-HCCの環境要因の同定

1995年~2010年迄に臨床データを集積しえたNBNC-HCC223名をCase群として用いている。また、人間ドックを受診した176,886名のうち、HBs抗原陰性かつHCV抗体陰性でHCCを認めない被験者から交絡因子(年齢・性別)の影響をgenetic matching法によって補正し、マッチング変数の分布の違いが最小となるControl群を統計学的に設定する。

Case群とControl群の下記因子に対し、以下の2種類の解析を行う。Random Forest法によりCase群とControl群を判別するための変数の重要度を算出する。Decision-treeモデルを用いて、NBNC-HCCのプロファイルを同定する。得られた結果は、10-fold Cross-Validation Receiver Operating Characteristic解析により検証する。

## 4. 研究成果

### (1) NBNC-HCC患者の遺伝子異常

DNAチップによる解析の結果、22番染色体近傍に存在するPNPLA3のvariant(I148M)がNBNC-HCC患者に高頻度に認められることが明らかとなった。

### (2) データマイニングによるNBNC-HCCの環境要因の同定

223名のNBNC-HCC患者(Case)と、176,886名からgenetic matchingにより選出された669名(Control)を対象とした(表1)。

Case: Control	propensity	genetic
1:1	0.0247	0.3173
1:2	0.4660	0.6834
1:3	0.2330	0.7857
1:4	0.1177	0.0460
1:5	0.1215	0.1430

表1. genetic matching法によるコントロール群の選出

多変量解析の結果、NBNC-HCC に関連する独立危険因子として血清 GTP 値 (オッズ比 1.15; 95%CI 1.08-1.21; P<0.0001) \ Brinkman index (オッズ比 1.17; 95%CI 1.05-1.30; P=0.0047) \ および血清アルブミン値 (オッズ比 0.67; 95%CI 0.60-0.70; P<0.0001) が同定された (表 2)。

	Unit	OR	95% CI	P値
HbA1c	0.1	1.03	0.99 - 1.07	0.1270
GGT	10	1.15	1.08 - 1.21	<0.0001
APRI	0.1	1.07	0.98 - 0.964	0.1283
血小板	1	0.95	0.89 - 1.01	0.0996
Brinkman index	100	1.17	1.05 - 1.30	0.0047

表 2. 多変量解析

ランダムフォレスト解析の結果、血清アルブミン値は Case 群と Control 群を最も識別しうる因子であった (98 variable importance) (図 1)。

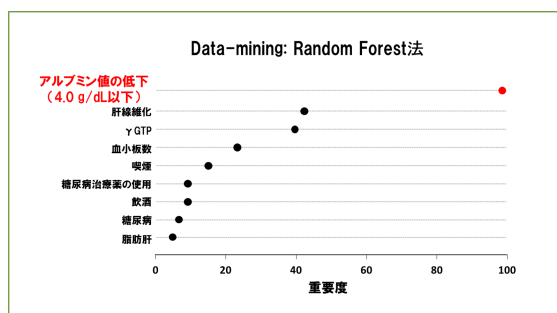


図 1. ランダムフォレスト解析

決定木解析により、血清アルブミン値、血清 GTP 値、Brinkman index、aspartate aminotransferase to platelet ratio index の 4 因子からなる NBNC-HCC のプロファイルが作成された。なかでも、血清アルブミン値は第一分岐の因子であり、4.01 g/dL 以下の者の 82.5%に NBNC-HCC を認めた。本年度、我々は、データマイニングにより血清アルブミン値が NBNC-HCC に関連する重要な因子であることを明らかにした (図 2)。

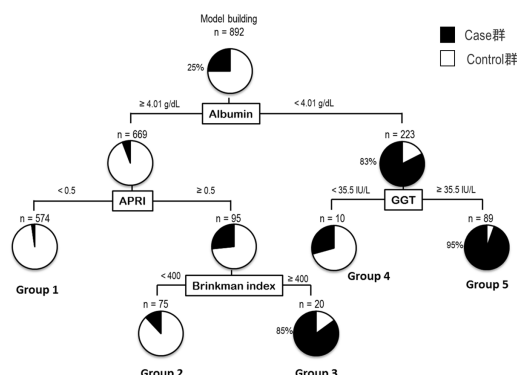


図 2. 決定木解析

## 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 7 件)

1. Kawaguchi T, Suetsugu T, Ogata S, Imanaga M, Ishii K, Esaki N, Sugimoto M, Otsuyama J, Nagamatsu A, Taniguchi E, Ito M, Oriishi T, Iwasaki S, Miura H, Torimura T. An association between dietary habits and traffic accidents in patients with chronic liver disease: A data-mining analysis. Biomed Rep. 2016;4:615-622. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2711130>. 査読有
2. Kawaguchi T, Kohjima M, Ichikawa T, Seike M, Ide Y, Mizuta T, Honda K, Nakao K, Nakamuta M, Sata M. The morbidity and associated risk factors of cancer in chronic liver disease patients with diabetes mellitus: a multicenter field survey. J Gastroenterol. 2015;50:333-41. doi: 10.1007/s00535-014-0968-5. 査読有
3. Kawaguchi T, Nagao Y, Abe K, Imazeki F, Honda K, Yamasaki K, Miyanishi K, Taniguchi E, Kakuma T, Kato J, Seike M, Yokosuka O, Ohira H, Sata M. Effects of branched-chain amino acids and zinc-enriched nutrients on prognosticators in HCV-infected patients: a multicenter randomized controlled trial. Mol Med Rep. 2015 Mar;11(3):2159-66. doi: 10.3892/mmr.2014.2943. 査読有
4. Sumie S, Kawaguchi T, Kawaguchi A, Kuromatsu R, Nakano M, Satani M, Yamada S, Okamura S, Yonezawa Y, Kakuma T, Torimura T, Sata M. Effect of pioglitazone on outcome following curative treatment for hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection: A prospective study. Mol Clin Oncol. 2015;3:115-120. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/251130>. 査読有
5. Aino H, Sumie S, Niizeki T, Kuromatsu R, Tajiri N, Nakano M, Satani M, Yamada S, Okamura S, Shimose S, Sumie H, Torimura T, Sata M. Clinical characteristics and prognostic factors for advanced hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis. Mol Clin Oncol. 2014;2:393-398. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/241333>. 査読有
6. Kawaguchi T, Ito M, Taniguchi E,

Sata M. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, modulates hepatic fatty acid composition and  $\Delta$ -5-desaturase index in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis. Int J Mol Med. 2014;34:782-7. doi: 10.3892/ijmm.2014.1826. 査読有

7. Yamada S, Kawaguchi A, Kawaguchi T, Fukushima N, Kuromatsu R, Sumie S, Takata A, Nakano M, Satani M, Tonan T, Fujimoto K, Shima H, Kakuma T, Torimura T, Charlton MR, Sata M. Serum albumin level is a notable profiling factor for non-B, non-C hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma: A data-mining analysis. Hepatol Res. 2014;44:837-45. doi: 10.1111/hepr.12192. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

1. 川口 巧、國府島 庸之、市川 辰樹、清家 正隆、井手 康史、水田 敏彦、本田 浩一、中尾 一彦、中牟田 誠、佐田 通夫. 糖尿病を合併する肝疾患患者のがん有病率とがん関連因子. 第17回 日本肝臓学会大会. 2013年10月9日 グランドプリンスホテル新高輪(東京都 港区).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐田 通夫 (Sata Michio)  
久留米大学・先端癌治療研究センター・教授  
研究者番号：10162398

(2)研究分担者

川口 巧 (Kawaguchi Takumi)  
久留米大学・医学部・講師  
研究者番号：00320177

川口 淳 (Kawaguchi Atsushi)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：60389319

山田 慎吾 (Yamada Shingo)  
久留米大学・医学部・助教