

課題番号 : 26指109

研究課題名 : C型肝炎ウイルス排除後の肝発がんに関与する血中エピゲノムマーカーの探索と臨床的有用性の検証—探索研究と全国肝疾患拠点病院共同前向き研究

主任研究者名 : 考藤達哉

分担研究者名 : なし (研究協力者多数)

キーワード : HCV、ゲノム、エピゲノム、肝がん、SVR

研究成果 :

C型慢性肝炎に対する治療の進歩は目覚ましく、DAAのみの治療では90%以上のSVRが報告されている。しかし、世界的にC型肝炎患者の高齢化は進み、SVR後にも肝がんが発症する例が増加している。SVR後肝がんに関連する因子として、高齢、肝脂肪化、線維化などが報告されているが詳細は明らかではない。HCVが感染すると、遺伝子にエピゲノム修飾が蓄積されることが報告されており、SVR後も発がん素地の維持に関与している可能性がある。肝がんは血流の豊富な腫瘍であり、その発生、進展に血管新生が重要な役割を果たしている。申請者らは、ANG-2の受容体であるTIE-2を発現する単球が肝がん患者の末梢血および肝組織中で増加しており、肝がんにおける血管新生に関与することを明らかにしている(Matsubara T, Kanto T, et al. Hepatology 2013)。SVR後発がんの過程にも血管新生の亢進に関与している可能性がある。

以上の観点から、本研究ではSVR後肝がんの病態の解明と、発がん高リスク群に関連する遺伝子マーカーの探索を行う。次に肝疾患拠点病院での治療症例を対象として、発がんリスク評価における遺伝子マーカーの有用性の検証を行う。発がんリスク評価を基にしたSVR後患者の効果的・効率的なフォローアップ方針の確立を目指す。

平成26年度成果 :

肝がん患者における癌部、非癌部組織の線維芽細胞の機能解析

SVR後肝がんの生物学的特性を明らかにするために、非SVR例での肝がんの切除標本を材料として、癌部、非癌部から線維芽細胞を分離した。C型肝炎がん、B型肝炎がん、非B非C型肝炎がん患者の肝癌部、肝硬変部、正常肝部それぞれから線維芽細胞培養系が樹立された。各線維芽細胞の培養上清を用いてヒト単球からマクロファージへの分化能、マトリゲルを用いた肝癌細胞の浸潤能を評価した。肝硬変部、肝癌部からの線維芽細胞培養上清にはIL-6, IL-8, MCP-1が高濃度に存在していた。肝硬変部、肝癌部線維芽細胞上清は、M2型マクロファージを誘導し、肝癌細胞株の浸潤能を亢進させた。これより、肝癌における線維芽細胞はサイトカイン、ケモカインなどの産生を介して免疫細胞の遊走、マクロファージへの分化、肝癌の悪性化に関与していることが明らかになった。現在、癌関連線維芽細胞の形質・機能形成に関与するランドマーク遺伝子の同定を進めている。(図1)

肝がん関連血管新生細胞の誘導因子の探索

肝癌患者の血液中ではTIE2陽性単球(TEM)が増加しており、TEMの頻度は肝臓での血管新生の程度と正相関することを明らかにしている。肝癌が産生する何らかの因子がTEMの誘導に関与すると仮定し、肝がん患者血清中のサイトカイン、ケモカインをMultiplex法を用いて網羅的に解析した。その結果、TEM高値群と低値群で比較すると、HGF、Osteopontin、M-CSF、FolistatinがTEM高値群で有意に増加していた。これらの4因子を用いて、in vitroでのマクロファージ分化能を比較すると、M-CSFが単球からマクロファージへの分化を促進し、TIE2発現が増加した。したがって、肝癌由来のM-CSFがTEM誘導に関与することが示唆された。現在、肝がんの病態におけるM-CSFの意義を多数の検体で検証している。(図2)

Subject No. : 26-109

Title : **Exploration of genetic and epigenetic markers for the detection of hepatocellular carcinoma occurring in patients who cleared HCV : Further multi-center validation study of their clinical feasibility.**

Researchers :

Key word : HCV, Genome, Epigenome, Hepatocellular carcinoma, SVR

Abstract :

Since the development of direct anti-viral agents against HCV, the sustained virological response (SVR) rate has been improved, which reaches more than 95% even in hard-to-treat populations. However, the occurrence of HCC is reported to be not so uncommon in aged SVR patients. Therefore, it is of clinical importance to explore some biomarkers or genetic markers that enable us to assess the risk of HCC occurrence in patients with SVR. It is reported that epigenetic modifications are accumulated on multiple genes in patients with HCV infection, the alteration of which are sometimes irreversible. Alternatively, angiogenesis is a critical step in *de novo* occurrence or the recurrence of HCC. We thus aimed to explore such markers of SVR-HCC and intend to validate its clinical usefulness in patients who are at high risk of future HCC.

#1: Cancer-associated fibroblast (CAF) as a modifier of microenvironment of HCC

Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are deemed to be essential constituents forming cancer-surrounding niche. We established three types of fibroblasts, CAFs, liver cirrhotic fibroblasts (LCFs) and non-cirrhotic fibroblasts (NFs). In the conditioned medium (CM) of CAF and LCF, the levels of IL-6, IL-8 and CCL2 were higher than those in the NF. The CAF and LCF provided more invasiveness of HuH7, mobilized monocytes more significantly and polarized macrophages into M2/TAM phenotype. Neutralization of IL-6, IL-8 and/or CCL2 in the CM reduced the relevant functions on Huh7, monocytes and macrophages. Activated fibroblasts recovered from the cirrhotic liver are primed to exert malignancy-prone functions on adjacent macrophages and cancer cells, the capacity of which is as potent as CAF. Liver cirrhosis is a disease entity of carcinogenic microenvironment provided by CAF-like cirrhotic fibroblasts.

#2: TIE2-expressing monocytes (TEMs) as an angiogenesis marker of HCC

We reported that Tie2-expressing monocytes (TEMs) were increased in patients with HCC, the frequency of which was correlated with the degree of angiogenesis in the liver. We sought to examine the possibility of TEMs as the biomarker in patients with HCC. In patients with high TEMs frequency (>2.75% cut-off), the levels of M-CSF, HGF, Osteopontin, and Follistatin were significantly higher than those in patients with lesser TEMs ($p < 0.05$). Among such factors, TEMs/Tie2-expressing macrophages were generated from monocytes in the presence of M-CSF instead of the others. Therefore, M-CSF is a potential inducer of TEMs, the feasibility of which as a surrogate biomarker needs to be verified in a larger cohort.

(Conclusion)

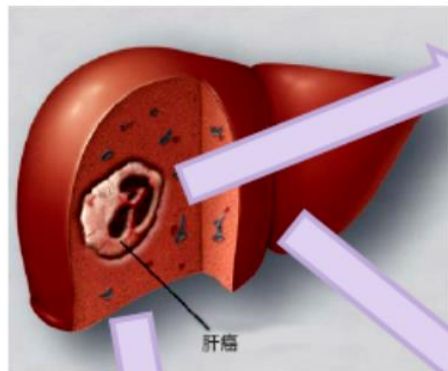
We are currently screening some candidate genes involving in the phenotypes and functions of CAFs or TEMs directly recovered from the HCC. Further study should be focused on the development of diagnostic modalities based on such candidate markers.

Researchers には、分担研究者を記載する。

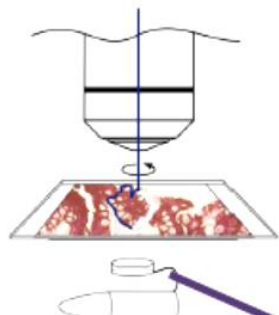
肝癌微小環境における癌関連線維芽細胞(CAF)の役割

マクロファージ分化(TAM)と癌細胞悪性形質への関与

肝細胞癌切除サンプル



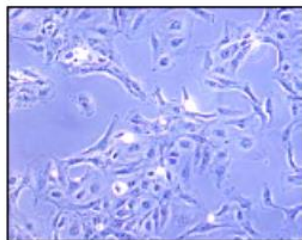
LCM



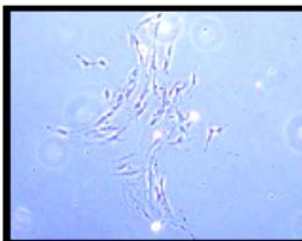
CAFのRNAを抽出



次世代シーケンサによる網羅的解析



癌組織から分離したCAF

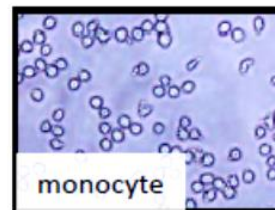


非癌部から分離したfibroblast

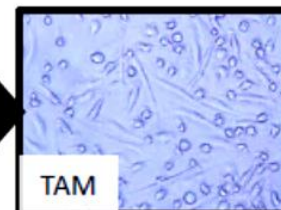
培養上清にて単球・MΦを刺激



培養上清によるTAMの誘導



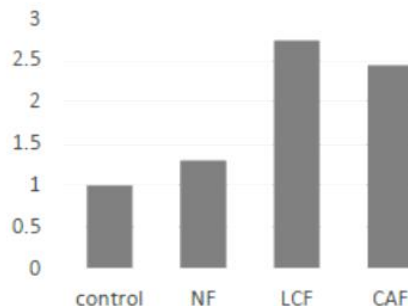
monocyte



TAM

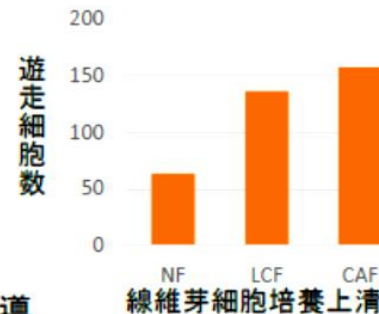
M2マクロファージへの分化

IL10 mRNA



線維芽細胞培養上清

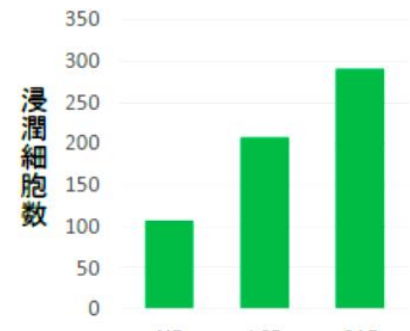
単球の遊走
migration assay



線維芽細胞培養上清

癌細胞の浸潤促進

invasion assay

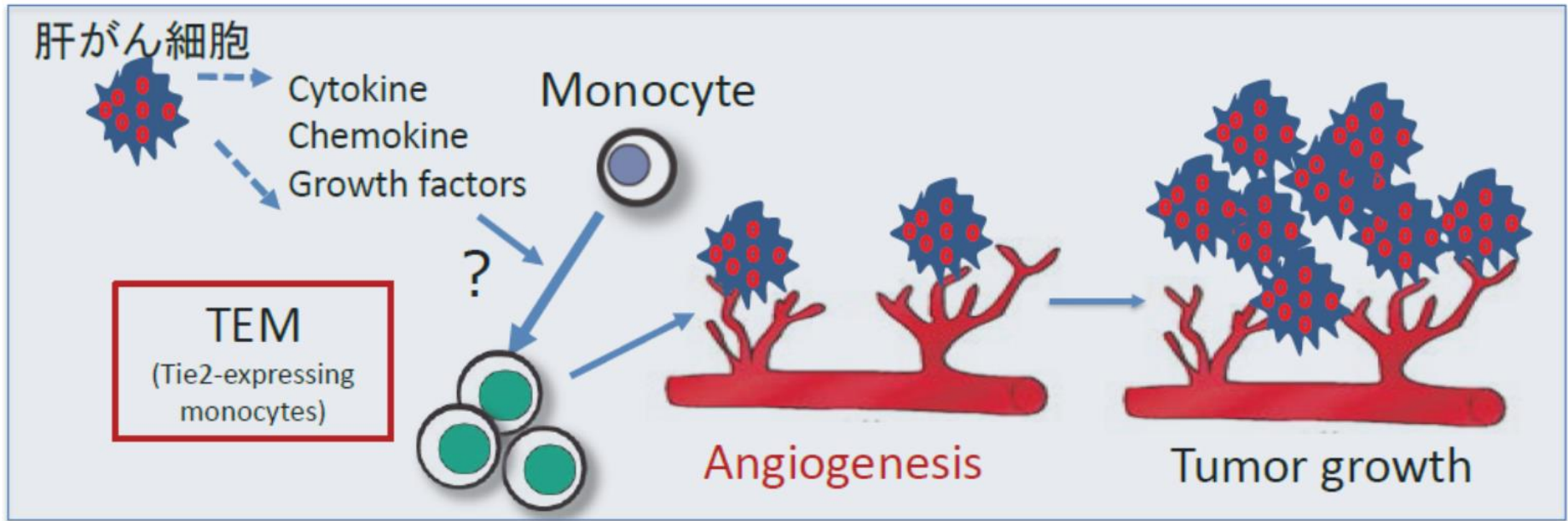


線維芽細胞培養上清

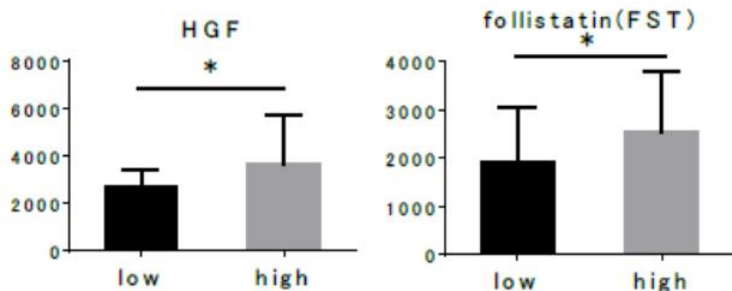
➡ 切除肝組織から分離培養したCAFのゲノム・エピゲノム解析へ

肝がんの血管新生前駆細胞の誘導機序の解明

Tie2発現単球(TEM)

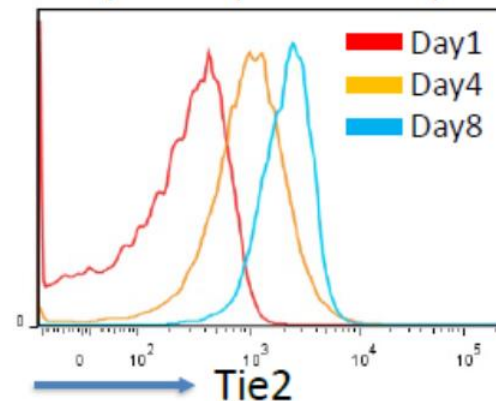


肝がん患者血清Biomarkerの探索



Multiplex法での解析 (TEM高値 vs. TEM低値)

TEM誘導活性のin vitro評価系 (Monocyte + M-CSF)



TEM誘導因子の同定と多数の臨床検体での検証

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指109

研究課題名：C型肝炎ウイルス排除後の肝発がんに関与する血中エピゲノムマーカーの探索と臨床的有用性の検証ー探索研究と全国肝疾患拠点病院共同前向き研究

主任研究者名：考藤達哉

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Association of serum IFN-lambda with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection.	Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, Yoshio S, Kurosaki M, Hashimoto S, Yatsushashi H, Nomura H, Kang JH, Takeda T, Naito S, Kimura T, Yamagiwa Y, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, Izumi N, Kage M, Mizokami M, Kanto T.	J. Gastroenterol	in press	2014
High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70.	Mukaide M, Sugiyama M, Korenaga M, Murata K, Kanto T. , Masaki N, Mizokami M.	Journal of Virological Methods	207	2014
Using early viral kinetics to predict antiviral outcome in response-guided pegylated interferon plus ribavirin therapy among patients with hepatitis C virus genotype 1.	Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Miyazaki M, Iio S, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Inui Y, Hijioka T, Inada M, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kanto T. , Kasahara A, Hayashi N, Takehara T.	J Gastroenterol	49(4)	2014

研究発表及び特許取得報告について

Risk factors for hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase treated with pegylated interferon and ribavirin.	Harada N, Hiramatsu N, Oze T, Morishita N, Yamada R, Hikita H, Miyazaki M, Yakushijin T, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kanto T , Kasahara A, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Inoue A, Hayashi N, Takehara T.	Journal of Viral Hepatitis	21(5)	2014
学会発表				
タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Human BDCA3 ⁺ dendritic cells enhance NK/pDC cell-mediated inhibition of HBV replication and protect liver from NK cell-mediated damage	Yoshio S, Kanto T , Sugiyama M, Shoji H, Mano Y, Aoki Y, Nishida N, Korenaga M, Murata K, Mizokami M.	65th Annual Meeting of the American-Association-for-the-Study-of-Liver-Diseases	Boston, U.S.A.	2014.11.07-11
肝疾患における自然免疫の役割 最新知見と今後の展開 HBV・HCVの複製抑制機構における自然免疫細胞 IFNの重要性	考藤達哉, 由雄祥代, 溝上雅史.	第50回日本肝臓学会総会	東京	2014.05.29-30
HBV複製抑制機構におけるインターフェロン(IFN-α/γ/λ)の役割-樹状細胞とNK細胞のクロストーク	由雄祥代, 考藤達哉, 杉山真也, 是永匡紹, 村田一素, 溝上雅史.	第50回日本肝臓学会総会	東京	2014.05.29-30
NK細胞と樹状細胞の相互作用によるHBV複製抑制効果	由雄祥代, 考藤達哉, 杉山真也, 青木孝彦, 西田奈央, 是永匡紹, 村田一素, 溝上雅史.	第18回日本肝臓学会大会	神戸	2014.10.23-24
肝疾患のゲノム・免疫研究を治療に繋ぐ NK細胞と樹状細胞の相互作用によるHBV複製の抑制効果	由雄祥代, 考藤達哉, 溝上雅史.	第40回日本肝臓学会東部会	東京	2014.11.27-28

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
NCGMメディアセミナー (世界肝炎デー関連セミナー) B型肝炎、C型肝炎の最新治療に関する講演	考藤達哉, 溝上雅史	雑誌メディア	センター病院	2014.7.23

研究発表及び特許取得報告について

AASLD TV (英国映像会社 : WebsEdge) 肝疾患研究部プロモーションビデオ	考藤達哉, 溝上雅史, 杉山真也	ウェブ (WebsEdge)	撮影: 肝炎・免疫研究センター	2014.10.14
---	------------------	----------------	-----------------	------------

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。