

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。研究代表者らは、ANG-2の受容体であるTIE-2を発現する単球が肝がん患者で増加しており、血管新生に関与することを明らかにした。SVR後発がんの過程にも線維化、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27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と遺伝子発現の解析

SVR後肝がんの生物学的特性を明らかにするために、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。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。各線維芽細胞の遺伝子発現を網羅的に比較し、癌部の線維芽細胞で特異的に発現上昇している遺伝子Aを同定した。線維芽細胞への遺伝子Aの強制発現、siRNAによる遺伝子発現抑制により、遺伝子Aと上記の機能との関連性を確認した。遺伝子Aは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可能性がある。現在、遺伝子Aの発現制御に関与するエピゲノム修飾、転写調節に関与するmiRNAの同定を進めている。(図1)

肝がん関連血管新生細胞(TEM)のSorafenib治療効果関連Biomarkerとしての有用性の検証

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。肝がん患者血清中のサイトカイン、ケモカインを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4因子のうち、M-CSFが単球からマクロファージへの分化とTIE2発現を亢進させた。これより、肝癌由来のM-CSFがTEM誘導に関与することが示唆された。肝がんに対してSorafenib治療を行った症例を対象とし、治療経過におけるTEM頻度と血清M-CSFを解析し、治療効果、予後との関連性を検討した。治療後TEM低値群は、TEM高値群に比較して抗腫瘍効果が良好であり、生命予後も良好であった。TEMは肝がんの発症・再発・予後に関与するBiomarkerとして有用であることが示された。現在、M-CSF以外のTEM誘導因子を網羅的に探索し、新たな治療標的候補分子を同定している。(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, the levels of IL-6, IL-8 and CCL2 were higher than those in the NF. The CAF provided more invasiveness of HuH7, mobilized and polarized macrophages more into M2/TAM phenotype. By comparing gene expression profiles between CAF and NF, we identified several genes that were highly up-regulated in CAF. The above-mentioned functions of CAF were reproduced by the transfer of *Gene-A* and were canceled by specific shRNA. These results indicate that *Gene-A* is one of the landmark genes that determine the differentiation of CAF and their gain-of-function. The regulatory mechanisms of *Gene-A* in fibroblasts should be clarified, such as epigenetic modification and/or transcriptional regulation by miRNA.

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

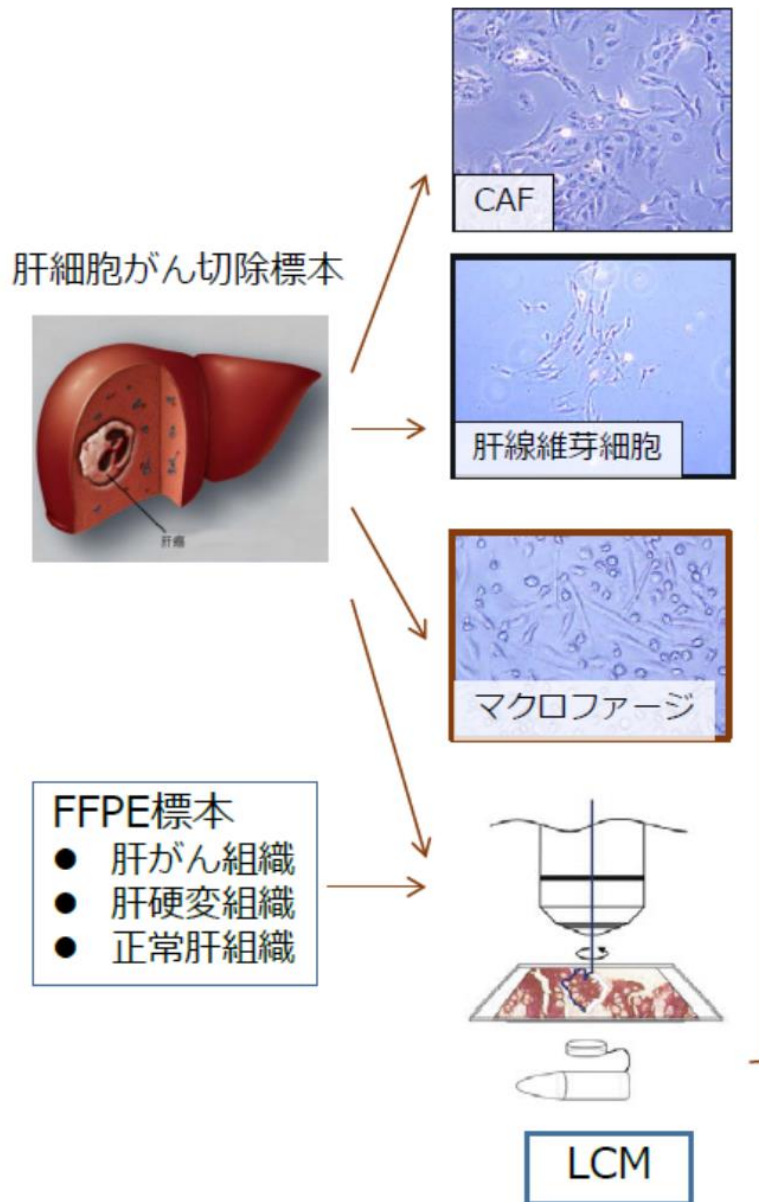
We reported that Tie2-expressing monocytes (TEMs) were increased in patients with HCC, the frequency of which was correlated with angiogenesis in the liver. We sought to examine the possibility of TEMs as the biomarker of HCC who undertook anti-angiogenesis multi-kinase inhibitor, sorafenib. In patients with high TEMs, serum M-CSF was significantly higher than those with lesser TEMs. TEMs were generated from monocytes in the presence of M-CSF. In 44 HCC patients with sorafenib, TEM frequency after 1 month of therapy was significantly correlated with overall survival. Thus, TEM is a feasible biomarker as well as a promising therapeutic target against HCC. Exploration of the other factors inducing TEM are currently undertaken.

(Conclusion)

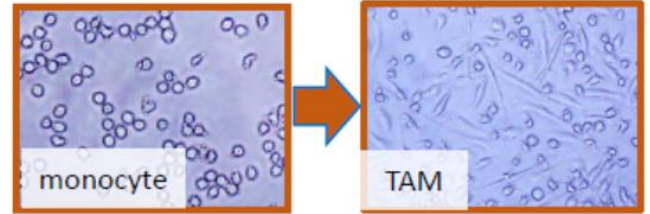
We are currently investigating regulatory mechanisms of landmarks genes of CAFs or TEMs. Further study should be focused on the development of diagnostic modalities for such candidates.

Researchers には、分担研究者を記載する。

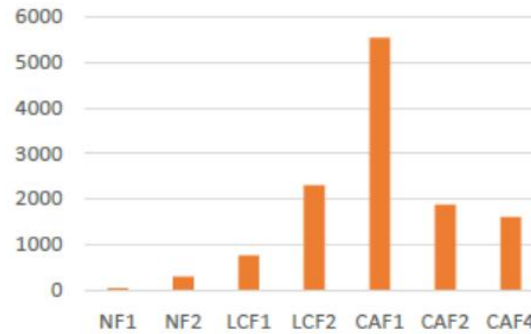
肝がん関連線維芽細胞の機能関連遺伝子の探索



がん関連線維芽細胞 (CAF) による腫瘍マクロファージ (TAM) の誘導



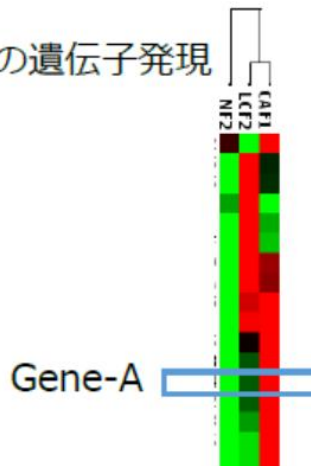
IL-6



HCC 浸潤能



CAFの遺伝子発現



肝がん被膜でのGene-A発現



血管新生前駆細胞(TEM)の肝がん治療における意義の解明

肝がん細胞



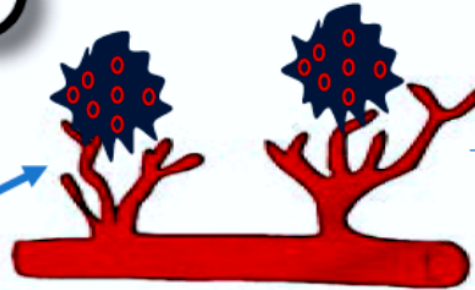
Cytokine
Chemokine
Growth
factors

単球

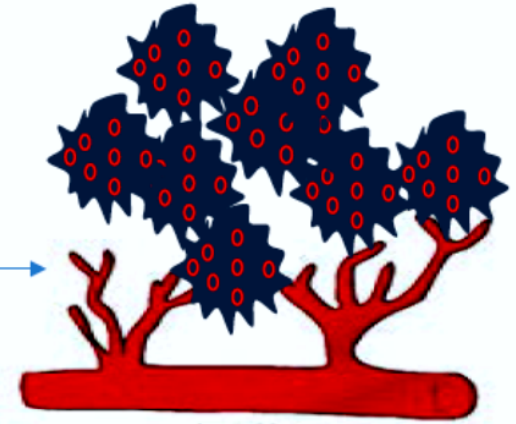


?

TEM
(Tie2-expressing
monocytes)



血管新生

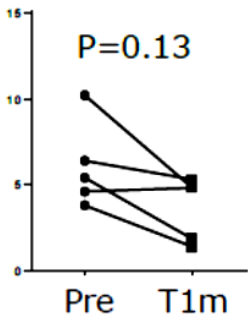


肝がんの増大

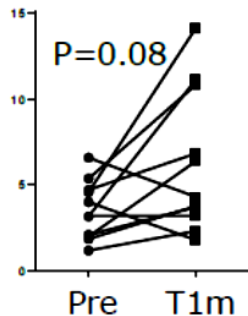
進行肝がん患者対象 (40例)

ソラフェニブ (400mg/day)	TEMs測定 (Pre)	TEMs測定 (T1m)	mRECIST ~3M	抗腫瘍効果判定 PR/SD: 著効/不変 PD: 進行
Pre	Pre	1M	~3M	

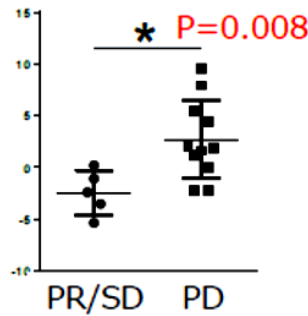
PR/SD



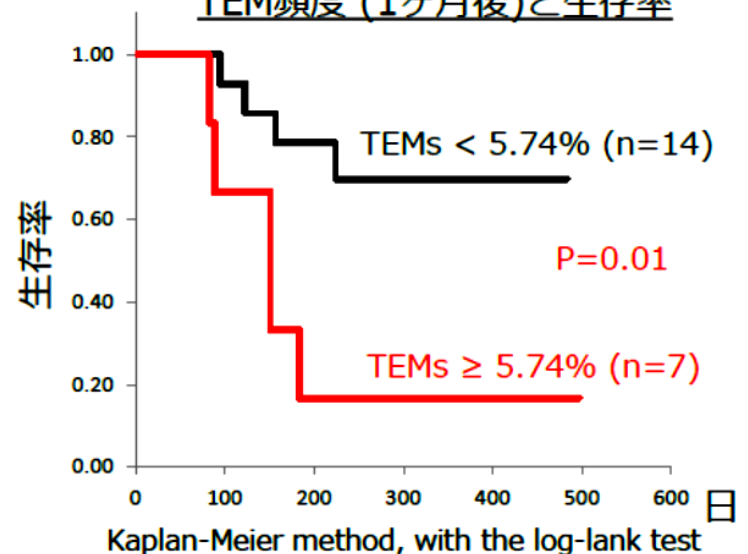
PD



Δ TEMs(T1m-pre)



TEM頻度 (1ヶ月後)と生存率



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—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
Host-virus interactions in hepatitis B and hepatitis C infection.	Yoshio S, <u>Kanto T.</u>	J. Gastroenterol	in press	2016
Indoleamine-2, 3-dioxygenase as an effector and an indicator of protective immune responses in patients with acute hepatitis B.	Yoshio S, Sugiyama M, Shoji H, Mano Y, Mita E, Okamoto T, Matsuura Y, Okuno A, Takikawa O, Mizokami M, <u>Kanto T.</u>	Hepatology		2015
The impact of PNPLA3 and JAZF1 on hepatocellular carcinoma in non-viral hepatitis patients with type 2 diabetes mellitus.	Ueyama M, Nishida N, Korenaga M, Korenaga K, Kumagai E, Yanai H, Adachi H, Katsuyama H, Moriyama S, Hamasaki H, Sako A, Sugiyama M, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Kawaguchi T, Torimura T, Hyogo H, Aikata H, Ito K, Sumida Y, Kanazawa A, Watada H, Okamoto K, Honda K, Kon K, <u>Kanto T.</u> , Mizokami M, Watanabe S.	J Gastroenterol		2015
Appropriate Use of Virtual Touch Quantification and FibroScan® M and XL Probes According to the Skin Capsular Distance.	Kumagai E, Korenaga K, Korenaga K, Imamura M, Ueyama M, Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, <u>Kanto T.</u> , Mizokami M, Watanabe S.	J Gastroenterol		2015

研究発表及び特許取得報告について

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Cancer-associated or cirrhosis fibroblasts recovered from hepatocellular carcinoma promote macrophages and cancer cells to progressive phenotype. 4/19-22, 2015	Mano Y, <u>Kanto T</u> , Shoji H, Yoshio S, Sugiyama M, Osawa Y, Kimura K, Shirabe K, Maehara Y, Mizokami M.	Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR)	Philadelphia, U.S.A.	2015.4.19-22
Comprehensive analyses of serum biomarkers associating with the increase of pro-angiogenic Tie2-expressing monocytes in patients with hepatocellular carcinoma.	Shoji H, <u>Kanto T</u> , Yoshio Y, Mano Y, Sugiyama M, Aoki Y, Taketomi A, Mizokami M.	Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR)	Philadelphia, U.S.A.	2015.4.19-22
肝保護的HBV排除機構におけるBDCA3陽性樹状細胞の役割.	由雄祥代, <u>考藤達哉</u> , 溝上雅史.	第51回日本肝臓学会総会(パネルディスカッション)	熊本	2015.05.21-22
肝微小環境における線維芽細胞の役割ー肝癌進展とマクロファージ分化に与える影響.	間野洋平, <u>考藤達哉</u> , 溝上雅史.	第51回日本肝臓学会総会(ワークショップ)	熊本	2015.05.21-22
肝細胞癌における血管新生関連細胞(Tie2-expressing monocytes)誘導因子の探索.	正司裕隆, <u>考藤達哉</u> , 間野洋平, 青木孝彦, 由雄祥代, 杉山真也, 武富紹信, 溝上雅史.	第51回日本肝臓学会総会	熊本	2015.05.21-22
Pro-angiogenic Tie2-expressing monocytes/TEMs as a biomarker of the response to sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma	Shoji H, Yoshio Y, Mano Y, Sugiyama M, Aoki Y, Itokawa N, Atsukawa M, Osawa Y, Kimura K, Taketomi A, Mizokami M, <u>Kanto T</u> ,	Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Disease (AASLD)	San Francisco, USA	2015.11.13-17
Indoleamine-2,3-dioxygenase as the intrinsic anti-HBV effector that leads to durable immune responses in patients with acute hepatitis B: A comparative analysis with the sequence in hepatic flare	Yoshio S, Sugiyama M, Shoji H, Mano Y, Aoki Y, Okamoto T, Matsuura Y, Mizokami M, <u>Kanto T</u> ,	Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Disease (AASLD)	San Francisco, USA	2015.11.13-17

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

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。