

2022 年 12 月 12 日

報道関係者各位

慶應義塾大学医学部
国立国際医療研究センター
北海道大学大学院医学研究院

非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）患者さんにおける 肝細胞がん発生リスク診断法を開発

慶應義塾大学医学部病理学教室（病因病理学分野）の藏本純子専任講師、新井恵吏准教授、金井弥栄教授らの研究グループは、非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis、以下 NASH）患者さんの経過観察中における、肝細胞がん（注 1）発生リスク診断法を開発しました。この診断は、ゲノム中の DNA メチル化の状態を網羅的に調べる方法で見つけたバイオマーカーの DNA メチル化率を、独自に開発したアニオン交換高速液体クロマトグラフィー法（注 2：anion-exchange high-performance liquid chromatography、以下 HPLC）により測定することで、将来肝がんになるリスクを予測するものです。リスクが高いと判断された NASH 患者さんには、継続的に病院に来ていただき検査することで早期に肝がんを発見し、治療成績の向上につながることを期待されます。発がんの予防や個別化予防医療にもつながる可能性があり、臨床実装を急ぎたいと考えています。

本研究成果は、国際科学雑誌 *Clinical Epigenetics*（オンライン）に 2022 年 12 月 5 日付（英国時間）で掲載されました。

1. 発表のポイント

（1）肝組織検体のゲノム網羅的 DNA メチル化解析で、正常肝組織に比して、肝がんの発生母地となった NASH の肝組織（発がんリスク（注 3）のある NASH 検体）において DNA メチル化異常が起こっており、このような前がん段階の DNA メチル化異常が NASH 由来肝がん inheritance されていることを明らかにしました。

（2）DNA メチル化率を測定することで、正常な肝組織と“発がんリスクのある NASH 検体”を見分けることが可能な、シトシン塩基を同定しました。さらに、この中から、発がんリスクを見分けるのに有用で、病理組織所見等とは独立して発がんリスクを予測することができる、バイオマーカー候補となるシトシン塩基を選定しました。

（3）バイオマーカー候補の選定に使用したのとは別の検体で解析して再現性が検証された、*ZC3H3* 遺伝子・*LOC285847* 遺伝子上の 3 シトシン塩基（cg18210511, cg09580859, cg13719443）をバイオマーカーとして、臨床検査に強みを発揮すると期待される、独自に開発した HPLC 法での DNA メチル化率の実測に適した、肝がん発生リスク診断法を開発しました。

2. 研究の背景

NASH は、大量飲酒などをしておらず、肝炎ウイルスなどにも感染していないのに、肝臓に脂肪が溜まって炎症が引き起こされ、この状態が長年続くと肝硬変（注 4）や肝細胞がんになるという病気です。肥満、糖尿病、脂質異常症などと関連して起こるとされています。近年、ウイルス性肝炎にとってかわって、肝がんの発生要因となっています。早期に肝がんを発見することが治療成績の向上に重要ですが、NASH 由来肝硬変の患者さんがさらに肝がんまで進んでしまう頻度は 11%程度とされています（参考文献 1）。したがって、NASH 患者さん全員に、肝がんの診断のための画像の検査などを頻繁に受けていただくことは困難です。NASH 患者さんのうち特に肝がんになるリスクの高い患者さんがわかれば、継続して病院に通っていただくようお願いし、画像診断を行なって肝がんを早期に見つけ、治療成績の向上につながれると期待されます。早い段階にリスクがわかれば、肝がんにならないよう、NASH の進行を止める治療を行うことも可能と考えられます。

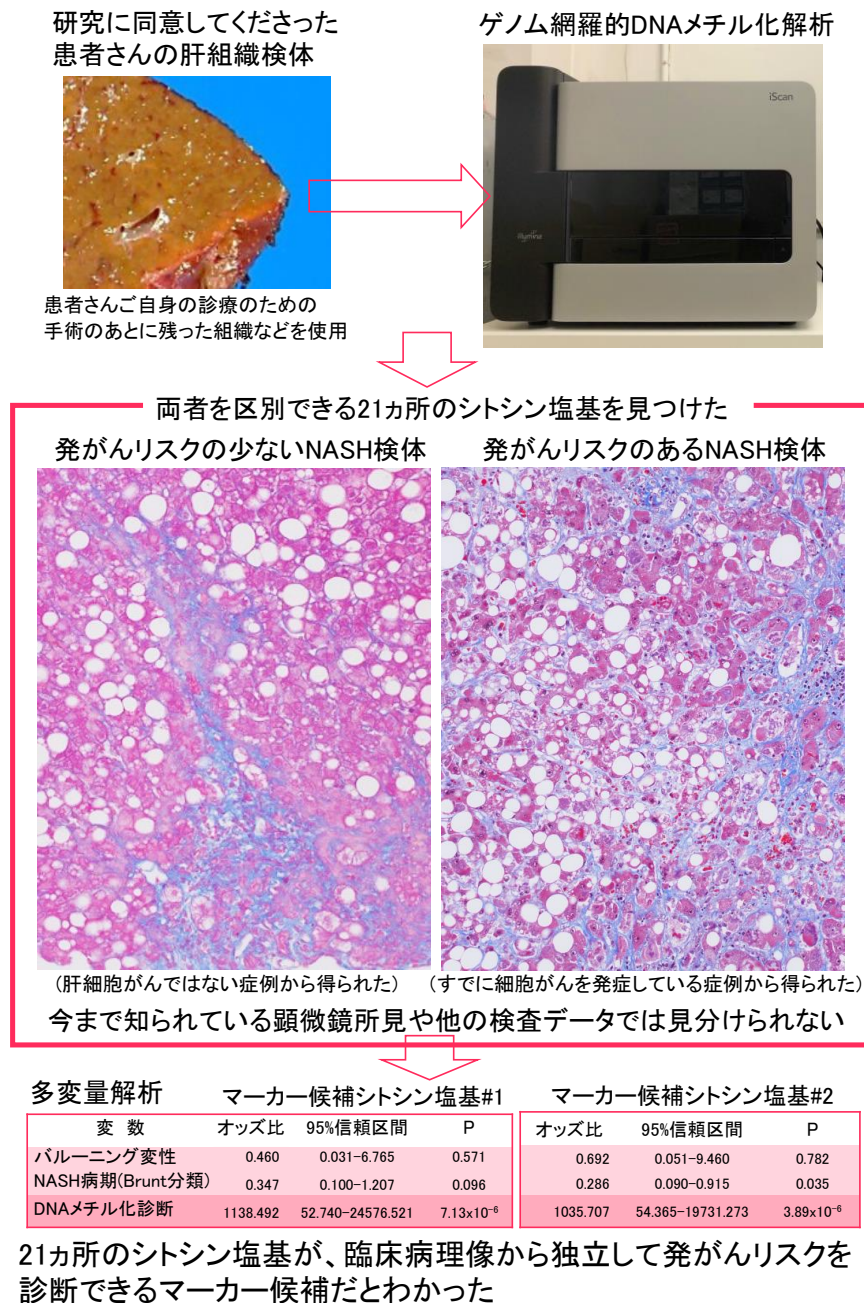
DNA メチル化とは、DNA において遺伝情報を書き込む暗号文を構成している T・C・G・A の 4 文字（塩基）のうちの、C（シトシン）塩基にメチル基が結合する DNA の飾り（修飾）のことです。DNA に結合するヒストンというタンパク質の修飾と並んで、遺伝子からタンパク質が作られる量を調節する“エピジェネティクス機構”のひとつです。正常細胞ではメチル基が通常結合していないシトシン塩基に、新たにメチル基が結合してしまうような DNA メチル化異常が起こると、発がんに関係する遺伝子からタンパク質ができる量が変わったり、細胞核中の遺伝情報を担う“ゲノム”が不安定な状態になります。DNA メチル化異常がこうして重要な発がん要因となることに、研究グループは以前から注目していました（参考文献 2）。

3. 肝組織検体でのゲノム網羅的な DNA メチル化解析（図 1）

研究に同意してくださった患者さんの手術検体のうちの、患者さんご自身の診療のための病理診断を邪魔しない部位から、正常肝組織・NASH を発症しているだけではなくすでに肝がんの発生母地になってしまった肝組織（発がんリスクのある NASH 検体）・NASH を背景にして起こった肝細胞がん組織の 3 種類の組織を、研究のために採取しました。検体の顕微鏡所見を病理学的に厳密に観察したのち、“高密度ビーズアレイ（注 5）”を使ってゲノム全体の DNA メチル化状態を調べ、正常肝組織と発がんリスクのある NASH 検体を見分けるのに役立つシトシン塩基を 450 カ所見つけました。このような発がんリスク段階（前がん段階）の DNA メチル化異常は、その後の NASH 由来肝がんを受け継がれていたことから、DNA メチル化を目印にして、NASH 患者さんの発がんリスク診断ができるだろうと考えました。

発がんリスク段階での DNA メチル化異常は、“クロマチン構造”を決めてタンパク質の作られ方を制御する遺伝子や、細胞周期・DNA 修復を司る遺伝子に多く見られ、DNA メチル化異常によりクロマチン修飾・細胞周期・DNA 修復が正常に進まなければ、発がんリスクが高まっていくのは妥当と考えられました。

そこで、以前すでに取得していた“NASH を発症しているが、肝がんにはなっていない患者さんの肝組織（発がんリスクの少ない NASH 検体）”のデータともさらに比較し、450 カ所の中から臨床現場での発がんリスクマーカーとして有望なシトシン塩基を 21 カ所選び出しました。この 21 カ所のシトシン塩基の DNA メチル化率を測定すれば、顕微鏡所見などだけでは予測しきれない、発がんリスクを診断できると考えられました。



【図 1】

肝組織検体でのゲノム網羅的な DNA メチル化解析による発がんリスクマーカー候補シトシン塩基の同定

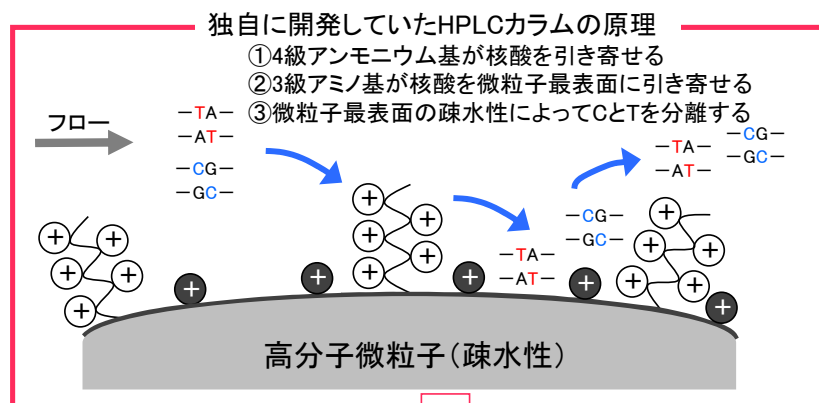
4. 臨床実装にむけた発がんリスク診断法の開発 (図 2)

ゲノム全体の DNA メチル化状態を調べる時に使った“高密度ビーズアレイ”などの研究のための手法は、大型の機器を使い、多数検体を高効率で調べることができますが、病院の検査室などで、一人ずつ来院される患者さんの検体を調べるのには向いていません。さらに、患者さんの組織検体においては、肝細胞、血管内皮細胞、炎症細胞など多種類の細胞が混在しているので、多種類の細胞の DNA メチル化状態を区別せずに測定してしまう方法は臨床検査に適していません。そこで、多細胞系列が混在した臨床試料の DNA メチル化率を短時間で精密に測定できる独自に開発した HPLC 法を適用しようと考え (参考文献 3)、21 カ所のシトシン塩基のうち HPLC 法の解析に適した 5 カ所を、NASH 患者さんにおける発がんリスク診断のために用いることとしました。

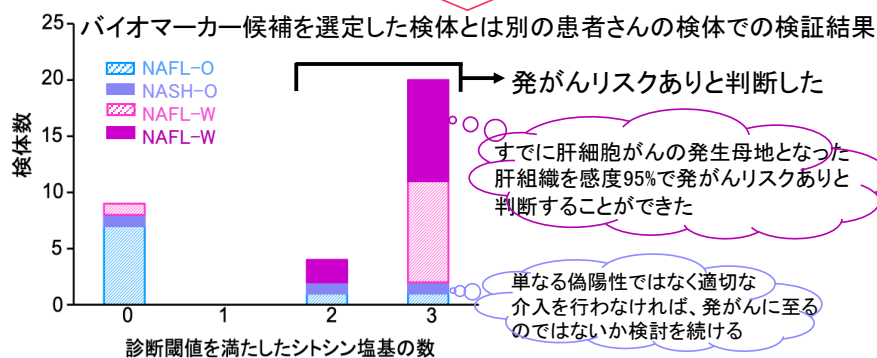
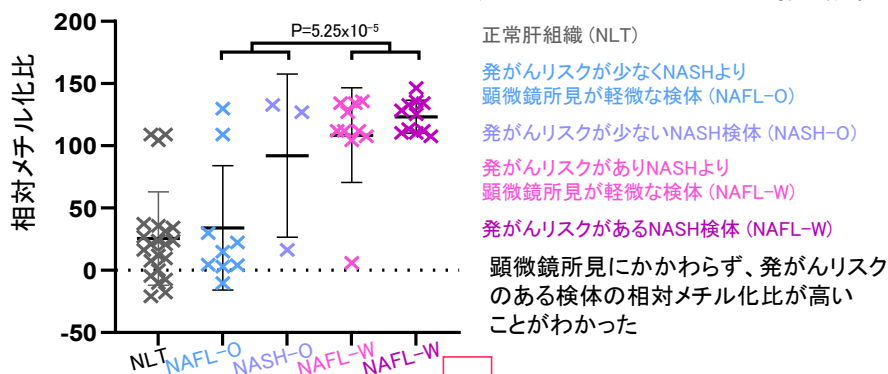
検査の信頼度を高めるために、バイオマーカー候補を見つけるのに用いた検体とは別の患者さんの検体を解析し、5 カ所のシトシン塩基のうち特に 3 カ所のシトシン塩基の DNA メチル化率を HPLC 法で測定すると、再現性が高いことがわかりました。この様なバイオマ-

カーとなるシトシン塩基は、*ZC3H3・LOC285847*両遺伝子上に位置していました。3カ所のバイオマーカーとなるシトシン塩基のDNAメチル化率をHPLC法で測定し、2カ所以上で診断基準を満たす場合を陽性と判断すれば、肝がんの発生母地となったNASH検体を、95%の感度で“発がんリスクがある”と正しく診断することができました。

マーカー候補シトシン塩基におけるDNAメチル化定量を、病院検査部等での臨床試料の解析に適した独自のHPLCによる評価系で行う



マーカーシトシン塩基(3カ所のマーカーのうちのひとつ)におけるHPLC解析結果



【図2】

HPLC法の適用と、バイオマーカー候補を見つけるのに用いた検体とは別の患者さんの検体での検証

5. 今後の展望

NASHの病理診断を行うために実施する肝生検検体の一部を使って、この発がんリスク診断を実施できると考えています。この場合、MASH患者さんには、新しい発がんリスク診断のための余分な身体的負担等はありません。この発がんリスク診断が普及すれば、肝がん発生リスクをあらかじめ知ってがんの早期診断につなげたり、NASHの進行を食い止めたりする治療を行うことで、予後改善と治療成績向上につながると期待されます。

6. 研究組織

この研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）肝炎等克服実用化研究事業 肝炎等克服緊急対策研究事業「NASH 肝がんの治療開発を目指す炎症加齢を加味したリピド・ゲノミクス研究 2.0」（研究開発代表者：国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター考藤達哉研究センター長）の支援を受けて行われたものです。

北海道大学病院等で研究に同意してくださった患者さんの肝組織検体を使用し、北海道大学消化器外科学教室 I 武富紹信教授のグループと共同で研究を行いました。

今回の解析に当たっては、国立国際医療研究センター糖尿病研究センター安田和基客員研究員が収集された検体を用いて既に取得していた DNA メチル化データを提供頂き、比較検討のために使用しています。

臨床検体の DNA メチル化定量に適した HPLC 解析技術は、慶應義塾大学医学部病理学教室金井弥栄教授の研究グループが開発したものです。

7. 論文

英文タイトル：Quantification of DNA methylation for carcinogenic risk estimation in patients with non-alcoholic steatohepatitis

タイトル和訳：非アルコール性脂肪性肝炎患者における DNA メチル化定量による肝細胞がん発生リスク評価

著者名： 藏本純子、新井恵吏*、藤本真央、田迎、山田有理子、與谷卓也、牧内里美、津田昇、尾島英知、深井原、関洋介、笠間和典、舟橋伸昭、宇田川陽秀、南茂隆生、安田和基、武富紹信、考藤 達哉、金井弥栄

*責任著者

掲載誌： *Clinical Epigenetics*（オンライン）

DOI： <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01379-4>

・特許

出願番号：特願 2019-222285

発明者：金井弥栄・新井恵吏・藏本純子ほか

発明の名称：非アルコール性脂肪性肝炎から肝細胞がんを発症するリスクを判定する方法

出願人：慶應義塾ほか

出願日：2019 年 12 月 9 日

PCT 出願日：2020 年 12 月 9 日

PCT 出願番号：PCT/JP2020/045879（日本・米国・EU 移行）

国際公開番号：WO2021/117772

【参考文献】

1. タイトル：Hepatocarcinogenesis in non-alcoholic fatty liver disease in Japan

掲載誌：J Gastroenterol Hepatol

DOI：10.1111/jgh.12239

2. タイトル：Genome-wide DNA methylation analysis during non-alcoholic steatohepatitis-related multistage hepatocarcinogenesis: comparison with hepatitis virus-related carcinogenesis

掲載誌：Carcinogenesis

DOI：10.1093/carcin/bgx005

3. タイトル：Novel method for DNA methylation analysis using high-performance liquid chromatography and its clinical application

掲載誌：Cancer Sci

DOI：10.1111/cas.13566

【用語解説】

- (注 1) 肝細胞がん：肝臓にできる上皮性悪性腫瘍には肝細胞がんと胆管細胞がんがあり、肝細胞がんが 90%以上を占めているので、肝がんの主要なものと言える。肝臓を構成している肝細胞を母地として発生するがん。我が国では以前は B 型肝炎ウイルス・C 型肝炎ウイルスの感染による慢性肝炎ならびに肝硬変に引き続いて起こる症例が多かったが、近年は NASH や NASH 由来肝硬変症に引き続いて肝細胞がんになる症例が増加している。
- (注 2) 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法：分析化学の手法のひとつ。分析したい試料を含む移動相（溶離液）を固定相（微粒子）が充填されたカラムの中に流し、固定相との相互作用の差を利用して試料中の複数の成分を分離・検出する方法。ここでは、独自に開発したアンモニウムカチオンと疎水性部位を有する微粒子を充填したカラムを用い、メチル化された DNA 断片とメチル化されていない DNA 断片を、分離して定量する。
- (注 3) 発がんリスク：将来がんになる危険性がある状態。がんの発生母地となりうる細胞に、発がん要因の影響が蓄積して、その DNA メチル化状態などにすでに異常が起り始めている段階を指す。個々の患者さんが発がんリスク段階にあることを診断できれば、介入予防によってがんの発生を食い止めたり、リスクを意識して厳密に検査することでがんを早期に発見し早期に治療を開始するなどの、個別化予防・個別化治療ができると考えられる。
- (注 4) 肝硬変：慢性肝炎などの慢性肝病変がもっとも進んだ病態。炎症に伴って肝臓を構成する肝細胞が壊死したり再生したりする過程を繰り返すうちに線維成分が増え、線維成分でできた壁の様な構造で取り囲まれた“再生結節”で肝臓全体が占められるようになる。肝細胞が機能を果たせなくなり、肝硬変に陥った肝臓から肝細胞がんが発生することがある。
- (注 5) 高密度ビーズアレイ：ゲノム全体の分子情報を取得するための解析プラットフォームのひとつ。ここではメチル化 DNA と非メチル化 DNA を検出するプローブが多数植え付けられた小さなビーズを、高い密度でガラス基板上に収容したアレイを指す。前処理をした DNA とビーズ上のプローブの複合体を形成させて、DNA メチル化情報を得る。

※ご取材の際には、事前に下記までご一報くださいますようお願い申し上げます。

※本リリースは文部科学記者会、科学記者会、厚生労働記者会、厚生日比谷クラブ、北海道教育庁記者クラブ、各社科学部等に送信しております。

【本発表資料のお問い合わせ先】

慶應義塾大学医学部 病理学教室 金井 弥栄（かない やえ）

TEL : 03-5363-3763

E-mail : ykanai@keio.jp

【本リリースの配信元】

慶應義塾大学信濃町キャンパス総務課：山崎・飯塚・奈良

〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35

TEL : 03-5363-3611 FAX : 03-5363-3612 E-mail : med-koho@adst.keio.ac.jp

<https://www.med.keio.ac.jp>

国立国際医療研究センター

企画戦略局 広報企画室

〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1

電話番号 : 03-3202-7181 FAX : 03-3207-1038 E-mail : press@hosp.ncgm.go.jp

<https://www.ncgm.go.jp>

北海道大学

北海道大学社会共創部広報課

〒060-0808 北海道札幌市北区北 8 条西 5 丁目

TEL : 011-706-2610 FAX : 011-706-2092 E-mail : jp-press@general.hokudai.ac.jp