

授与番号	甲第 1814 号
------	-----------

論文内容の要旨

Circular microRNA profiles as biomarkers for early stage hepatocellular carcinoma in a patient infected with hepatitis B virus

(B型肝炎ウイルス感染患者における早期肝細胞癌のバイオマーカーとしての血清 microRNA の検討)

(米澤美希, 吉田雄一, 鈴木彰子, 鈴木悠地, 遠藤啓, 柿坂啓介, 及川隆喜, 黒田英克, 宮坂昭生, 滝川康裕)

(Journal of Iwate Medical Association 72 巻, 2 号, 2020 年 6 月掲載予定)

I. 研究目的

B型肝炎ウイルス (HBV) 持続感染者は世界で 2.6 億人存在すると推定されており, 我が国の HBV 感染者数は全人口の約 1%にあたる 150 万人とされる. HBV 持続感染が成立した患者の中には, 病態の安定した無症候性キャリアから, 炎症の持続する慢性肝炎, 肝硬変, 肝細胞癌まで様々な病態が存在する. 肝障害のない HBe 抗原陰性 HBV キャリアからの肝発癌があること, 既存の腫瘍マーカー (AFP) では早期肝細胞癌での感度, 特異度が不十分であることから新たな早期肝細胞癌の biomarker が必要とされている.

近年, 肝癌組織および血中で多数の non-coding RNA の発現異常が報告され, 特に microRNA (miRNA) によるシグナル伝達系への干渉が肝発癌に関与することが明らかになった. HBV 感染者に生じた早期肝細胞癌の患者血清中の miRNA の発現異常を探索し, 早期肝細胞癌の新たな biomarker となりえるか検討した.

II. 研究対象ならび方法

2011 年 1 月~2018 年 2 月に本学附属病院を受診した 236 人の HBsAg 陽性患者のうち, 経過中に肝細胞癌を発症したのは 12 名であった. 血清が利用可能であった早期肝細胞癌発癌者 10 名 (HCC 群) の肝細胞癌発癌時の保存血清と, 肝発癌をしていない HBsAg 陽性患者 10 名をペアマッチングさせて対照群の血清を用いて比較検討を行った. すべてのプロトコルは当院の倫理委員会で承認され, ヘルシンキ宣言 (第 64 回 WMA 総会, 2013 年, 10 月) の要件に従い実施された. miRNeasy Serum/Plasma アドバンスキット (QIAGEN) を用いて両群の患者の血清から全 RNA を抽出し, GeneChip miRNA 4.0 Array 分析 (Thermo Fisher scientific, 以前の Affymetrix) を使用して, miRNA を含む non-coding RNA のマイクロアレイ分析を行った. Flashtag Biotin HSR RNA ラベリングキット (Thermo Fisher scientific) を用いて全 RNA をビオチンで標識した. さらにマイクロアレイ上のサンプル

を Genechip Hybridization, Wash and Stain キットを用いてハイブリダイズさせ、フィコエリトリンで染色し、次いで GeneChip Scanner 3000 7G (Thermo Fisher scientific) でスキャンした。蛍光シグナルのデータを GeneChip Command Console (Thermo Fisher 科学) で分析し、CEL ファイルを作成した。このファイルのデータ分析には、Affymetrix 発現コンソールおよびトランスクリプトーム分析コンソールを使用した。HCC 群と対照群との間で有意な miRNA 発現を検出するために non-coding RNA 発現結果を用いて一元配置分散分析を行った。肝発癌群と対照群を比較し、有意水準未満 ($p < 0.05$) の miRNA の中から、fold change の絶対値が平均+2 標準偏差を超過するものを候補 non-codingRNA とした。

III. 研究結果

マイクロアレイアッセイにより同定された合計 6,599 個の non-coding RNA クラスターが GeneChip マイクロアレイ分析で検証された。我々は、有意水準 ($p < 0.05$) を有し、かつ fold change の基準値を上回る血清 miRNA として、miR-548a, miR-1281, miR-463, miR-4646-3p, および miR-4659a の 5 つのを miRNA を同定した。5 つの miRNA のうち 2 つ(miR-548a 及び miR-4646-3p) は、対照と比較して HCC 群において upregulation された一方で、miR-1281, miR-4634, および miR-4659a を含む 3 つの miRNA は downregulation された。HBV 感染症患者に発症した初期段階の HCC を推定するバイオマーカーの候補としてこれら 5 つの miRNA を選択した。

IV. 結 語

HBV 感染者に合併した早期肝細胞癌の血清において発現が変動する miRNA を同定した。これらの miRNA は、現在の臨床上十分な診断能のある血清マーカーの存在しない早期肝細胞癌に対する biomarker の候補として有望であり、今後大規模な集団において有用性を評価する必要がある。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 菅井 有 (病理診断学講座)

副査 准教授 宮坂 昭生 (内科学講座消化器内科肝臓内科分野)

副査 教授 鈴木 啓二郎 (臨床検査医学講座)

肝細胞癌の予後は未だ不良で早期の肝細胞癌の病態解明が急がれている。しかしながら早期の肝細胞癌の分子異常については十分に明らかにされていない。近年 micro RNA (miRNA) の異常が癌の発生・進展に関与していることが指摘されており、肝細胞癌においても miRNA の異常が報告されている。しかしながら早期肝細胞癌における miRNA 異常の報告は少ない。一方血清の分子マーカーを癌の早期発見に用いる試みが行われており。血清 miRNA のにおける役割が注目されている。そこで本研究では HBV 感染早期肝細胞癌における特異的血清 miRNA 異常を明らかにすることを目的とした。方法であるが早期肝細胞癌の血清から RNA を抽出し網羅的 miRNA 解析 (Thermo Fisher) を行った。その結果から miRNA は miR-548a, miR-1281, miR-463, miR-4646-3p, および miR-4659a の 5 つの miRNA が同定された。これらの miRNA のうち miR-548a 及び miR-4646-3p は、対照と比較して HCC 群において有意に上昇していた。残る miR-1281、miR-4634, および miR-4659a は HCC 群で有意に低下していた。上記 miRNA は HBV 感染早期肝細胞癌と関連する miRNA の可能性が示唆された。

試験・試問の結果の要旨

研究の科学的, 臨床的, 社会的意義について試問を行い, 適切な解答を得た. 学位に値する学識を有していると考え.

また, 学位論文の作成にあたって, 剽窃・盗作等の研究不正はないことを確認した.

参考論文

- Occurrence of hepatocellular carcinoma 24 years after successful interferon therapy in a patient with chronic hepatitis C: a case report (C型慢性肝炎患者におけるインターフェロン治療の成功から24年後の肝細胞癌の発生: 症例報告) (吉田雄一, 他11名と共著)
- 消化管出血を契機に発見され, 内視鏡的に切除できた十二指腸血管腫の1例 (米澤美希, 他5名と共著)