

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業  
(患者層別化マーカー探索技術の開発)  
事後報告書



## I 基本情報

研究開発課題名 : 医療ニーズの高い特定疾患・薬剤に対する患者層別化基盤技術の開発  
分担研究開発課題名: (日本語) 新たな肝がん高危険群患者層別化マーカーの開発実用化研究  
(英語) Development of a novel risk prediction marker of hepatocellular carcinoma

研究開発実施期間: 令和元年10月30日 ~ 令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 金子 周一  
(英語) Shuichi Kaneko

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:  
(日本語) 国立大学法人金沢大学 医薬保健研究域医学系・教授  
(英語) Faculty of Medicine, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences,  
Kanazawa University

## II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

研究開発項目 (1) 血清 LG2m を用いた肝発がん予測研究

本研究では、血清 LG2m 測定で肝発がんを予測できるか否か、その有用性を HCV 駆除後の患者、HBV 感染患者、および脂肪肝と密接に関連する生活習慣病患者を対象に前向きに大規模コホートで検証し、血清 LG2m による肝がん早期診断実用化を促進する。令和4年3月までに HCV 患者 995 例、HBV 患者 1026 例、アルコール肝障害患者 648 例、糖尿病患者 2899 例、脂肪肝患者 2285 例、延べ 8128 例の登録が終了した。登録された全患者については血清 M2BPGi、AFP、PIVKA-II、CEA、CA19-9、LG2m のデータが測定され、データマネジメントセンターですべての患者情報が連結管理された。また、すべての患者血清はバイオバンク登録され、ディープフリーザーで保管された。先行研究として行った 399 例の C 型慢性肝炎のコホートにおける肝発がん予測前向き多施設共同研究で、血清 LG2m 上昇が HR19.6 とこれまで

に報告されている肝線維化や血小板低下に比べても、極めて高い独立した肝発がん予測因子であることを本研究成果として明らかにした。血清 LG2m 測定は本邦アカデミア発の技術であり、国際的にも競争力があるアボットジャパンと共同で開発研究を行っている。本研究では全世界に存在する 1 億 7 千万人の HCV 患者にとって、肝発がんリスクを評価することが可能な点で医療分野の進展、社会的ニーズに対応した新技術であることを明確にした。さらに本研究コホートの維持により、HBV、アルコール、糖尿病、脂肪肝における肝発がんリスクが将来明らかになれば、本邦での検診項目への追加など、さらなる展開、社会実装が期待される。

#### 研究開発項目（2） LG2m 発現制御機構の解明と新たな肝発がんバイオマーカーの探索

肝組織のエピゲノム、がん化シグナル情報を網羅的に取得、血清 LG2m との関連を解析し LG2m 上昇の分子基盤を解明、新規肝がん高危険群層別化マーカーの同定、血清 LG2m 測定の意義を明確化し、より高精度な肝発がん予測マーカー、肝発がん予防薬スクリーニングシステムの開発につなげる。血清 LG2m が上昇している (>60pg/ml) 肝がん患者では、局所治療後に遠隔転移を高頻度に起こすこと、細胞の遊走や浸潤プログラムの活性化が認められることを見出し、本研究成果として報告した。さらに、血清 LG2m が上昇している (>60pg/ml) 肝がんはこれまでに国際的に認められている肝がん分子分類において予後不良なサブタイプを臨床的に診断することが可能であること、が示された。肝がん患者 100 例の血清ラミン $\gamma$ 2 単鎖測定データ、がん部および非がん部の DNA メチル化アレイ解析、遺伝子発現解析、リン酸化シグナルアレイ解析を行い、血清 LG2m の上昇に関わる可能性があるいくつかの幹細胞マーカーの発現変動ががん部において認められ、新たな肝発がんバイオマーカー候補になる可能性が示唆された。今後本研究データベースを用いて、肝がんの悪性度、肝発がんを予測する新たなバイオマーカー候補の探索に極めて重要なデータベースが構築された。

#### 研究開発項目（3） LG2m のバイオロジー研究

マウスモデルや培養細胞系を用いて LG2m の発現制御機構、発現細胞の可視化を行い、LG2m の生理的並びに肝発がん過程における発現状態を解析、LG2m の過剰発現が細胞機能に与える影響を明らかにし、LG2m を標的とした発がん予防薬開発に向けた基盤情報の確立を行う。ヒト LAMC2 プロモーターのクローニングを行い、下流にヒト LAMC2 cDNA を挿入、さらにその下流に IRES-蛍光タンパク (fluorescence protein; FP) を配したバイシストロニック発現ベクターを作製、ノックインマウスの作製を行った。しかしながら繁殖が進みにくいことが判明した。原因については不明であるが、以上の経過から現時点でも LAMC2 プロモーター活性のある細胞の部位についてノックインマウスで解析することはできていない。当初予定していた Cre-loxP システムを用いたコンディショナルヒト LAMC2 過剰発現マウスについては、経過で LAMC2 融合遺伝子(LG2m-F)の発見につながり、LG2m-F 過剰発現マウスの作製に変更となった。ALB-Cre マウスおよび CK19-Cre マウスと交配し、肝細胞および胆管細胞特異的な LG2m-F 過剰発現マウスの作製に成功した。

#### 研究開発項目（4） 血清 LG2m を測定する診断薬等の開発

血清 LG2m 測定診断薬のプロトタイプを 3 年間で 6 ロット作製し、8,000 検体以上の測定を AFP, PIVKA-II, CEA, CA19-9 とともに完了した。

#### 研究開発項目（5） LAMC2 融合遺伝子 (LG2m-F) を標的としたがん診断治療薬等の開発

LAMC2 融合遺伝子(LG2m-F)の発見から、この遺伝子産物を標的にしたがん診断治療薬の開発が可能かにつき研究開発を行った。さらに、超解像顕微鏡解析を肝がんおよび膵がん細胞株を用いてラミニン $\gamma$ 2染色を行い、細胞膜表面に存在することを同定、LG2m および LG2m-F が新たながん診断、治療標的になりうることを明らかにした。

Serum laminin  $\gamma$ 2 monomer as a novel predictive biomarker for hepatocellular carcinoma. A multicenter prospective observational study.

Worldwide, hepatocellular carcinoma (HCC) is the second-most lethal cancer after pancreatic cancer, with a 5-year survival of 18%. Early detection of HCC prolongs patient survival. Risk factors for HCC development include hepatitis B and C virus infection, alcohol abuse, and metabolism associated fatty liver diseases. We previously reported that laminin  $\gamma$ 2 is strongly expressed as a monomeric form at the invasive front in tumor cells but not in normal cells. Recently, we developed a chemiluminescent immunoassay (CLIA) to detect the laminin  $\gamma$ 2 monomer (LG2m), but not trimeric Ln-332  $\gamma$ 2, in a highly sensitive and specific manner using a fully automated detection machine Architect. Here we try to test the ability of serum LG2m levels to predict HCC development in hepatitis B or C virus infected patients, alcoholic liver disease patients, fatty liver and/or diabetes patients with age fifty years old or elder. We recruited a total of 8,128 patients (HCV: 995 patients, HBV: 1,026 patients, Alcohol: 648 patients, Diabetes: 2,899 patients, Fatty liver: 2,285 patients) and registered using EDC system. We measured the serum LG2m, AFP, PIVKA-II, CEA, CA19-9, and M2BPGi, and will follow the clinical outcome of registered patients in a prospective manner. Our independent previous study recruiting 399 HCV patients who cleared the viremia (sustained virological response; SVR) (median follow-up time of these patients: 30 months) indicated that HCC incidence at 12, 24, and 36 months was 1.1%, 1.7%, and 4.6%, respectively. Elevated LG2m at SVR was associated with significantly increased risk of HCC (HR 19.6, 95% confidence interval [CI] 5.2–74.6,  $P < 0.001$ ).

We performed DNA methylation and gene expression analysis at genome-wide as well as proteome analysis using 100 HCC samples and adjacent non-cancerous liver tissues with serum LG2m information to identify potential biomarkers deregulated in LG2m-positive HCC. The database and biobank developed here will facilitate the development of HCC prediction markers in future. We further developed mouse model to evaluate the effect of LG2m overexpression in hepatocyte or cholangiocyte on HCC development. This animal model will clarify the role of LG2m on liver biology in future.

Prototype diagnostic kit evaluating the serum LG2m was developed by Abbott Japan, and its stability and reproducibility was evaluated for 12 months. PMDA approval of this kit may stratify the high risk group of HCC development in patients with hepatitis virus infection, alcoholic abuse, and metabolism associated fatty liver disease.