

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16956

研究課題名（和文）C型慢性肝疾患における肝発がんおよび肝線維化に關与する新規バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Search for novel biomarkers involved in hepatocarcinogenesis and liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C

研究代表者

田畑 優貴（Tahata, Yuki）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00838047

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：臨床情報を用いた研究に関しては、大阪大学と関連病院で構成される多施設共同研究のコホートを用いて、直接作用型抗ウイルス薬（DAA）によりウイルス排除（SVR）が得られた約2,000例のC型慢性肝疾患において、肝発がんリスク因子を明らかにした。また、約1,600例の肝線維化非進展例において、SVR後の肝発がん予測モデルを作成しその有用性を明らかにした。血清エクソソームを用いた研究に関しては、大阪大学医学部附属病院にてDAA治療でSVRが得られたC型慢性肝疾患の内、肝生検により肝線維化が評価された症例において、新規肝線維化マーカーとして血清中のSAPとPPBPが有用であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DAA治療でほとんどのC型慢性肝疾患患者においてSVRの達成が可能となった。しかし、多数のSVR症例に対して一様に肝癌サーベイランスを行うのは非効率的である。本研究ではSVR後肝癌予測スコアを作成しその有用性を明らかにした。本予測スコアにより効率的な肝癌サーベイランスが可能となりその社会的意義は大きい。また、肝線維化は肝癌の重要なリスク因子である。現在、肝線維化診断の基準は肝生検であるが、侵襲性の問題等があり非侵襲的な診断法の開発が望まれている。本研究では新規バイオマーカーとして血清中のSAPおよびPPBPが有用であることが明らかとなりその学術的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：For studies using clinical data, a multicenter cohort consisting of Osaka University Hospital and affiliated hospitals was used to identify risk factors for hepatocellular carcinoma occurrence in approximately 2,000 patients with chronic hepatitis C who had achieved sustained virologic response (SVR) with direct-acting antivirals (DAAs). In addition, we developed a model for predicting hepatocellular carcinoma occurrence after SVR in approximately 1,600 patients without advanced liver fibrosis and clarified its usefulness. For a study using serum exosomes, we found that serum SAP and PPBP were useful as new markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C who had achieved SVR after DAA treatment at Osaka University Hospital and whose liver fibrosis was assessed by liver biopsy.

研究分野：肝炎、肝癌

キーワード：DAA SVR C型慢性肝炎 肝癌 肝線維化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus, HCV) に感染すると、約 30%の症例では自然治癒が認められるが、約 70%の症例では慢性肝炎へと移行する。慢性肝炎では、肝線維化が進行し、長期の経過で肝硬変に進行する。肝硬変では年率 5-8%で肝細胞がんを併発するため、肝線維化抑止および肝発がん抑止を目的とした抗ウイルス療法が行われてきた。

近年、HCV に直接作用する direct-acting antiviral agents (DAAs) が登場し、高率にウイルス学的著効 (sustained virologic response, SVR) が可能となった (1)。また、我々は従来の抗ウイルス療法である interferon (IFN) 治療において、ウイルスの排除が肝発癌を抑制することを報告してきた (2)。一方で、DAA 治療においては治療導入後早期に肝発癌を認めたとの報告があり (3)、DAA 治療による SVR 症例においても、IFN 治療と同等の肝発癌抑制効果を有するのかという点が残された問題である。我々は大阪大学および関連病院で構成される多施設共同研究において、IFN 治療で SVR が得られた約 2,000 例と DAA 治療で SVR が得られた約 1,800 例を比較し、propensity score を用いて患者背景を調整したコホートにおいては、短期観察期間での肝発癌率に差が認められなかったことを報告している (4)。しかし、現段階では DAA 治療群の観察期間は 2 年程度と IFN 治療群 (観察期間中央値: 3.5 年) に比し短く、より長期間での比較検討が必要である。また、DAA 治療で SVR が得られた多数の患者に対して、一様に発がんサーベイランスを行うことは非効率的であり、医療経済的にも問題である。現在、DAA 治療後の肝発癌リスク因子としては、高齢者、肝硬変、治療終了時の alpha-fetoprotein (AFP) 高値等が報告されている (5,6) が、既存の因子で、肝発がんリスクの高い症例を十分に囲い込むことは困難である。

一方、肝線維化に関して、IFN 治療で SVR が得られたにもかかわらず、肝線維化が改善しない症例が一定の割合で存在することが報告されている (7)。既存の肝線維化マーカー (α型コラーゲン・7S 等) は、慢性肝疾患の自然経過における肝線維化を示すバイオマーカーではあるが、HCV 排除後の肝線維化の評価に有用であるかは不明である。

このように既存の因子では、発癌リスクの高い集団、あるいは線維化が進行する集団を十分に囲い込むことは困難である。新規バイオマーカーの探索により、このような集団の囲い込みができれば、効率的なサーベイランスが可能となり、医療の効率化、医療費の抑制につながることを期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、DAA 治療で SVR が得られた C 型慢性肝疾患において、肝発癌および肝線維化に関する臨床因子および新規バイオマーカーを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 大阪大学では、関連病院で構成される多施設共同研究 Osaka Liver Forum (OLF) を構築しており、国内最大規模の C 型慢性肝疾患患者のコホートを有している。OLF には、DAA 治療が行われた症例として約 3,000 例が前向きに登録されており、プロトコルに従って臨床データおよび肝組織サンプルおよび血清サンプルが治療前から経時的に収集されている。まず、これらの症例の内、DAA 治療で SVR が得られた肝癌既往歴の無い C 型慢性肝疾患 2209 症例を対象として、training set (1473 例) と validation set (736 例) に分け、training set において SVR 後肝発癌

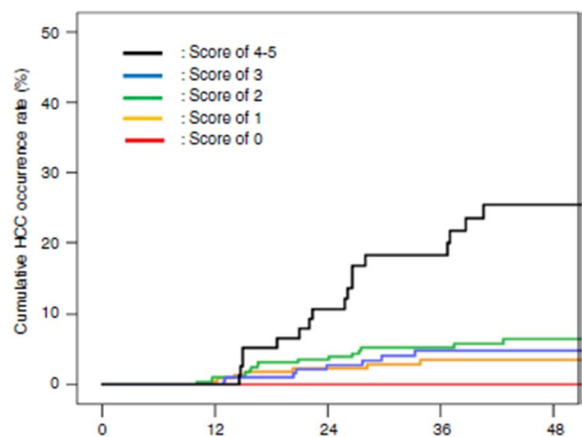
に關与する因子を同定し、それらを組み合わせた予測モデルを作成した。さらに、その有用性を validation set において検証した。次に、肝発癌リスクが低い肝線維化非進展例においては、SVR 後の肝癌サーベイランスを中断できる可能性がある。そこで、DAA 治療で SVR が得られた肝癌既往歴が無く肝線維化が進展していない(FIB-4 index<3.25)C 型慢性肝疾患 1682 症例を対象として、training set(1122 例)と validation set(560 例)に分け、training set において SVR 後肝発癌に關与する因子を同定し、それらを組み合わせた予測モデルを作成した。さらに、その有用性を validation set において検証した。

(2) 大阪大学医学部附属病院において、DAA 治療で SVR が得られた C 型慢性肝疾患症例の内、DAA 治療前に肝生検による肝線維化の評価が可能であった 134 例において、54 例(F1/2/3/4 : 27/12/7/8)を探索コホート、80 例(F1/2/3/4 : 20/20/20/20)を検証コホートとし、血清中の細胞外小胞(extracellular vesicle, EV)のプロテオーム解析を施行した。肝線維化進展に従って有意に変動する EV 中のタンパク質を同定し、新たな肝線維化マーカーとしての有用性を検証コホートの血清中 EV および血清にて検証した。

#### 4 . 研究成果

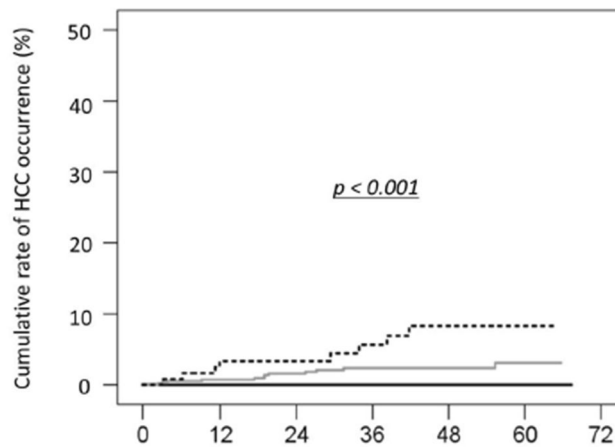
(1) まず、全体の検討では、training set(1473 例)において観察期間 40 ヶ月 (DAA 開始時から) で 52 例の SVR 後肝発癌を認め、累積肝発癌率は 3 年で 3.6%であった。SVR 後肝発癌に關与する因子についてコックス比例ハザードモデルで解析すると、多変量解析で治療前 body mass index( $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>, hazard ratio (HR) : 2.010)、治療前 FIB-4 index( $\geq 3.25$ , HR : 4.247)、SVR 時アルブミン値(<4.0 g/dl, HR : 2.273)、SVR 時 AFP 値( $\geq 5.0$  ng/ml, HR : 2.312)が肝発癌に關与する有意な因子として抽出された。FIB-4 index を 2 点、他の 3 因子を 1 点とし合計スコア 0 から 5 点で SVR 後肝発癌予測モデルを作成した。

ROC 曲線による予測モデルの至適 cut off 値は 2 点であった。Validation set(736 例)において観察期間 40 ヶ月 (DAA 開始時から) で 24 例の SVR 後肝発癌を認め、累積肝発癌率は 3 年で 2.5%であった。Cut off 値 2 点とした時の SVR 後肝発癌予測モデルの感度および陰性的中率は 3 年後肝発癌において 71.4%/98.0%であった。DAA 治療で SVR が得られた症例において、本予測モデルにより、効率的な SVR 後肝発癌サーベイランスが可能となることが明らかとなった(8)。



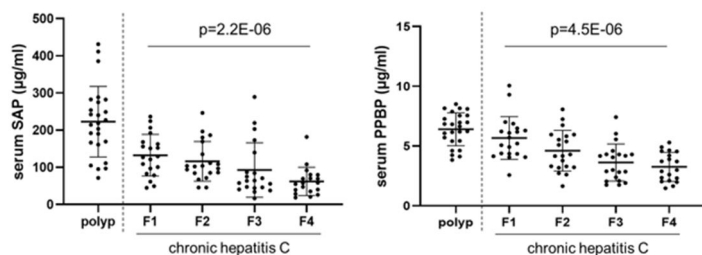
次に、肝線維化非進展例(FIB-4 index<3.25)の検討では、training set(1122 例)において観察期間 43.1 ヶ月 (SVR 判定時から) で 21 例の SVR 後肝発癌を認め、累積肝発癌率は 3 年で 1.9%、5 年で 2.7%であった。SVR 後肝発癌に關与する因子についてコックス比例ハザードモデルで解析すると、多変量解析で年齢( $\geq 65$  years, HR : 3.377)、SVR 時 ALT 値( $\geq 30$  U/l, HR : 6.983)、SVR 時 AFP 値( $\geq 5.0$  ng/ml, HR : 4.921)が肝発癌に關与する有意な因子として抽出された。各因子を

それぞれ1点とし合計スコア0から3点で SVR 後肝発癌予測モデルを作成した。Validation set(560例)において観察期間 39.8 ヶ月 (SVR 判定時から)で7例のSVR 後肝発癌を認め、累積肝発癌率は3年で1.6%、5年で2.0%であった。肝発癌率を予測スコア別に検討すると、スコア 2-3 点の症例では、3年で7.1%、5年で7.1%、スコア 1 点の症例では、3年で1.6%、5年で2.4%であり、スコア 0 点の症例からは



肝発癌を認めなかった。本予測スコアにより、肝発癌リスクが低いとされる肝線維化非進展例において、更なる肝発癌リスクの層別化が可能となることが明らかとなった(9)。

(2) 探索コホート 54 例の血清から精製した EV を用いてショットガンプロテオミクスを行い、974 個のタンパク質を同定した。線維化マーカー候補タンパク質の選定/検証基準は、肝線維化の進展に従って発現量が有意に増加もしくは減少する傾向を認め、さらに F1-2 群と F3-4 群とで有意に発現量が異なるものとし、9 つのタンパク質がこれらの基準を満たした。これらの 9 つの肝線維化マーカー候補タンパク質についてタンパク質ごとにそれぞれ 3 種類の特異的なペプチドを設定し、検証コホートから精製した EV を用いてターゲットプロテオミクスを行った。serum amyloid P component(SAP)と pro-platelet basic protein(PPBP)は、線維化進展に従って有意に低下し、F1-2 群に比して F3-4 群で有意に低値であった。SAP と PPBP の F3 以上の線維化に対する診断能は FIB-4 index やヒアルロン酸、型コラーゲン 7S などの既存の線維化マーカーと同等であった。さらに血清における SAP と PPBP の有用性を検証コホート 80 例で検討した。血清中の SAP および PPBP は EV 中の SAP、PPBP とそれぞれ良好な相関を認め、線維化進展に従い有意に減少した。血清 SAP および PPBP は F2 以上、F3 以上、F4(肝硬変)に対して、他の線維化マーカーと同等の診断能を有していた(10)。



#### <引用>

1. Tahata Y, et al. Glob Health Med. 2021 Oct 31;3(5):321-334.
2. Oze T, et al. Clin Gastroenterol Hepatol. 2014 Jul;12(7):1186-95.
3. Conti F, et al. J Hepatol. 2016 Oct;65(4):727-733.
4. Tahata Y, et al. Hepatol Res. 2020 Mar;50(3):313-320.
5. Li DK, et al. Hepatology. 2018 Jun;67(6):2244-2253.
6. Ogawa E, et al. Aliment Pharmacol Ther. 2018 Jan;47(1):104-113.
7. George SL, et al. Hepatology. 2009 Mar;49(3):729-38.
8. Tahata Y, et al. Aliment Pharmacol Ther. 2021 Nov;54(10):1340-1349.
9. Tahata Y, et al. Hepatol Res. Oct;52(10):824-832.
10. Shirai K, et al. PLoS One. 2022 Jul 7;17(7):e0271020.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tahata Yuki, Sakamori Ryotaro, Yamada Ryoko, et al.	4. 巻 54
2. 論文標題 Prediction model for hepatocellular carcinoma occurrence in patients with hepatitis C in the era of direct acting anti virals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Alimentary Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1340 ~ 1349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/apt.16632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tahata Yuki, Sakamori Ryotaro, Urabe Ayako, Yamada Ryoko, Ohkawa Kazuyoshi, Hiramatsu Naoki, Hagiwara Hideki, Oshita Masahide, Imai Yasuharu, Kodama Takahiro, Hikita Hayato, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 50
2. 論文標題 Clinical outcomes of direct acting antiviral treatments for patients with hepatitis C after hepatocellular carcinoma are equivalent to interferon treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 1118 ~ 1127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tahata Yuki, Sakamori Ryotaro, Yamada Ryoko, et al.	4. 巻 52
2. 論文標題 Risk of hepatocellular carcinoma after sustained virologic response in hepatitis C virus patients without advanced liver fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 824 ~ 832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shirai Kumiko, Hikita Hayato, Sakane Sadatsugu, Narumi Ryohei, Adachi Jun, Doi Akira, Tanaka Satoshi, Tahata Yuki, Yamada Ryoko, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Mita Eiji, Tomonaga Takeshi, Takehara Tetsuo	4. 巻 17
2. 論文標題 Serum amyloid P component and pro-platelet basic protein in extracellular vesicles or serum are novel markers of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0271020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0271020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田畑優貴、阪森亮太郎、竹原徹郎
2. 発表標題 DAA治療時代におけるSVR後肝発癌予測モデルの検討
3. 学会等名 第25回日本肝臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Tahata, Ryotaro Sakamori, Ryoko Yamada, et al.
2. 発表標題 Risk factor of hepatocellular carcinoma occurrence after sustained virologic responses in hepatitis C virus patients without advanced liver fibrosis
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------