

令和元年6月17日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09349

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーを用いた抗ウイルス治療後における肝発癌リスクの包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of hepatocarcinogenesis risk after antiviral therapy using next-generation sequencing technology

研究代表者

前川 伸哉 (Maekawa, Shinya)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：70397298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 抗ウイルス治療の進歩したウイルス性肝炎における現在最大の問題は、ウイルス消失後肝癌である。本検討では、次世代シーケンス技術を用いたウイルスと宿主遺伝子の解析による肝発癌リスクの解明を目的とした。

C型肝炎では、抗ウイルス治療前のHCVコア、NS5A変異と宿主因子IL28B SNPの組み合わせで治療後肝癌発生率が異なることを見出した。B型肝炎では、肝病態の進展に関与するpreS領域132-141アミノ酸領域を同定した。また抗ウイルス治療後肝発癌症例におけるhTERT変異の重要性を明らかとし、バイオマーカーとして、血液を用いたリキッドバイオプシーによるhTERT変異検出系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、抗ウイルス治療後肝発癌・病態進展リスクとしてのウイルスゲノム領域あるいは宿主領域がC型肝炎・B型肝炎において明らかになり、また肝癌診断・治療モニターとしてのリキッドバイオプシーシステムの構築が可能であった。これらは肝癌実臨床における有用なバイオマーカーとなり、これらを用いることでHCC発見のための効率よいサーベイランスの実施、あるいは発癌症例に対する適切な治療法選択が可能となることが考えられた。一方、これらの多くは宿主の免疫状態と関連する因子であり、免疫制御が肝癌制御のキーとなることが示され、学術的にも重要な意義が得られた。

研究成果の概要(英文)： The major issue in the era of advanced antiviral therapy is hepatocellular carcinoma (HCC) developing after antiviral therapy. In this study, we aimed to clarify HCC risk by analysis of viral genome and host gene using next-generation sequencing technology.

In hepatitis C, we found that viral factors (HCV core and NS5A mutation) and host factor (IL28B SNP) significantly changed the incidence of HCC after treatment. In hepatitis B, we identified the preS region 132-141 amino acid region involved in the development of liver disease advancement. In addition, we clarified the importance of hTERT promoter mutation in HCCs occurring after antiviral treatment, and constructed a hTERT promoter mutation detection system by liquid biopsy.

研究分野：消化器内科

キーワード：抗ウイルス治療後肝癌 次世代シーケンス HBV HCV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

どのような症例が抗ウイルス治療後においても肝発癌リスクが高いのか、十分に明らかとなっていない。すなわち、近年の抗ウイルス治療の大幅な進歩により、大多数のウイルス肝炎症例においてウイルスの排除ないし肝炎の沈静化が可能となった。すなわちC型肝炎ウイルス(HCV)ではdirect acting antiviral agents (DAA)によりウイルスの排除、B型肝炎ウイルス(HBV)は核酸アナログにより肝炎の沈静化が可能となった。病態改善に伴って新規の肝癌患者数は大きな減少が見込まれるが、それでもなお肝発癌に進展する症例が一定の頻度で存在する。

肝癌早期診断のためには、抗ウイルス治療奏功症例でも、すべて半年ごとの画像検査・血液検査が現時点では必須であり、医療経済上大きな問題になっている。一方、半年ごとの検査を行っていても突然進行癌が診断される場合も散見され、抗ウイルス治療奏功症例における適切な肝発癌予測バイオマーカーの開発が強く望まれている。

抗ウイルス治療後における発癌リスクとして、高齢・男性・肝線維化・治療後のAFP値など、肝炎ウイルス発癌における既知のリスク因子に加え、最近では脂肪肝・飲酒・肥満・糖尿病の合併など代謝性因子の関与が臨床的には示されつつある。しかしながら、治療後肝発癌におけるこれら因子の関与を含めた分子基盤の検討は、未だほとんどなされていない。

本研究では肝癌を含む肝組織・血液検体を対象に、次世代シーケンス技術を中心として用い、肝炎ウイルスゲノムと宿主ゲノム、および臨床情報を統合して包括的な解析をすることにより抗ウイルス治療後の肝発癌における分子生物学的機序明らかとしてゆく。さらにこれらの解析を通じて、簡便・有用な肝発癌予測バイオマーカーを開発する。

申請者らはこれまで、HCV、HBV全長ゲノムのdirect、あるいはdeep sequenceの網羅的解析を行い、HCVコア、NS3、NS5A遺伝子変異と治療効果、肝発癌、HBVにおけるpreS遺伝子変異と治療抵抗性、肝発癌との関連について明らかとしてきた。

またdeep sequence解析にて肝癌組織中のhTERT、カテニン、P53体細胞変異の重要性、さらに生殖細胞系列SNPにおけるMICA、DEPDC5と肝発癌の関連を報告してきた。本検討では、これまでの申請者の研究を基盤として、今後の中心的な課題となる抗ウイルス治療後の肝発癌に焦点を絞って、解析を進めてゆくものであり、結果は臨床に応用される重要な成果となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、抗ウイルス治療後に肝発癌にいたる症例のリスクを、次世代シーケンス技術による肝炎ウイルスゲノムおよび宿主ゲノム情報を統合して解析することにより、明らかとしてゆく。

抗ウイルス治療によって大きく進歩したHBV、HCV治療において残された最大の問題は、抗ウイルス治療後に発生する肝癌の克服である。本検討では、申請者らが培ってきた肝炎ウイルスおよび宿主遺伝子における次世代シーケンス技術を用い、肝発癌のリスク、治療標的分子、予後を明らかとするものである。

3. 研究の方法

本研究では、抗ウイルス治療後肝発癌症例の検体（白血球・癌部と非癌部肝組織）を用い、ウイルスゲノムならびに宿主ゲノム双方において次世代シーケンスを行い、治療後肝発癌の分子基盤を明らかとする。

すなわちHCVは治療前のコアとNS5A変異、HBVではpreS変異、X遺伝子のメチル化、HBV-cccDNA定量ならびに、宿主へのHBVの組み込みの定量的評価を行い、宿主ゲノムについては特に肝癌症例の周辺非癌部肝組織に着目して（白血球ゲノムと比較した）遺伝子変異の解析を行い、治療後肝発癌症例の非癌部肝組織における遺伝子変異パターンを抽出する。

上記により明らかとなった治療後肝発癌の分子基盤情報をもとに、抗ウイルス治療後の肝発癌リスク予測において有用な、血液を用いた簡便なバイオマーカーの開発を行う。

4 . 研究成果

C型肝炎においては、**直接抗ウイルス薬**(direct acting antiviral agents; DAA)によりウイルスが消失した446症例において肝発癌リスクについてウイルスゲノムと宿主因子について検討を行い、その結果、**治療前のコア70番変異と宿主因子IL28B SNPの組み合わせ**によって、ウイルス消失後の肝発癌発生率が大きく異なることを見出した。興味深いことに**インターフェロン抵抗性と関連するウイルス因子コア70番変異型とインターフェロン感受性と関連する宿主因子IL28B TTの組み合わせを治療前に有する場合に最も肝発癌が生じやすい**ことを明らかとした。

B型肝炎においては、**核酸アナログによるウイルス治療中であっても、HBs抗原とHBコア関連抗原定量検査の組み合わせにより、肝発癌高リスク症例を囲みうる**こと、またこれらのHBs抗原、HBコア関連抗原定量値の変化にはpreS/S領域が重要な意義をもち、シーケンス情報が重要なこと、またpreS/Sゲノム領域において**最も病態と関連するpreS aa.132-141領域をdeep sequenceにより明らかとした**。

肝発癌ゲノムについては、**抗ウイルス治療後肝発癌**では肝発癌組織におけるhTERTプロモーターが最も変異頻度が高い癌関連遺伝子変異であること、肝発癌診断・治療経過におけるバイオマーカーとして、**患者血清(血漿)を用いたリキッドバイオプシーによるhTERTプロモーター変異検出系を構築**した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Suzuki Y, Maekawa S, Komatsu N, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Matsuda S, Muraoka M, Nakakuki N, Shindo H, Amemiya F, Takano S, Fukasawa M, Nakayama Y, Yamaguchi T, Inoue T, Sato T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. Hepatitis B virus (HBV)-infected patients with low hepatitis B surface antigen and high hepatitis B core-related antigen titers have a high risk of HBV-related hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2019;49:51-63. DOI: 10.1111/hepr.13277. (査読有)
2. Suzuki Y, Maekawa S, Komatsu N, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Matsuda S, Muraoka M, Nakakuki N, Amemiya F, Takano S, Fukasawa M, Nakayama Y, Yamaguchi T, Inoue T, Sato T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. HBV preS deletion mapping using deep sequencing demonstrates a unique association with viral markers. *PLoS One* 2019;14:e0212559. DOI: 10.1371/journal.pone.0212559. (査読有)
3. Maekawa S, Sato M, Kuratomi N, Inoue T, Suzuki Y, Tatsumi A, Miura M, Matsuda S, Muraoka M, Nakakuki N, Amemiya F, Takano S, Fukasawa M, Nakayama Y, Yamaguchi T, Sato T, Sakamoto M, Murakawa M, Nakagawa M, Asahina Y, Enomoto N. Association between alanine aminotransferase elevation and UGT1A1*6 polymorphisms in daclatasvir and asunaprevir combination therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2018;53:780-786. DOI: 10.1007/s00535-017-1405-3. (査読有)
4. Maekawa S, Enomoto N. The "real-world" efficacy and safety of DAAs for the treatment of HCV patients throughout Japan. *J Gastroenterol* 2018;53:1168-1169. DOI: 10.1007/s00535-018-1493-8. (査読有)
5. Yamashita A, Tamaki M, Kasai H, Tanaka T, Otaguro T, Ryo A, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Tanaka J, Moriishi K. Inhibitory effects of metachromin A on hepatitis B virus production via impairment of the viral promoter activity. *Antiviral Res* 2017;145:136-145. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.08.001. (査読有)

6. Amano R, Yamashita A, Kasai H, Hori T, Miyasato S, Saito S, Yokoe H, Takahashi K, Tanaka T, Otaguro T, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K. Cinnamic acid derivatives inhibit hepatitis C virus replication via the induction of oxidative stress. *Antiviral Res* 2017;145:123-130. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.07.018. (査読有)
7. Matsuda S, Motosugi U, Kato R, Muraoka M, Suzuki Y, Sato M, Shindo K, Nakayama Y, Inoue T, Maekawa S, Sakamoto M, Enomoto N. Hepatic Amyloidosis with an Extremely High Stiffness Value on Magnetic Resonance Elastography. *Magn Reson Med Sci* 2016;15:251-252. DOI: 10.2463/mrms.ci.2015-0133. (査読有)

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 前川伸哉, 坂本穰, 榎本信幸
HCV治療におけるDAA治療の適正化-DAA耐性変異の検出と臨床的意義について
第102回日本消化器病学会総会
2016年
2. Yuichiro SUZUKI, Shinya MAEKAWA, Mitsuaki SATO, Masaru MURAOKA, Shuya MATSUDA, Natsuko NAKAKUKI, Yasuhiro NAKAYAMA, Taisuke INOUE, Minoru SAKAMOTO, Nobuyuki ENOMOTO
Mapping the region responsible for disease progression in the HBV
23rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HEPATITIS C VIRUS AND RELATED VIRUSES (国際学会)
2016年
3. Mitsuaki SATO, Shinya MAEKAWA, Natsuko NAKAKUKI, Shuya MATSUDA, Masaru MURAOKA, Yuichiro SUZUKI, Yasuhiro NAKAYAMA, Taisuke INOUE, Minoru SAKAMOTO, Nobuyuki ENOMOTO
23rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HEPATITIS C VIRUS AND RELATED VIRUSES
2016年
4. Shinya Maekawa, Minoru Sakamoto and Nobuyuki Enomoto
Deep sequencing analysis of cancer-related genes in early hepatocellular carcinoma in the livers with and hepatitis virus
第20回日本肝臓学会大会
2016年
5. 前川伸哉, 坂本穰, 榎本信幸
Deep sequenceと系統樹解析を用いたDAA耐性HCV由来の病態解析
第53回日本肝臓学会総会
2017年
6. 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸
次世代シーケンサーを用いたウイルス制御時代に発生する肝癌の癌関連遺伝子解析
第53回日本肝臓学会総会
2017年
7. 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸
次世代シーケンサーを用いたウイルス制御時代に発生する肝癌の癌関連遺伝子解析
第103回日本消化器病学会総会

2017年

8. 村岡優, 前川伸哉, 榎本信幸,
ゲノム異常からみたDysplastic noduleの潜在的悪性度評価
第42回日本肝臓学会東部会

2018年

9. 村岡優, 前川伸哉, 榎本信幸,
HCCの多段階発癌におけるゲノム異常の意義
JDDW2018

2018年

10. Shinya Maekawa, Minoru Sakamoto, Nobuyuki Enomoto 口頭発表(International Symposium)
Investigation of viral factor associated with HCC occurrence after antiviral therapy through HCV
full-open reading frame analysis
JDDW2018

11. 2018年

前川伸哉, 坂本穰, 榎本信幸
全長HCVウイルスゲノム解析を用いた抗ウイルス治療後発癌におけるウイルス因子関与の検討
第54回日本肝臓学会総会
2018年

12. 村岡優, 前川伸哉, 榎本信幸

レーザーマイクロダイセクションを用いたHCCゲノムの検討
第54回日本肝臓学会総会
2018年

13. 村岡優, 井上泰輔, 中嶋奈津子, 松田秀哉, 佐藤光明, 中山康弘, 前川伸哉, 坂本穰, 榎本信幸

レーザーマイクロダイセクションを用いたHCCゲノムの検討
第54回日本肝臓学会東部会
2018年

14. 前川伸哉, 坂本穰, 榎本信幸

全長HCVウイルスゲノム解析による抗ウイルス治療後発癌におけるウイルス因子の検討
第104回日本消化器病学会総会
2018年

15. 鈴木雄一郎, 前川伸哉, 中嶋奈津子, 松田秀哉, 村岡 優, 佐藤光明, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本穰, 榎本信幸

HBe抗原陰性かつHBs抗原低値かつHBcr抗原高値は独立したHBV発癌の因子第104回日本消化器病学会総会
2018年

16. Shuya Matsuda, Shinya Maekawa, Natsuko Nakakuki, Masaru Muraoka, Yuichiro Suzuki, Mitsuaki Sato, Yasuhiro Nakayama, Minoru Sakamoto, Nobuyuki Enomoto

Serum HBV-RNA is useful marker for estimating the risk of developing HCC APASL STC
2018年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：榎本 信幸

ローマ字氏名：Enomoto Nobuyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。