

令和元年6月18日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09369

研究課題名(和文) SVR症例におけるマイクロRNAを用いた肝がんリスクマーカーの開発

研究課題名(英文) MicroRNA as a biomarker for prediction of HCC development after achieving an SVR

研究代表者

榎本 大(Enomoto, Masaru)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20423874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：C型慢性肝疾患において直接作用型抗ウイルス薬(DAA)によるウイルス学的著効(SVR)後の組織学的改善を評価した。51例のSVR後の肝生検において、炎症(A0/A1/A2/A3)は18/24/8/1例、線維化(F0/F1/F2/F3/F4)は3/20/15/9/4例であった。20例のpaired肝生検では、A因子は $1.3 \pm 0.6$ 、 $0.7 \pm 0.9$ と有意に改善( $p = 0.0043$ )、F因子は $1.8 \pm 1.0$ 、 $1.7 \pm 1.3$ と変化がなかった。現在、マイクロアレイ解析の結果、肝線維化、肝がんに関与していると想定されるマイクロRNAの血中での変化を、リアルタイムPCRを用いて定量的に解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国には500万人以上の慢性肝疾患患者が存在するが、その数は非アルコール性脂肪肝炎の増加に伴い増え続けている。また慢性肝疾患の終末像である肝硬変からは、例え肝炎ウイルスが制御されたとしても年率3～7%の割合で肝がんが起これば考えられている。肝がんは肝の壊死・炎症と線維化に密接に関係しており、肝線維化に関連するバイオマーカーの探索から肝がんの機構を明らかにし、がん高リスク患者を囲い込もうとする本研究の学術的意義は非常に高い。慢性肝疾患の制御は公衆衛生上も大変重要な国民的健康問題であり、臨床的にこれに利用可能なバイオマーカーを開発することが出来れば社会的に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Direct-acting antivirals (DAAs) can result in a sustained virologic response (SVR) in >90% of patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection. This study aimed to evaluate histological improvement after obtaining an SVR to DAAs in patients with HCV. Among 691 patients with chronic hepatitis C who had an SVR to DAAs, 51 underwent liver biopsy 41±20 weeks after the end of therapy. In 20 patients, liver biopsies obtained a median of 1.2 years before the start of treatment were available. Among the 51 patients who underwent post-SVR biopsies, the grade of inflammation was A0 in 18, A1 in 24, A2 in 8, and A3 in 1; the stage of fibrosis was F0 in 3, F1 in 20, F2 in 15, F3 in 9, and F4 in 4. In the 20 paired biopsies, the inflammation grade regressed ( $p = 0.0043$ ), but the fibrosis stage did not ( $p = 0.45$ ). Even if ALT become normal after having an SVR, significant histological inflammation was found in some patients. The improvement in liver fibrosis was not evident in the short term

研究分野：消化器内科

キーワード：C型肝炎

## 1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の人口動態統計によると、肝がんによる死亡は年間約3万人と悪性新生物の中では第5位を占めており、公衆衛生上も大変重要な国民的健康問題である。成因として最も多いのはC型肝炎ウイルス(HCV)感染によるものであり、依然として肝がん全体の60~70%を占めている。

経口IFNフリー治療によりC型慢性肝炎のほぼ100%に持続的ウイルス排除(SVR)が可能になったが、高齢化し肝線維化が進行した我が国の患者においては、SVR達成後も相当の割合で肝発がんが起こる。そこでSVR後に非侵襲的マーカーなどにより高リスク症例を囲い込む体制の構築が望まれる。

マイクロRNAは20~25塩基ほどの1本鎖のnon-coding RNAであり、相補的なメッセンジャーRNA(mRNA)との結合により翻訳を阻害する又はmRNAの分解を惹き起こすことにより遺伝子発現を抑制する。血中マイクロRNAはRNaseからの分解を免れ安定した状態で存在し、バイオマーカーとして利用できる可能性がある。我々はC型慢性肝炎の肝線維化過程においてマイクロRNAが深く関係することを明らかにした(Ogawa T, Enomoto M, et al. *Gut* 2012)。

## 2. 研究の目的

今回、我々はC型慢性肝炎・肝硬変からSVRを得た患者の肝組織、血液中で肝線維化の進展に関連して変動し、バイオマーカーとして利用可能なマイクロRNAを同定することを目的として、マイクロアレイ、リアルタイムPCRを用いて研究をおこなった。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体の採取とデータファイル作成

IFNフリー治療後のC型慢性肝炎・肝硬変患者において肝生検組織と血清の採取を進め、臨床背景(年齢、性別、血液生化学所見、ウイルス学的検査、病理学的検査)のデータファイルを作成した。

### (2) 病理組織学的診断とHCV RNA検出

SVR後の肝組織にも壊死・炎症が残存していた症例においては、脂肪肝炎の有無など肝障害を来し得る他要因を検索した。過去に治療前の肝生検組織が採られていた症例に関しては、治療前後の比較を行った。更にreal-time PCRを用いて、肝組織中のHCV RNAの検出も試みた。

### (3) 肝組織と血液中のマイクロRNAの比較

肝生検組織よりmirVana miRNA isolation kit(Applied Biosystems)を用いてRNAを抽出し、3D-Gene Human miRNA Oligo chip v10.1(東レ)を用いて肝内と血中のマイクロRNAの発現プロファイルを網羅的に解析した。マイクロRNAの発現は臓器別に異なったプロファイルを持っているが、肝組織では全マイクロRNAの約70%がmiR-122であり、炎症や肝の恒常性に重要な役割を果たしている。血液中での変動が肝組織での変動を反映するものがあれば、非侵襲的バイオマーカーとして利用価値が高いと考えられる。そこで肝組織において肝線維化の進展に伴って変動するマイクロRNAが、血液中でも同様の変化を示すか否か検討した。

マイクロアレイ解析の結果、肝線維化、肝発がんに関与していると想定されるマイクロRNAの血中での変化を、TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)を用いてリアルタイムPCRにより定量的に解析した。IFNベース治療症例の後向き検討、IFNフリー治療症例の前向き検討により、肝発がんリスクマーカーの候補を同定した。

### (4) 標的遺伝子の同定

得られたマイクロRNAに関しては、直接的なターゲットとなる配列を持つ遺伝子をmiRBase等のin silico解析により絞り込み、マイクロRNAと標的遺伝子の3'UTR領域の結合度を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 対象はSVRを獲得したALT正常化例のうち、同意が得られた51例(65±10歳、女性28例、ALT 19±12 U/L、血小板数 17.8±5.4 万/μL)に、治療終了後41±20週に肝生検を行なった。

(2) SVR後の肝生検では、壊死・炎症グレード(A0/A1/A2/A3)は18/24/8/1例、線維化ステージ(F0/F1/F2/F3/F4)は3/20/15/9/4例であった。鉄沈着グレード(G0/G1/G2/G3/G4)は29/10/6/5/1例、脂肪化グレード(S0/S1/S2/S3)は29/15/6/1例であった(図1)。中等度以

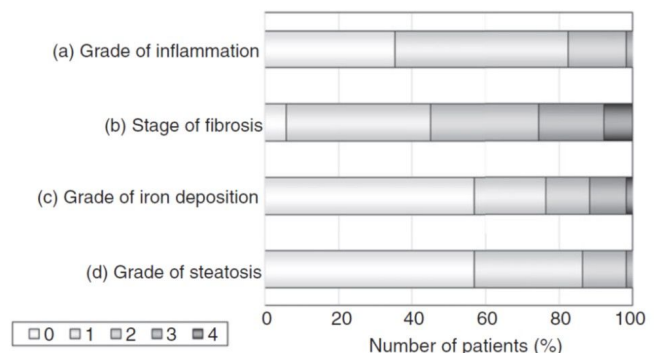


図1 DAAIによるSVR後に肝生検を行い得た51例の肝病理組織学的所見(a, 炎症グレード; b, 線維化ステージ; c, 鉄沈着グレード; d, 肝脂肪化スコア)

上の炎症 (A2) が残存していた 9 例のうち、4 例では S1~S3 の脂肪化 (脂肪化程度 5%) が観られた。20 例においては、治療開始 1.2 年前 (中央値) の肝生検標本との比較が可能であった (図 2)。その paired 肝生検標本では、炎症グレードは  $1.3 \pm 0.6$   $0.7 \pm 0.9$  (改善 13/不変 6/悪化 1 例) と有意に改善したが ( $p = 0.0043$ )、線維化ステージの変化  $1.8 \pm 1.0$   $1.7 \pm 1.3$  (改善 5/不変 11/悪化 4 例) は有意でなかった ( $p = 0.45$ )。鉄沈着グレードは  $1.2 \pm 1.2$   $0.5 \pm 0.5$  (改善 11/不変 7/悪化 2 例) と有意に改善していた ( $p = 0.0093$ ) が、脂肪化スコアの変化  $0.4 \pm 0.5$   $0.5 \pm 0.6$  (改善 1/不変 14/悪化 5 例) は有意でなかった ( $p = 0.10$ ) (United European Gastroenterol J 2018)。肝組織 HCV RNA のリアルタイム PCR を行ないえた 25 例では、いずれも陰性であった (Gastroenterology 2017)。

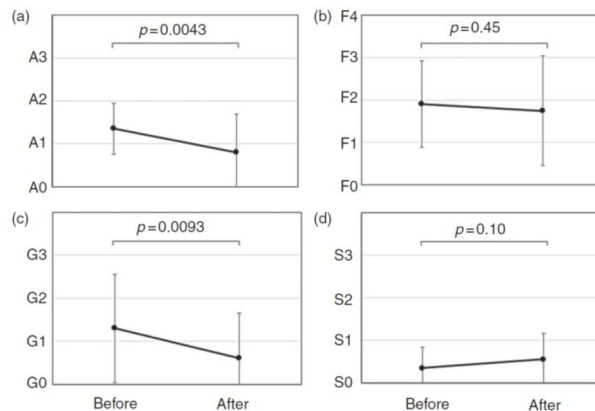


図2 DAAによるSVR前後に肝生検を行い得た20例の肝病理組織学的変化 (a, 炎症グレード; b, 線維化ステージ; c, 鉄沈着グレード; d, 肝脂肪化スコア)

(3) マイクロアレイ解析の結果、肝線維化、肝発がんに関与していると想定されるマイクロRNAの血中での変化を、リアルタイムPCRを用いて定量的に解析した (投稿準備中)。

以上より、DAAによりSVRを得ることにより肝内の壊死・炎症、鉄沈着の改善は明確に示された。肝線維化改善に関しては有意ではなかったが、これは観察期間が十分でないためと考えている。今後、より多数数を長期に観察しDAAによる肝線維化改善効果を証明する必要がある。一方、現在のところC型慢性肝炎・肝硬変からSVRを得た患者の肝組織、血液中で肝線維化の進展に関連して変動し、バイオマーカーとして利用可能なマイクロRNAを同定することは出来ていない。そのひとつの要因として、今回解析した患者群の中に線維化進展例の割合が低いことが挙げられる。出血傾向のみられる肝線維化進展例では、肝生検を避ける傾向があり、今後は肝がん切除標本の非がん部も対象に加えるのなどして研究を継続してゆきたい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

Enomoto M, Ikura Y, Tamori A, Kozuka R, Motoyama H, Kawamura E, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Murakami Y, Kawada N. Short-term histological evaluations after achieving a sustained virologic response to direct-acting antiviral treatment for chronic hepatitis C. United European Gastroenterol J. 2018 Nov; 6(9): 1391-1400、査読有り。

Enomoto M, Tateishi C, Tsuruta D, Tamori A, Kawada N. Remission of Psoriasis After Treatment of Chronic Hepatitis C Virus Infection With Direct-Acting Antivirals. Ann Intern Med. 2018 May 1; 168(9): 678-680、査読有り。

Kozuka R, Hai H, Motoyama H, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N, Tamori A. The presence of multiple NS5A RASs is associated with the outcome of sofosbuvir and ledipasvir therapy in NS5A inhibitor-naïve patients with chronic HCV genotype 1b infection in a real-world cohort. J Viral Hepat. 2018 May; 25(5): 535-542、査読有り。

Tamori A, Abiru S, Enomoto H, Kioka K, Korenaga M, Tani J, Enomoto M, Sugiyama M, Masaki T, Kawada N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Mizokami M. Low incidence of hepatitis B virus reactivation and subsequent hepatitis in patients with chronic hepatitis C receiving direct-acting antiviral therapy. J Viral Hepat. 2018 May; 25(5): 608-611、査読有り。

Motoyama H, Tamori A, Kubo S, Uchida-Kobayashi S, Takemura S, Tanaka S, Ohfuji S, Teranishi Y, Kozuka R, Kawamura E, Hagihara A, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. Stagnation of histopathological improvement is a predictor of hepatocellular carcinoma development after hepatitis C virus eradication. PLoS One. 2018 Mar 13; 13(3): e0194163、査読有り。

Tamori A, Hai H, Uchida-Kobayashi S, Enomoto M, Kozuka R, Motoyama H, Kawamura E, Hagihara A, Teranishi Y, Yoshida K, Morikawa H, Murakami Y, Kawada N. Outcomes for Cirrhotic Patients with Hepatitis C Virus 1b Treated with Asunaprevir and Daclatasvir Combination. Ann Hepatol. 2017 Sep - Oct; 16(5): 734-741、査読有り。

Kozuka R, Hai H, Teranishi Y, Motoyama H, Kawamura E, Hagihara A, Uchida-Kobayashi

S, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N, Tamori A. Correlation between polymorphism in the inosine triphosphatase and the reductions in hemoglobin concentration and ribavirin dose during sofosbuvir and ribavirin therapy. J Gastroenterol Hepatol. 2017 Aug; 32(8): 1495-1502、査読有り.

Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. Detection of HCV RNA in Sustained Virologic Response to Direct-Acting Antiviral Agents: Occult or Science Fiction? Gastroenterology. 2017 Jul; 153(1): 327-328、査読有り.

Yoshida K, Hai H, Tamori A, Teranishi Y, Kozuka R, Motoyama H, Kawamura E, Hagihara A, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. Long-Term Follow-Up of Resistance-Associated Substitutions in Hepatitis C Virus in Patients in Which Direct Acting Antiviral-Based Therapy Failed. Int J Mol Sci. 2017 May 3; 18(5). pii: E962、査読有り.

Tamori A, Murakami Y, Kubo S, Itami S, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Enomoto M, Takemura S, Tanahashi T, Taguchi YH, Kawada N. MicroRNA expression in hepatocellular carcinoma after the eradication of chronic hepatitis virus C infection using interferon therapy. Hepatol Res. 2016 Mar; 46(3): E26-35、査読有り.

〔学会発表〕(計7件)

Enomoto M, Ikura Y, Tamori A, Kozuka R, Motoyama H, Kawamura E, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Murakami Y, Kawada N. “Normal” ALT by central laboratory criteria but >30 U/L for males and >19 U/L for females is predictive of residual inflammation in liver biopsies after sustained virologic response to direct-acting antivirals for chronic hepatitis C. 69<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2018年11月9-13日(San Francisco, CA)

Enomoto M, Tamori A, Kozuka R, Motoyama H, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Murakami Y, Ikura Y, Kawada N. Short-term histological evaluations after achieving a sustained virological response to direct-acting antiviral treatment for chronic hepatitis C. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2017年10月20-24日(Washington DC, USA)

榎本大、村上善基、河田則文. DAA治療による肝線維化改善効果：非侵襲的評価、病理学的検討を含めて. 第21回日本肝臓学会大会 WS18. 2017年10月12-13日(福岡国際センター他[福岡市博多区])

榎本大、伊倉義弘、元山宏行、小塚立蔵、萩原淳司、藤井英樹、打田佐和子、森川浩安、村上善基、田守昭博、河田則文. C型慢性肝疾患に対するDAA治療前後の肝病理組織所見の変化について. 第24回日本門脈圧亢進症学会総会 WS4. 2017年9月14-15日(東京コンベンションホール[東京都中央区])

榎本大、田守昭博、河田則文. C型慢性肝疾患に対するDAA治療前後の短期的肝線維化改善効果について. 第53回日本肝臓学会総会 S2. 2017年6月8-9日(広島国際会議場他[広島市中区])

Enomoto M, Tamori A, Kozuka R, Motoyama H, Hagihara A, Fujii H, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Murakami Y, Kawada N. Changes in clinical and histological parameters predictive of liver fibrosis and/or HCC development after direct-acting antiviral treatment for chronic hepatitis C. Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Single Topic Conference. 2017年4月10-12日(Nagasaki, Japan)

榎本大、田守昭博、寺西優雅、元山宏行、小塚立蔵、川村悦史、萩原淳司、打田佐和子、森川浩安、村上善基、河田則文. C型慢性肝疾患に対するIFNフリーDAA治療前後の門脈圧に関連する検査値の変化について. 第23回日本門脈圧亢進症学会総会 PD1. 2016年9月9-10日(神戸国際会議場 [神戸市中央区])

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/syoukaki/hepatology/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：村上善基

ローマ字氏名：MURAKAMI, YOSHIKI

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00397556

研究分担者氏名：河田則文

ローマ字氏名：KAWADA, NORIFUMI

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：30271191

研究分担者氏名：田守昭博

ローマ字氏名：TAMORI, AKIHIRO

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30291595

(2)研究協力者

なし

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。