

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09019

研究課題名(和文) C型肝炎ウイルス排除後の肝病態に關与する因子の探索

研究課題名(英文) Hepatic pathology of patients achieved sustained hepatitis C viral response

研究代表者

田守 昭博 (TAMORI, Akihiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30291595

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)：HCV持続感染例では肝癌例にMICAマイナー型が高頻度であり：特に高齢患者および進行肝線維化例にてMICAマイナー型と肝癌に相関を認めた。一方、Direct acting antivirals治療にてHCV消失した610例では初発肝癌21例に相関する遺伝子多型は検出されなかった。インターフェロン(IFN)治療にてHCV消失した患者ではIFN前後において肝線維化の改善が遅延した患者に肝癌が多く発症していた。肝発癌例の肝組織にはHCV消失後も活性化星細胞が持続して存在しており活性化星細胞がSVR後の肝線維化さらには発癌にも寄与している可能性が推測された。

研究成果の概要(英文)：We examined the pathology in liver after eradication of hepatitis C virus (HCV) by anti-viral therapy. First of all, single nucleotide polymorphisms (SNPs) were analyzed in patients with HCV. Our data suggested that MICA minor genotype was significantly associated with prevalence of hepatocellular carcinoma (HCC) in patients with HCV. On the other hand, there was no significant associated SNPs with HCC in patients achieved sustained viral response by direct acting anti-virals. In patients achieved sustained viral response by interferon-based therapy, histological stagnation of hepatic fibrosis improvement was related to hepatocarcinogenesis. Immunohistochemical analysis showed that activated stellate cells persistently existed in non-cancerous liver tissue. It was speculated that continuously activated stellated cells might played an important role in SVR-HCC, and continuous hepatic fibrosis.

研究分野：肝臓学

キーワード：C型肝炎ウイルス 肝発癌 SVR

1. 研究開始当初の背景

C型慢性肝疾患はC型肝炎ウイルス(HCV)感染の持続感染によって引き起こされる肝病態である。近年、開発された抗HCV剤により90%以上の患者において原因であるウイルス除去(SVR)が期待されるが、全てのSVR症例において肝疾患が治癒する訳ではない。すなわちSVR症例から肝癌を発症した事例は稀ではない(Kobayashi, Tamori et al. Liver Int. 27: 186-91, 2007)。これまでSVR症例の肝病態に関する検討は少なく、患者個々に応じた対処法については未だ確立されたものはない。そこで本研究ではSVR後の肝疾患の改善過程を線維化と発癌に区別し、マイクロRNA発現を網羅的に解析にするものである。我々の施設では、55例のSVR後肝発癌例を経験しているその内24例(44%)はインターフェロン(IFN)治療終了後、5年以上経てから肝癌が見つかりSVR症例の長期観察が必要であることが推察される。一方、新規治療にて全例がHCVを除去できる様になると長期間フォローアップをすべきSVR症例かどうかの選別が必要となる。そこでSVR症例の肝病態を反映するバイオマーカーの探索は重要な課題と考える。さらに肝疾患改善遅延群の病態を解明できれば、そのSVR症例に対する新たな治療介入法も創出できる。

2. 研究の目的

新たな抗C型肝炎ウイルス薬の導入により、感染症としてのC型肝炎治療は目的を達成されつつある。一方、肝疾患としての治癒については解決すべき問題が残されている。そこで本研究では抗HCV薬によってウイルス除去が達成された患者における肝組織の修復過程を肝線維化と発癌の面から臨床サンプルを用いて解析する計画である。具体的にはSVR症例の肝病態を病理学的に評価し、同時に収集したサンプル(血液・肝組織)を用いて、その病態と関与している分子について患者遺伝子多型とその遺伝子発現パターンから検討する。その結果に基づいてHCV消失後の予後を反映する末梢血中バイオマーカーを明らかにするとともに治療介入の標的となる分子を探索する。

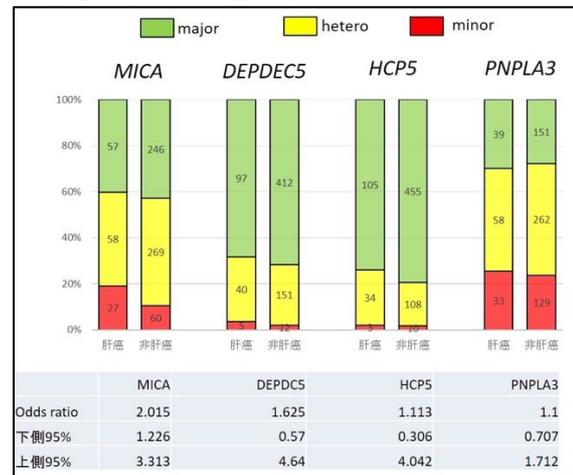
3. 研究の方法

HCV持続感染からの肝臓がんを寄与するヒト遺伝子多型について解析した。その結果に基づいてHCV消失後に肝臓がんに影響を及ぼす遺伝子多型を探索した。またHCV消失後の肝線維化の変化を組織学的に解析し肝臓がんとの関係性を評価した。対象は大阪市立大学医学部附属病院に通院したC型慢性肝疾患例1,355例とIFN治療によってウイルス排除された654例(1992年から2014年)のうち、治療前後に肝生検をし得た非発癌群23例と外科的切除をした発癌群11例である。さらにDirect acting antivirals (DAA)治療を

733例についても解析を開始した。

4. 研究成果

(1) 大阪市立大学医学部附属病院に通院したC型慢性肝疾患例1,355例(肝癌257例と非癌例1,098例)を対象にしてMICA, DEPDC5, HCP5, PNPLA-3の4つの遺伝子多型と肝癌との関係を解析した。その結果、MICAマイナー型では非肝癌例10%に対し、肝癌例では19%を占め、非発癌例より有意に高頻度であることが明らかになった一方、他の遺伝子多型には肝癌との相関関係が認めなかった(下図)。さらに肝癌例と非発癌例について臨床背景(年齢・血小板数)を一致させた解析にて高齢C型肝疾患例および肝硬変に至る前の進行肝線維化慢性肝炎例ではMICA多型(マイナー型)と肝癌に相関関係があり、肝癌高危険群を設定する上で臨床的に有用と考えられる。MICAは主要組織適合抗原の一つであり、癌発症やウイルス感染時に抗原提示を行うことで拒絶反応を行う重要な因子である。そこで



C型肝炎ウイルスに感染した患者の血清中のMICAタンパク量と肝癌組織中のMICA mRNAの発現を検討しMICAマイナー型では癌組織・血清ともにMICAの発現が低下していた。これにより、MICAマイナー型による自然免疫応答がC型肝炎の発症あるいは進行を助長している可能性が推測された(Sci Rep 2017)。

(2) IFN治療によってウイルス排除された後、肝生検をし得た非発癌群23例と外科的切除をした肝発癌群11例について治療前後の臨床像に加えて肝組織像を比較検討した。IFN前後の肝組織像の変化について非発癌例ではHCV消失後に肝炎の沈静化とともに肝線維化の改善が確認された。一方発癌例では肝炎の沈静化はあるものの肝線維化の改善遅延あるいは増悪を認めた。さらに免疫組織学的解析にて肝発癌の肝組織においてはHCV消失後も活性化星細胞が持続して存在していることを明らかにした(PLOS One 2018 論文報告)。活性化星細胞がSVR後の肝線維化に何らかの影響を有していることさらに発癌にも寄与している可能性が推測された(下図)。

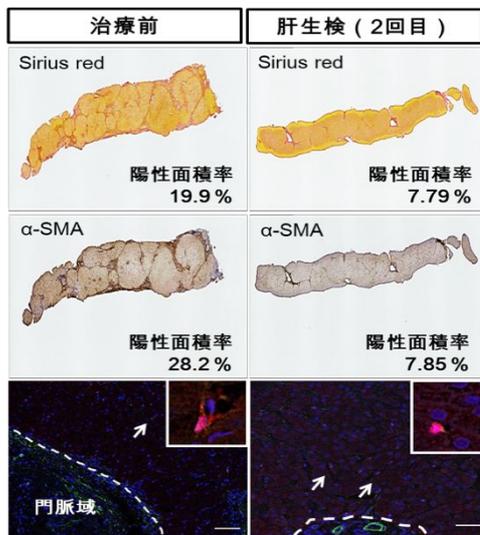


図2 非発癌群のコラーゲン量とαSMAの変化、およびCYGBとαSMAの発現
赤: CYGB 緑: α-SMA 青: 核

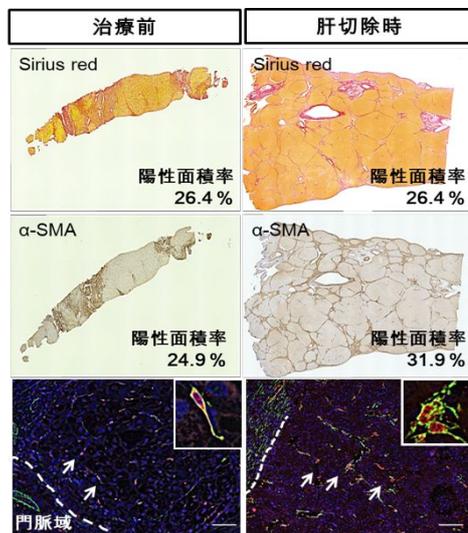


図3 発癌群のコラーゲン量とαSMAの変化、およびCYGBとαSMAの発現
赤: CYGB 緑: α-SMA 青: 核

(3) DAA 治療にて 717/733 (98%)例が SVR を達成した。その後の SVR 例観察にて、初発肝癌を 21/610(3.4%)例に認めている。さらに肝癌根治例からの再発肝癌は 31/78 (40%)例であり HCV 消失のみでは肝癌の根絶が難しいことが確認された。DAA 治療群を対象とした肝癌遺伝子多型との検討では、MICA 及び TLL1 とともに有意な相関を認めなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Motoyama H, Tamori A, Kubo S, Uchida-Kobayashi S, Takemura S, Tanaka S, Ohfujii 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*. 査読あり、2018: e0194163. doi: 10.1371/ journal.pone.0194163.
2. Kozuka R, Hoang 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*. 査読あり、2018; 25: 535-542.
3. Tanaka S, Tamori A, Takemura S, Hamano G, Ito T, Kawada N, Kubo S. Surgical Outcomes in Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma: Special Reference to Sustained Virological Responses to Interferon Therapy. *Am Surg*. 査読あり、2017; 83: 1246-1255.
4. Hoang H, Tamori A, Thuy LTT, Yoshida K, Hagihara A, Kawamura E, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. Polymorphisms in MICA, but not in DEPDC5, HCP5 or PNPLA3, are associated with chronic hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *Sci Rep*. 査読あり、2017; 11912. doi: 10.1038/s41598-017-10363-5.
5. Yoshida K, Hoang 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*. 査読あり、2017; 8(5). pii: E962. doi: 10.3390/ijms18050962.
6. Tamori A, Hoang 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*. 査読あり、2017; 16: 734-741.
7. Matsuura K, Sawai H, Ikeo K, Sakamoto N, Nakagawa M, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Enomoto N, Kusakabe A, Kajiwara E, Tamori A Tokunaga K, Tanaka

- Y et al. Genome-Wide Association Study Identifies TLL1 Variant Associated With Development of Hepatocellular Carcinoma After Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* 査読あり、2017; 152: 1383-1394.
8. Kozuka R, Hoang 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.* 査読あり、2017; 32: 1495-1502.
 9. Tamori A, Yoshida K, Kurai O, Kioka K, Hoang H, Kozuka R, Motoyama H, Kawamura E, Hagihara A, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Enomoto M, Murakami Y, Kawada N. Randomized trial of combined triple therapy comprising two types of peginterferon with simeprevir in patients with hepatitis C virus genotype 1b. *Hepatol Res.* 査読あり、2016; 46: 1311-1320.
 10. Tamori A, Murakami Y, Kubo S, Itami S, Uchida-Kobayashi S, Morikawa H, Enomoto M, et al. MicroRNA expression in hepatocellular carcinoma after the eradication of chronic hepatitis virus C infection using interferon therapy. *Hepatol Res.* 査読あり、2016; 46: E26-E35.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 菊川佳菜子、打田佐和子、田守昭博、河田則文、C 型肝炎の制圧に向けた DAA 治療の進歩と問題点、第 108 回日本消化器病学会近畿支部例会シンポ、2018/3/17、京都
2. 湯川芳美、小塚立蔵、田守昭博、河田則文、Direct-acting antivirals (DAAs) 治療例から見た HCV 根絶を向けた課題、第 107 回日本消化器病学会近畿支部例会シンポ、2017/9/23、大阪
3. 田中肖吾、田守昭博、久保正二他、C 型肝炎に対する直接作用型抗ウイルス薬投与によるウイルス学的著効後肝がん肝切除例の臨床病理学的特徴、第 53 回日本肝臓学会シンポ、2017/7/6、東京
4. Hoang Hai、田守昭博、河田則文、Emerging NS5A RAS was associated with clinical course, and was not continuously predominant after DAA failure、第 53 回日本肝臓学会総会ワーク、2017/6/9、広島
5. 打田佐和子、田守昭博、河田則文、Direct

acting antivirals 治療による C 型肝炎ウイルス排除後肝発癌についての検討、第 53 回日本肝臓学会総会ワーク、2017/6/9、広島

6. 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シンポ、2017/6/9、広島
7. Tamori A, et al. Efficacy and safety of sofosbuvir based therapies for cirrhotic and/or elder patients with hepatitis C virus in Japanese real world. 67th American Association for the study of liver diseases、2016/11/14、ボストン
8. 村上善基、豊田秀徳、田守昭博、エクソソーム中 miRNA 発現解析による SVR 後の発がん予想マーカー開発の試み、第 20 回日本肝臓学会大ワーク、2016/11/3、神戸
9. 田守昭博、久保正二、河田則文、C 型肝炎細胞癌根治例に対する抗 HCV 治療効果と肝癌再発因子、第 20 回日本肝臓学会大会統合プログラムシンポ 2016/11/5、神戸
10. Tamori A, et al. Combination therapy with daclatasvir and asunaprevir in cirrhotic and non-cirrhotic patients with hepatitis C virus genotype 1b in Japan. 24th European Gastroenterology 2016/10/18 ウィーン
11. 元山宏行、田守昭博、榎本 大、河田則文、慢性 C 型肝炎 SVR 症例における肝発癌例の臨床像および組織学的検討、第 105 回日本消化器病学会近畿支部例会シンポ、2016/9/17、大阪
12. 打田佐和子、田守昭博他、C 型慢性肝疾患に対するインターフェロン・フリー治療による SVR 達成例からの初発肝細胞癌例の経験、第 52 回日本肝臓学会ワーク、2016/7/2、東京
13. 元山宏行、田守昭博、河田則文、慢性 C 型肝炎 SVR 後における肝発癌例、非発癌例の臨床像および組織学的検討、第 41 回日本肝臓学会西部会 ワーク、2015/12/3、名古屋
14. Tamori A, Murakami Y, Kubo S, et al. MicroRNA expression in hepatocellular carcinoma and non-cancerous livers after the eradication of hepatitis virus C using interferon-based therapy. 66th American Association for the study of liver diseases. 2015/11/14 サンフランシスコ.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/liver/>

6．研究組織

(1)研究代表者

田守 昭博 (TAMORI Akihiro)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30291595

(2)研究分担者

村上 善基 (MURAKAMI Yoshiki)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：00397556

(2)研究分担者

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

(2)研究分担者

大藤 さとこ (OFUJI Satoko)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：70433290

(2)研究分担者

久保 正二 (KUBO Shoji)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80221224

(3) 連携研究者

ホアン ハイ (HOANG Hai)
大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：60623246

(4) 研究協力者

なし