

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09029

研究課題名(和文)肝線維化・脂肪化の新規超音波診断法の開発と発癌予測・バイオマーカーの探索への展開

研究課題名(英文)Development of new diagnosis shear wave methods for liver fibrosis and steatosis

研究代表者

飯島 尋子(iijima, hiroko)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80289066

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)：肝発癌リスク予測は、VTQ >1.33 m/s, FPG 110 mg/dl, 男性 55 years, AFP 5 ng/mlで、発癌リスクが高い。肝発癌関連遺伝子は、糖尿病肥満と相関する遺伝子CTGFが同定。肝生検をした126名でTEへの変換式を求めた  $TE = 1.23 \times \text{Aixplorer} - 0.40$   $TE = 1.10 \times \text{EPIQ} + 0.06$   $TE = 1.82 \times \text{LOGIQ} - 1.18$   $TE = 1.45 \times \text{ACUSON} - 0.30$   $TE = 1.29 \times \text{Aplio} - 0.45$ 。

研究成果の概要(英文)：The risk of liver cancer was predicted using the combination of the following parameters: liver stiffness VTQ (>1.33 m/s), FPG (110 mg/dl), sex (male), age (55 years), and AFP (5 ng/ml). The study revealed that the total of 5 points was the highest risk of HCC. The increased expression of connective tissue growth factor (CTGF) associated with diabetes and obese was identified as a liver cancer-associated genome/bio-markers. One hundred and twenty-six patients who underwent liver biopsy and liver stiffness were analyzed to establish the regression equation between transient elastography (TE) and SWE, TE and SWE-Aixplorer,  $TE = 1.23 \times \text{SWE-Axplorer} - 0.40$ ; TE and SWE-EPIQ,  $TE = 1.10 \times \text{SWE-EPIQ} + 0.06$ ; TE and SWE-LOGIQ,  $TE = 1.82 \times \text{SWE-LOGIQ} - 1.18$ ; TE and SWE-ACUSON,  $TE = 1.45 \times \text{SWE-ACUSON} - 0.30$ ; TE and SWE-Aplio,  $TE = 1.29 \times \text{SWE-Aplio} - 0.45$ .

研究分野：消化器、肝疾患、超音波診断

キーワード：肝線維化 肝脂肪化 超音波 shear wave Elastography 肝発癌リスク

## 1. 研究開始当初の背景

(ア)慢性肝炎は肝硬変を経て高率に肝細胞癌に至る。診断は、未だに肝生検組織診断がゴールドスタンダードで出血、感染症などの合併症に加え微量サンプルしか得られず、肝臓全体の組織診断を困難とする。私たちは肝生検を行った臨床例を対象に倫理委員会の承認(第1334、2762号)を得て肝硬度測定を行ってきた。特に肝硬変の診断には肝生検に匹敵する診断能を持つことを報告した、複数の機器による肝線維化診断の有用性を報告した。

(イ)これまで非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の非侵襲診断法の研究を行い、造影超音波法の有用性を報告した。遍く使用できる機器による線維化、脂肪化の程度を定量的に評価する手法を共同開発中である。計算モデルの基礎となる種々の生体組織の音響特性データを収集し線維化および脂肪化の定量的解析をすすめている。

(ウ)これまで得た臨床例でのデータを元に慢性肝炎程度別の診断、発癌リスク算定の研究を進めてきた。平成26年からびまん性肝疾患研究会を母体に多施設前向きコホート研究を開始した。慢性肝炎、肝硬変の個別化医療の推進もできると考える。

(エ)500例を超える肝がん切除標本の癌部、非癌部(線維化肝、脂肪肝)マイクロアレイ解析のデータの蓄積がすでにあり、これらを用いて肝癌の予後、進展などに関する幾多の論文を発表している。これらのデータを背景に研究を深めて行く予定である。

## 2. 研究の目的

肝線維化は肝発癌と密接に関連しているゆえに慢性肝疾患における肝線維化の正確な診断は患者予後を予測する上で不可欠な情報である。従って肝生検によらない簡便で確実な非侵襲的診断機器の開発は大きな意義を有する。本研究では肝線維化の非侵襲的診断法を確立し、肝発癌リスクの予測、バイオマーカーの探索へと進展させる。なお、線維化のみならず、脂肪肝炎からの発癌も重要なテーマと考え、肝線維化・脂肪肝を研究対象とする。

すなわち、本研究の目的は1)簡便な肝線維化・脂肪化の超音波診断基準の作成と定量法の確立、2)簡便な肝発癌リスク予測法の開発、3)肝線維化・脂肪化のステージ特異的遺伝子発現プロファイルの網羅的解析による肝発癌関連遺伝子・バイオマーカーの探索である。

## 3. 研究の方法

(1)肝線維化脂肪化診断法の確立に関しては肝生検および手術と同時に非侵襲的検査法で肝硬度および脂肪化の計測を行いゴー

ルドスタンダードである肝組織による病理診断と比較検討をする。組織学的検討:肝生検は16G~18Gカッピングバイオプシーで行う。門脈域が5カ所必要であるため最低15mm以上の組織採取を行う。組織診断のばらつきを考慮し患者背景をブラインドにし、(倫理委員会第1334、2762号承認)一括して診断を行った。

(2)肝線維化脂肪化情報の解析と肝発癌リスク予測法を開発(これまでの臨床例約1847症例(発癌歴のない1774例と発癌歴のある73例)の単変量解析では年齢・性別・ヒアルロン酸・Vs・Plt・PT-INR、GTP・空腹血糖で有意差を認めた。発癌に寄与する因子をロジスティック回帰分析で検討すると、年齢(Odds比3.45/10年)・男性(2.09)・Vs(4.23)・Plt(2.341)・空腹血糖(2.151)が発癌に最も関係した。以上の結果を基に多施設前向きコホート研究開始し、日本における肝癌の高危険群を設定し慢性肝炎、肝硬変の個別化医療を推進する。

(3)線維化のstage-specificな遺伝子発現プロファイルの解析と発癌にかかわるバイオマーカーの探索。すでに有している切除標本と今回の線維化・脂肪化超音波定量診断法によって分類された組織検体を用いてstage-specificな遺伝子発現プロファイルを解析し、発癌リスクの高まる線維化進行例での特異的な遺伝子発現を明らかにし、新たな発癌にかかわるバイオマーカーを探索する。

## 4. 研究成果

(1)簡便な肝線維化・脂肪化の超音波診断基準の作成と定量法の確立

各機種間の相関と肝線維化のゴールドスタンダードになっている機種への変換式が可能であるかの検討を肝生検と同時に施行した126名を対象とし、超音波診断装置5機種と肝硬度測定専用機(ACUSON S2000/3000、Aixplorer、iu22/EPIQ7、Aplio™500、LOGIQ E9とFibroScanで肝硬度を測定した。平均年齢57.7歳、HBV/HCV/B+C/NBNCはそれぞれ23/63/1/40であり、線維化stageはF1/F2/F3/F4:54/24/32/17であった。各機種ともにF stageの上昇とともにvelocity(Vs値)も上昇し、肝硬変診断能はAUC0.95-0.98と非常に高い診断能であった。相関係数が高く回帰式の作成が可能と考え、FibroScanとそれぞれのSWE機器の間に回帰式を使ってFibroScanへの変換式を求めた。FibroScanとSWE-Aixplorer:TE(m/s)=1.23×SWE-Aixplorer(m/s)-0.40 FibroScanとSWE-EPIQ:TE(m/s)=1.10×SWE-EPIQ(m/s)+0.06 FibroScanとSWE-LOGIQ:TE(m/s)=1.82×SWE-LOGIQ(m/s)-1.18 FibroScanとSWE-ACUSON:TE(m/s)=1.45×SWE-ACUSON(m/s)-0.30。FibroScanと

SWE-Aplio :TE (m/s) = 1.29 × SWE-Aplio (m/s) - 0.45. 今後本法を用いて非侵襲的検査法に替わる肝線維化診断法として広く普及することが望まれる。脂肪肝の検討：対象2016年9月から2017年9月に慢性肝疾患の精査目的でATIかつCAPが測定され、肝生検が施行された127例中、肝悪性腫瘍がなく、肝生検施行前後4週以内に測定が施行され、病理学的な肝脂肪化の評価が可能であった108例を検討の対象とした。(1)ATI値は0.61(0.56 - 0.67) dB/cm/MHz, CAP値は214(189 - 248) dB/mであった。(2)肝脂肪化 grade (0/1/2/3)別のATI値は0.58(0.55 - 0.62), 0.66(0.59 - 0.72), 0.80(0.74 - 0.85), 0.86(0.78 - 0.91) dB/cm/MHzで, CAP値は204(181 - 232), 241(212 - 268), 286(253 - 302), 326(303 - 332) dB/mであり、両機種とも脂肪化 grade の進行とともに有意な上昇が認められた ( $p < 0.001$ , Jonckheere-Terpstra 検定)。脂肪肝の定量的診断も可能と考えた。

(2) 肝線維化脂肪化情報の解析と肝発癌リスク予測法を開発(これまでの臨床例約1847症例(発癌歴のない1774例と発癌歴のある73例)の単変量解析では年齢・性別・ヒアルロン酸・Vs・Pit・PT-INR、GTP・空腹血糖で有意差を認めた。発癌に寄与する因子をロジスティック回帰分析で検討すると、年齢(Odds比3.45/10年)・男性(2.09)・Vs(4.23)・Pit(2.341)・空腹血糖(2.151)が発癌に最も関係した。現在も多施設検討を続けており5年生存、10年生存を検討予定とする。

(3) 線維化の stage-specific な遺伝子発現プロファイルの解析と発癌にかかわるバイオマーカーの探索に関しては、網羅的分子発現データに基づき、線維化・脂肪化超音波定量診断法との関連分子群を検出する。発現量、部位などの解析とともに、臨床病理学的因子、再発、予後などとの相関について詳細な検討を加え、発癌リスクの予測バイオマーカーとして臨床応用へ展開する。研究分担者の田中らは、500例以上の肝切除臨床検体を対象としたDNA microarrayによる遺伝子発現、tissue microarrayによる組織蛋白発現など様々な網羅的分子発現データを蓄積しており(Hepatology 2011)、肝癌幹細胞から検出された特異的発現遺伝子パターンが、肝癌臨床検体における早期再発と極めて高い相関を示すことを見出した。今後はさらに症例を追加し検討を重ねる予定である。

#### 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22件)

Kobayashi N, Iijima H, Tada T, Kumada T, Yoshida M, Aoki T, Nishimura T, Nakano

C, Takata R, Yoh K, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Nishikawa H, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Hirota S, Fujimoto J, Nishiguchi S. Changes in liver stiffness and steatosis among patients with hepatitis C virus infection who received direct-acting antiviral therapy and achieved sustained virological response. Eur J Gastroenterol Hepatol. 査読有, 2018 May;30(5):546-551.

飯島 尋子, 西村 貴士, 多田 俊史, 中野 智景, 青木 智子, 高嶋 智之, 池田直人, 會澤 信弘, 西川 浩樹, 岩田 恵典, 榎本 平之, 藤元 治朗, 鹿毛 政義, 熊田 卓, 西口 修平, 矢野 博久. 超音波減衰法 “Attenuation imaging” による新しい脂肪肝診断. 肝臓 査読有, 59(1):65-67, 2018

Nishikawa H, Enomoto H, Ishii A, Iwata Y, Miyamoto Y, Ishii N, Yuri Y, Hasegawa K, Nakano C, Nishimura T, Yoh K, Aizawa N, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Takata R, Iijima H, Nishiguchi S. Elevated serum myostatin level is associated with worse survival in patients with liver cirrhosis. Cachexia Sarcopenia Muscle. 査読有, 2017 Dec;8(6):915-925.

Ishii N, Iwata Y, Nishikawa H, Enomoto H, Aizawa N, Ishii A, Miyamoto Y, Yuri Y, Hasegawa K, Nakano C, Nishimura T, Yoh K, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Takata R, Iijima H, Nishiguchi S. Effect of pretreatment psoas muscle mass on survival for patients with unresectable pancreatic cancer undergoing systemic chemotherapy. Oncol Lett. 査読有, 2017 Nov;14(5):6059-6065.

Nishikawa H, Enomoto H, Ishii A, Iwata Y, Miyamoto Y, Ishii N, Yuri Y, Takata R, Hasegawa K, Nakano C, Nishimura T, Yoh K, Aizawa N, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Iijima H, Nishiguchi S. Development of a simple predictive model for decreased skeletal muscle mass in patients with compensated chronic liver disease. Hepatol Res. 査読有, 2017 Nov;47(12):1223-1234.

Nishikawa H, Enomoto H, Ishii A, Iwata Y, Miyamoto Y, Ishii N, Yuri Y, Takata R, Hasegawa K, Nakano C, Nishimura T, Yoh K, Aizawa N, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Iijima H, Nishiguchi S. Prognostic significance of low skeletal muscle mass compared with protein-energy malnutrition in liver cirrhosis. Hepatol Res. 査読有, 2017 Sep;47(10):1042-1052.

Enomoto H, Tao L, Eguchi R, Sato A, Honda M, Kaneko S, Iwata Y, Nishikawa H, Imanishi H, Iijima H, Tsujimura T, Nishiguchi S. The in vivo antitumor effects of type I-interferon against hepatocellular carcinoma: the suppression of tumor cell growth and angiogenesis. *Sci Rep.* 査読有, 2017 Sep 22;7(1):12189.

Nishikawa H, Nishijima N, Enomoto H, Sakamoto A, Nasu A, Komekado H, Nishimura T, Kita R, Kimura T, Iijima H, Nishiguchi S, Osaki Y. Prognostic significance of sarcopenia in patients with hepatocellular carcinoma undergoing sorafenib therapy. *Oncol Lett.* 査読有, 2017 Aug;14(2):1637-1647.

Nishikawa H, Enomoto H, Iwata Y, Nishimura T, Iijima H, Nishiguchi S. Clinical utility of bioimpedance analysis in liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 査読有, 2017 Jul;24(7):409-416.

Yuri Y, Nishikawa H, Enomoto H, Ishii A, Iwata Y, Miyamoto Y, Ishii N, Hasegawa K, Nakano C, Nishimura T, Yoh K, Aizawa N, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Takata R, Iijima H, Nishiguchi S. Implication of Psoas Muscle Index on Survival for Hepatocellular Carcinoma Undergoing Radiofrequency Ablation Therapy. *J Cancer.* 査読有, 2017 Jun 1;8(9):1507-1516.

Nishikawa H, Takata R, Enomoto H, Kazunori Y, Kishino K, Shimono Y, Iwata Y, Hasegawa K, Nakano C, Nishimura T, Aizawa N, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Ishii A, Iijima H, Nishiguchi S. Proposal of a predictive model for advanced fibrosis containing *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2-binding protein in chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 査読有, 2017 Mar;47(3):E74-E84.

Nishikawa H, Nishijima N, Enomoto H, Sakamoto A, Nasu A, Komekado H, Nishimura T, Kita R, Kimura T, Iijima H, Nishiguchi S, Osaki Y. Predictive factors in patients with hepatocellular carcinoma receiving sorafenib therapy using time-dependent receiver operating characteristic analysis. *J Cancer.* 査読有, 2017 Feb 10;8(3):378-387.

Ishii A, Nishikawa H, Enomoto H, Iwata Y, Kishino K, Shimono Y, Hasegawa K, Nakano C, Takata R, Nishimura T, Yoh K, Aizawa N,

Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Iijima H, Nishiguchi S. Clinical implications of serum *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2-binding protein in treatment-naïve chronic hepatitis B. *Hepatol Res.* 査読有, 2017 Feb;47(2):204-215.

Nishikawa H, Nishijima N, Enomoto H, Sakamoto A, Nasu A, Komekado H, Nishimura T, Kita R, Kimura T, Iijima H, Nishiguchi S, Osaki Y. Comparison of FIB-4 index and aspartate aminotransferase to platelet ratio index on carcinogenesis in chronic hepatitis B treated with entecavir. *J Cancer.* 査読有, 2017 Jan 11;8(2):152-161.

Ishii A, Nishikawa H, Enomoto H, Iwata Y, Kishino K, Shimono Y, Hasegawa K, Nakano C, Takata R, Nishimura T, Yoh K, Aizawa N, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Iijima H, Nishiguchi S. Clinical implication of serum *Wisteria floribunda* Agglutinin-Positive Mac-2-binding protein in treatment naïve chronic hepatitis B. *Hepatol Res.* 査読有, 2017 47:204-215.

Nishikawa H, Enomoto H, Iwata Y, Kishino K, Shimono Y, Hasegawa K, Nakano C, Takata R, Nishimura T, Yoh K, Ishii A, Aizawa N, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Iijima H, Nishiguchi S. Serum *Wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2-binding protein for patients with chronic hepatitis B and C: a comparative study. *J Viral Hepat.* 査読有, 2016 Dec;23(12):977-984.

Nishikawa H, Enomoto H, Iwata Y, Kishino K, Shimono Y, Hasegawa K, Nakano C, Takata R, Yoh K, Nishimura T, Aizawa N, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Ishii A, Iijima H, Nakamura H, Nishiguchi S. Clinical significance of serum *wisteria floribunda* agglutinin-positive Mac-2-binding protein level in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res.* 査読有, 2016 Nov;46(12):1194-1202.

Sugimoto K, Shiraishi J, Tanaka H, Tsuchiya K, Aso K, Kobayashi Y, Iijima H, Moriyasu F. Computer-aided diagnosis for estimating the malignancy grade of hepatocellular carcinoma using contrast-enhanced ultrasound: an ROC observer study. *Liver Int.* 査読有, 2016 Jul;36(7):1026-32.

Aoki T, Iijima H, Tada T, Kumada T,

Nishimura T, Nakano C, Kishino K, Shimono Y, Yoh K, Takata R, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Nishikawa H, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Hirota S, Fujimoto J, Nishiguchi S. Prediction of development of hepatocellular carcinoma using a new scoring system involving virtual touch quantification in patients with chronic liver diseases. J Gastroenterol. 査読有, 2017 Jan;52(1):104-112. Epub 2016 Jun 15.

Nishikawa H, Enomoto H, Iwata Y, Hasegawa K, Nakano C, Takata R, Nishimura T, Yoh K, Aizawa N, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Iijima H, Nishiguchi S. Clinical significance of serum Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein level and high-sensitivity C-reactive protein concentration in autoimmune hepatitis. Hepatol Res. 査読有, 2016 Jun;46(7):613-21.

② Nishikawa H, Enomoto H, Iwata Y, Hasegawa K, Nakano C, Takata R, Nishimura T, Yoh K, Aizawa N, Sakai Y, Ikeda N, Takashima T, Ishii A, Iijima H, Nishiguchi S. Impact of serum Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein and serum interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 in primary biliary cirrhosis. Hepatol Res. 査読有, 2016 May;46(6):575-83.

②高嶋 智之, 飯島 尋子, 青木 智子, 中野 智景, 會澤 信弘, 岸野 恭平, 霜野良弘, 長谷川 国広, 高田 亮, 楊 和典, 石井 昭生, 坂井 良行, 西村 貴士, 西川 浩樹, 岩田 恵典, 池田 直人, 榎本 平之, 廣田 誠一, 藤元 治朗, 矢野 博久, 中島 収, 鹿毛 政義, 西口 修平. 慢性肝炎における肝線維化マーカー-ELFスコアの有用性. 肝臓 査読有, 56;10:543-5 (2015.11)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯島 尋子 (IIJIMA, HIROKO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80289066

(2)研究分担者

田中 真二 (TANAKA, SHINJI)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
研究者番号：30253420

藤元 治朗 (FUJIMOTO, JIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：90199373

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )