

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03638

研究課題名(和文) 肝炎ウイルス制御後肝発癌におけるプレジジョンメディシンのための基盤的研究

研究課題名(英文) Basic research to achieve precision medicine for hepatocarcinoma occurring in the era of hepatitis virus eradication/suppression.

研究代表者

榎本 信幸 (ENOMOTO, NOBUYUKI)

山梨大学・その他部局等・理事

研究者番号：20251530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗ウイルス薬により肝炎ウイルスが排除されても、一部の症例ではなお、病態の進展あるいは肝発癌が認められる。本研究ではウイルス排除後に病態の進展したC型肝炎症例を対象として、ウイルスゲノム・肝癌ゲノム・炎症関連分子、それぞれの遺伝情報とその動態について、次世代遺伝子解析技術を中心とした解析を行い、その特徴について明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、本研究によってウイルス排除後の肝病態進展/発癌に関する肝癌ゲノムの特徴、炎症性サイトカインの動態と病態進展の関連、ハプロタイピングシステムを用いたウイルスゲノムの特徴と病態進展の関連を示すことができた。

また今回構築したhTERT C228T定量リキッドバイオプシーシステムは、正確かつ簡便な肝癌検出および治療反応性の予測が行えるため、直接臨床現場に導入しうる。

研究成果の概要(英文)：Progression of liver disease or the occurrence of hepatocellular carcinoma (HCC) is still observed in some virus hepatitis patients even after virus elimination with antiviral drugs, and the underlying mechanism is unclear. In this study, using next-generation gene analysis technology, we characterized the information and the dynamics of hepatitis C virus (HCV) genome, HCC genome, and inflammation-related molecules in HCV patients who experienced liver disease advancement or HCC development after viral elimination.

研究分野：ウイルス性肝炎

キーワード：肝炎ウイルス制御後 原発性肝癌 HCV 次世代シーケンサー 自然免疫 ウイルスゲノム 宿主遺伝子

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

抗ウイルス治療による肝炎ウイルス制御が可能となった今日においても肝癌症例は未だ十分な減少を認めていない。また一部においてウイルス制御後に肝硬変の進展症例も認められる。C型肝炎ウイルス(HCV)あるいはB型肝炎ウイルス(HBV)においては、近年の抗ウイルス薬の進歩によって多くの症例で肝炎は沈静化されつつあるものの、本邦の肝癌死亡者は依然3万人存在し、ウイルス制御後も発癌者は必ずしも十分に減少していない。

“炎症性発癌”の典型とされてきた肝炎ウイルス肝癌と比して、“炎症鎮静化後の肝癌”における生物学的特性は明らかとなっていない。近年、炎症鎮静化後にこれまでにない急速な速度で進展する肝癌症例が報告され、炎症消失が肝癌に与える影響について懸念が生じつつある。しかしながら、炎症鎮静化後の肝癌・肝病態の進行については十分な検討はなされていない。

申請者は、慢性肝疾患の病態解明に関して、ウイルス因子と宿主側の両面から病態進展あるいは治療抵抗性に関与する因子の解明について、次世代シーケンサを含む網羅的解析にて行ってきた。この結果、抗ウイルス治療におけるNS5A領域ISDR、IRRDR領域およびcore蛋白70番変異の影響、resistance-associated variants(RAVs)の意義、core蛋白70番変異と肝線維化、発癌への関連を明らかとしてきた。一方、宿主側の自然免疫分子群およびインターフェロン誘導遺伝子群の動態が治療抵抗性に関与すること、さらにはIL28B、PNPLA3、DEPDC5、MICA、ALDH2、HLA-DP遺伝子多型が病態進展を規定していることを示してきた。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルス制御時代に出現する肝発癌あるいは肝病態の進展機序を明らかにするために、肝(癌)組織に蓄積するゲノム異常・ウイルスゲノム・インターフェロン誘導遺伝子群を含むサイトカイン等の情報を、次世代遺伝子解析技術を中心として用いることにより、統合的に明らかとしてゆく。

3. 研究の方法

C型肝炎ウイルス排除後の肝癌組織における宿主ゲノム変異、宿主のサイトカイン・ケモカインの動態、ウイルスゲノム変異情報等について次世代シーケンサ技術を主として用い、明らかとする。

病変進展リスク評価に適したバイオマーカーを開発し、liquid biopsy等を用いた簡便な検出系を構築する。

4. 研究成果

(1) ウイルス制御後肝癌における宿主遺伝子群の解析:

レーザーマイクロダイセクションによる精密な肝癌病変組織採取後、次世代シーケンサを用いた宿主ゲノムの変異 deep sequencing 解析により、発癌に関連する宿主因子の特徴を検討、ウイルス排除後肝癌ではhTERTプロモーターC228T変異頻度が特に高いことを明

らかとした。また成因に拘わらず原発性肝癌組織における hTERT プロモーター変異を持つ細胞集団はおおよそ 3 割程度であり、肝癌の進展に拘わらずその比率はおおよそ一定であることを見出した。

(2) ウイルス制御後の肝病態進展における炎症・インターフェロン関連分子の解明：

ウイルス制御前後におけるインターフェロン関連分子の発現状況について検討、まず血中 IFN-シグナルの下流分子 CXCL10/IP-10 に着目して、ウイルス排除前後の血液中の発現状況について 47 症例について検討した。C 型慢性肝炎の段階では排除前 CXCL10/IP-10 の血液中濃度は高く、排除後は有意に低下した。一方、非代償性肝硬変において挙動は異なっており、特に肝予備能の改善しない群において、排除前 CXCL10/IP-10 濃度は低く、排除後は有意に上昇していた。

CXCL10/IP-10 以外についてもウイルス排除前後の肝病態との関連を明らかにするために、C 型肝炎における炎症誘導における働きが報告されている CCL5/RANTES についても 47 症例について同様に動態の解析を行ったところ、慢性肝炎～代償性肝硬変までと非代償性肝硬変では挙動が異なり、CCL5/RANTES についても CXCL10/IP-10 と同様の動態を呈した。CXCL10/IP-10、CCL5/RANTES 以外にウイルス排除前後でのサイトカイン・ケモカインの動態について網羅的に解析するために、慢性肝炎 2 例と非代償性肝硬変 2 例において、サイトカインアレイによる解析を行ったところ、26 種類のサイトカイン解析が可能であった。同アレイには多様な分子群が含まれるが、全般として慢性肝炎では高サイトカイン血症が改善したが、非代償性肝硬変ではウイルス排除後にサイトカイン血症が有意に増悪していた。

(3) ウイルス制御後肝癌におけるウイルスゲノムの解析：

治療前 HCV ウイルスゲノムの全ゲノムに対して、nanopore 1 分子シーケンサー（第三世代シーケンサー）を導入し、rolling circle amplification 法を加えることにより、これまでにない精度でウイルスゲノムの直列配列情報と、その混在状態解析が可能となるプラットフォームである haplotyping システムを構築した。

HCV ゲノタイプ 1 型とゲノタイプ 2 型について上記 haplotyping システムを構築した。

HCV ゲノタイプ 1 型において、コアと NS5A 領域において連鎖して変異が集積して病態形成に關与することを明らかとした。

非代償性化に伴い、構造領域に高頻度に欠失が出現することを示した。

(4) 肝癌診断とモニタリングにおけるリキッドバイオプシーシステムの開発：

また本結果をリキッドバイオプシーに応用し、画像検査にて推定される腫瘍ボリュームは血中で検出される hTERT プロモーター変異量と相関することを明らかとし、hTERT プロモーター C228T 変異は腫瘍マーカーとして有望であることを示した。

血管塞栓術あるいは TKI などによる肝癌治療反応性の予測において、治療後早期の血中 hTERT プロモーター C228T 変異量の動態が有用であることを明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 1. Tahata Y, Hikita H, Mochida S, Kawada N, Enomoto N, Ido A, Yoshiji H, Miki D, Hiasa Y, Takikawa Y, Sakamori R, Kurosaki M, Yatsushashi H, Tateishi R, Ueno Y, Itoh Y, Yamashita T, Kanto T, Suda G, Nakamoto Y, Kato N, Asahina Y, Matsuura K, Terai S, Nakao K, Shimizu M, Akami T, Akuta N, Yamada RKodama T, Tatsumi T, Yamada T, Takehara T	4. 巻 56
2. 論文標題 Sofosbuvir plus velpatasvir treatment for hepatitis C virus in patients with decompensated cirrhosis: a Japanese real-world multicenter study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 67-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01733-4	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 Matsuda S, Maekawa S, Komiyama Y, Nakakuki N, Muraoka M, Suzuki Y, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Shindo H, Takano S, Fukasawa M, Yamaguchi T, Nakayama Y, Inoue T, Sato T, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.	4. 巻 51
2. 論文標題 Deep sequencing analysis of serum hepatitis B virus-RNA during nucleot(s)ide analogue therapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 39-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13574	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 Takada H, Kadokura M, Yasumura T, Yoda H, Okuwaki T, Imagawa N, Shimamura N, Tanaka K, Amemiya F, Enomoto N.	4. 巻 15
2. 論文標題 Extravasation and fluid collection on computed tomography imaging in patients with colonic diverticular bleeding.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0229884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229884	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 -

1. 著者名 Takada H, Amemiya F, Yasumura T, Yoda H, Okuwaki T, Imagawa N, Shimamura N, Tanaka K, Kadokura M, Maekawa S, Enomoto N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Relationship between presarcopenia and event occurrence in patients with primary hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67147-7	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 -

1. 著者名 Takada H, Amemiya F, Yasumura T, Yoda H, Okuwaki T, Tanaka K, Kadokura M, Enomoto N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Utility of the simplified measurements of muscle mass in patients with gastrointestinal and chronic liver diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67847-0.	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 -

1. 著者名 Osawa L, Tamaki N, Kurosaki M, Kirino S, Watakabe K, Wang W, Okada M, Shimizu T, Higuchi M, Takaura K, Takada H, Kaneko S, Yasui Y, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Enomoto N, Izumi N.	4. 巻 21
2. 論文標題 Wisteria floribunda Agglutinin-Positive Mac-2 Binding Protein but not -fetoprotein as a Long-Term Hepatocellular Carcinoma Predictor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 3640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103640	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 -

1. 著者名 Muraoka M, Maekawa S, Suzuki Y, Sato M, Tatsumi A, Matsuda S, Miura M, Nakakuki N, Shindo H, Amemiya F, Takano S, Fukasawa M, Nakayama Y, Yamaguchi T, Inoue T, Sato T, Yamashita A, Moriishi K, Matsuda M, Enomoto N.	4. 巻 50
2. 論文標題 Cancer-related genetic changes in multistep hepatocarcinogenesis and their correlation with imaging and histological findings.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 1071-1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13529	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 Higuchi M, Tamaki N, Kurosaki M, Inada K, Kirino S, Yamashita K, Hayakawa Y, Sekiguchi S, Osawa L, Takaura K, Maeyashiki C, Kaneko S, Yasui Y, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Enomoto N, Izumi N.	4. 巻 93
2. 論文標題 Changes of liver stiffness measured by magnetic resonance elastography during direct-acting antivirals treatment in patients with chronic hepatitis C.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Med Virol	6. 最初と最後の頁 3744-3751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmv.26490	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 9.Asahina Y, Liu CJ, Gane E, Itoh Y, Kawada N, Ueno Y, Youn J, Wang CY, Llewellyn J, Matsuda T, Gaggar A, Mo H, Dvory-Sobol H, Crans G, Chuang WL, Chen PJ, Enomoto N.	4. 巻 50
2. 論文標題 Twelve weeks of ledipasvir/sofosbuvir all-oral regimen for patients with chronic hepatitis C genotype 2 infection: Integrated analysis of three clinical trials.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 1109-1117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13546	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 Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Kaneko S, Tsuchiya J, Sato A, Miyoshi M, Tsunoda T, Inoue-Shinomiya E, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Tanabe M, Sugawara E, Takemoto A, Ojima H, Sakamoto M, Muraoka M, Takano S, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M	4. 巻 49
2. 論文標題 Comprehensive genetic analysis of cholangiolocellular carcinoma with a coexistent hepatocellular carcinoma-like area and metachronous hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatol Res	6. 最初と最後の頁 1466-1474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13403.	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 Shimizu T, Motosugi U, Komatsu N, Ichikawa S, Inoue T, Onishi H, Enomoto N	4. 巻 51
2. 論文標題 MRI-based risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: A prospective observational study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Magn Reson Imaging	6. 最初と最後の頁 389-396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jmri.26797.	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 Takada H, Kurosaki M, Tsuchiya K, Komiyama Y, Itakura J, Takahashi Y, Nakanishi H, Yasui Y, Tamaki N, Maeyashiki C, Kaneko S, Takaura K, Higuchi M, Okada M, Wang W, Osawa L, Sekiguchi S, Hayakawa Y, Yamashita K, Enomoto N, Izumi N	4. 巻 11(9)
2. 論文標題 Baseline and Early Predictors of Good Patient Candidates for Second-Line after Sorafenib Treatment in Unresectable Hepatocellular Carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 E1256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11091256.	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 Tamaki N, Higuchi M, Kurosaki M, Kirino S, Osawa L, Watakabe K, Wang W, Okada M, Shimizu T, Takaura K, Takada H, Kaneko S, Yasui Y, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Enomoto N, Izumi N	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Wisteria floribunda agglutinin-positive mac-2 binding protein as an age-independent fibrosis marker in nonalcoholic fatty liver disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46172-1.	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 Tamaki N, Higuchi M, Kurosaki M, Kirino S, Osawa L, Watakabe K, Wang W, Okada M, Shimizu T, Takaura K, Takada H, Kaneko S, Yasui Y, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Enomoto N, Izumi N	4. 巻 26(7)
2. 論文標題 Risk assessment of hepatocellular carcinoma development by magnetic resonance elastography in chronic hepatitis C patients who achieved sustained virological responses by direct-acting antivirals.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Viral Hepat	6. 最初と最後の頁 893-899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvh.13103.	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 Wang W, Tsuchiya K, Kurosaki M, Yasui Y, Inada K, Kirino S, Yamashita K, Sekiguchi S, Hayakawa Y, Osawa L, Okada M, Higuchi M, Takaura K, Maeyashiki C, Kaneko S, Tamaki N, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N	4. 巻 11(10)
2. 論文標題 Sorafenib-Regorafenib Sequential Therapy in Japanese Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma-Relative Dose Intensity and Post-Regorafenib Therapies in Real World Practice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 E1517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11101517.	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前川 伸哉, 松田 秀哉, 榎本 信幸
2. 発表標題 非代償性肝硬変・肝癌合併症例におけるHCVウイルスゲノムの検討
3. 学会等名 第23回 日本肝臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川 伸哉 松田秀哉 榎本信幸
2. 発表標題 DAA-SVR 後肝発癌, 非代償性肝硬変症例における HCV ウイルスゲノムの検討
3. 学会等名 第55回 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya Maekawa, Shuya Matsuda, Masaru Muraoka, Yuichiro Suzuki, Ryo Katoh, Yasuyuki Komiyama, Natsuko Nakakuki, Akihisa Tatsumi, Yuichiro Suzuki, Yasuhiro Nakayama, Taisuke Inoue, Nobuyuki Enomoto
2. 発表標題 The role of HCV genome and IL28B SNPs in the development of hepatocellular carcinoma after achieving viral elimination following interferon-free therapy.
3. 学会等名 AASLD (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前川 伸哉, 佐藤 光明, 榎本 信幸
2. 発表標題 抗ウイルス治療後の肝発癌におけるウイルスゲノム関与の検討
3. 学会等名 第105回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 光明, 前川 伸哉, 榎本 信幸
2. 発表標題 DAA による SVR 後の HCC の動向とリスク因子の検討
3. 学会等名 第105回 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019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
---------	---------