

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17008

研究課題名（和文）C型肝炎SVR後発癌/肝線維化非改善に関連する因子の同定と治療応用

研究課題名（英文）Identification of Factors Associated with Post-SVR Hepatocellular Carcinoma and Non-Improvement of Liver Fibrosis in Hepatitis C, and Therapeutic Implications

研究代表者

川岸 直樹（Kawagishi, Naoki）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：90849374

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：SVR後発癌と強く関連する1) SVR後肝線維化改善と関連するmiRNA発現変化を複数同定し、同miRNAが肝星細胞の非活性化を介して抗線維化作用を有する事を明らかにした。これら、miRNAを肝線維化モデルマウスに投与し、肝線維化を抑制する可能性を明らかにした。更に、肝線維化非改善と門脈圧亢進を介したANG2発現上昇が関連する事を同定した。さらに、長期観察例においてもANG2発現上昇が、肝線維化非改善と関連する事を明らかにし報告した。また、肝線維化非改善は肝発癌と関連する可能性を考慮して、SVR後の発癌とANG2発現上昇との関連を検討し、ANG2発現上昇が肝発癌と関連する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性C型肝炎に対する、Direct Acting Antiviral (DAA)の登場により治療の安全性・効果は飛躍的に上昇し非代償性肝硬変症例を含め大多数の症例においてウイルス学的著効(SVR)が得られるようになった。SVR症例は、多くが肝線維化の改善と肝発癌率の低下が期待されるが一部の症例においてはSVR後も肝線維化悪化・肝発癌が認められる。しかしながら、現在までにSVR後の肝線維化悪化、肝発癌を予測する因子については十分に明らかとされていない。本研究で得られた結果により、SVR後発癌予防、肝線維化改善のターゲットの同定と治療応用への萌芽的知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：We identified multiple miRNA expression changes strongly associated with post-SVR HCC and involved in the improvement of liver fibrosis after SVR. We demonstrated that these miRNAs have anti-fibrotic effects through the deactivation of hepatic stellate cells. Furthermore, we investigated the potential of administering these miRNAs to a liver fibrosis model mouse, revealing their ability to suppress liver fibrosis. Additionally, we identified the association between non-improvement of liver fibrosis and increased expression of ANG2 mediated through portal hypertension. In a long-term observational study, we also reported the correlation between increased ANG2 expression and non-improvement of liver fibrosis. Considering the potential association between non-improvement of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma, we examined the relationship between post-SVR hepatocellular carcinoma and increased ANG2 expression.

研究分野：消化器内科学

キーワード：HCV 肝癌 肝線維化

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎感染は国内に依然 100 万人前後の慢性感染者が存在し、いまだに本邦における肝硬変・肝癌の主因の一つである。従来、C 型慢性肝炎に対してはインターフェロン (IFN) 主体の治療が行われていたが低い著効率 (SVR 率) と、高い副作用発現が大きな問題となった。近年 C 型肝炎ウイルス (HCV) を直接にターゲットとした DAA が登場しウイルス排除率は大きく向上し、高い安全性が確認された。本邦においても、2014 年に IFN-free の daclatasvir/asunaprevir 併用療法の承認後、多くの薬剤が実臨床応用とされ、かつてないほど HCV SVR 後症例が存在する。DAAs により SVR となった症例については、多くが肝線維化の改善と肝発がん率の低下が期待される。一方で一部の症例においては SVR 後も肝線維化悪化・肝発がんが認められる。しかしながら、現在までに SVR 後の肝線維化悪化、肝発がんを予測する因子・症例については十分に明らかとされておらず、高リスク患者の絞り込みは未だ困難である。SVR 後肝発癌、肝病態悪化と関与する因子を同定し治療ターゲットとし肝癌発癌抑制、肝病態の全例での改善を目指す事が急務となる。

2. 研究の目的

申請者は、DAAs 治療による SVR 後の肝線維化変化について、フィブロスキャン®を用いて検討を行ったところ 3 分の 1 の症例において、DAAs 治療後 24 週の時点で非改善、悪化している事を明らかにした。そこで、SVR 後に肝線維化改善例、非改善例に関して予測因子を検討した。肝線維化改善群 3 例、非改善例 3 例より治療終了時の血清より miRNA を抽出し miRNA array にて検討すると、改善群のみで発現する miRNA を新規に複数同定。同定した、新規 miRNA の肝線維化改善の predictive maker としての可能性を探索する為に多数例において RT-PCR 法にて確認を行い治療後の肝予備能改善症例でのみ高発現する miRNA を同定した。この miRNA の肝線維化改善作用と臨床応用について検討する。

更に、申請者は肝線維化非改善群における非改善に関与する因子について、遺伝的背景、サイトカイン変化などを網羅的に検討する中で、Angiopoietin 2 値異常高値が DAAs 治療後の肝線維化非改善と関与する事を明らかにした (Kawagishi et al, in submission)。そこで、長期における Angiopoietin 2 の肝線維化改善効果予測効果の検討、肝癌発症予測マーカーとして可能性を検討する。

3. 研究の方法

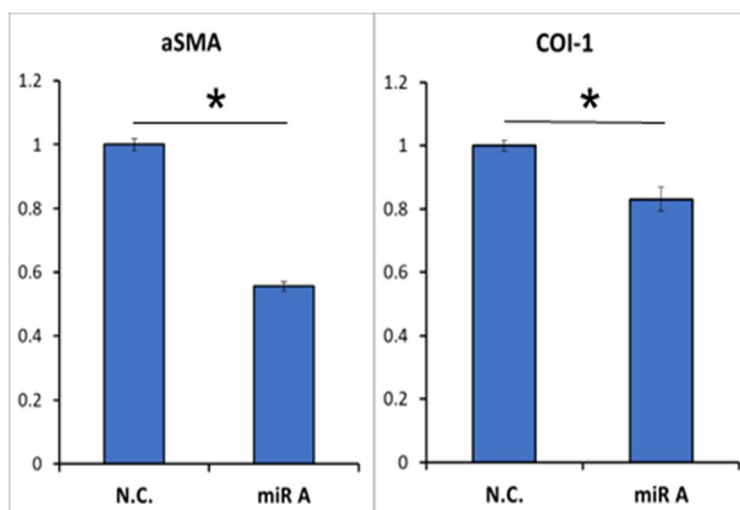
in vitro, in vivo 肝線維化モデルにおける同定した miRNA の肝線維化改善作用の検討を行う

多施設共同研究研究グループの NORTE Study Group において SVR 後患者における肝線維化改善効果、肝発癌予測マーカーとしての Angiopoietin 2 の検討を行う。

図 1

4. 研究成果

HCV 患者の中で、DAAs による SVR 後にも関わらず肝線維化が非改善、悪化する症例がいる事を明らかにした (Kawagishi et al, Hepatol Res 2020)。肝線維化非改善関連因子を検討し肝線維化が改善または非改善症例に有意に高く発現する miRNA を複数同定した。同定した miRNA 群のうち miRNA A を肝星細胞である



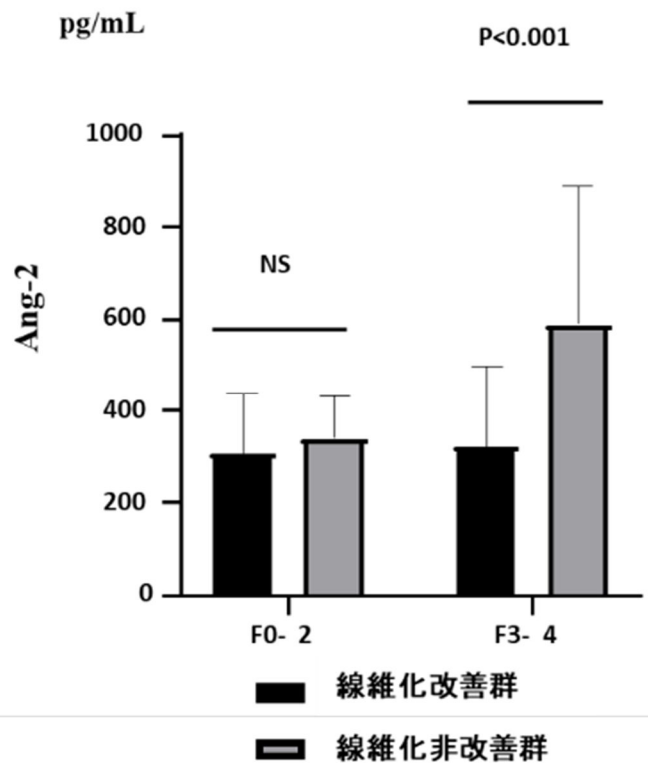
LX-2 細胞に導入すると肝星細胞の活性化マーカーである Alpha-SMA や collagen 1 などの発現を抑制し、更に TGF- β による刺激に対しても肝星細胞の活性化抑制を確認した。

更に、LX-2 に miRNA A, mock miRNA を導入後に変化する遺伝子を micro array を用いて検討すると Negative regulation of chemotaxis に関与する遺伝子群の変化が miRNA A 導入により確認された。(図2) その中で、miRNA A は強く CCL-2 を抑制する可能性が示唆された。RT-PCR にも miRNA は肝星細胞の CCL-2 を抑制する事が確認され、それに伴い、肝星細胞活性化マーカーである α -SMA などの発現低下を認め、TGF- β 刺激時も同様の結果であった。

miRNA A は HCV 感染肝癌細胞(Huh7 細胞)培養上清中のエクソソーム中では低下し、Sofosbuvir による治療で上昇する事も確認された。すなわち、DAAによる HCV 排除に伴い、肝細胞より miRNA A を含むエクソソームの増加、それに伴い肝星細胞の CCL-2 発現低下による非活性化がおこり、肝線維化改善起こる可能性が想定された。しかし実臨床における多数例での前向きな検討、HCV 排除により増加するエクソソーム中 miRNA A の星細胞に対する直接的な作用、動物モデルでの検証を通した miRNA A の治療ターゲットへの更なる検証が期待される miRNA-A は、肝星細胞の cell line である LX-2 の活性化を抑制する事、その機序として WNT/ β -catenin signal を抑制する事により肝線維化を抑制する事を明らかにした。更に、予備的な検討において四塩化炭素肝線維化モデルマウスにおいて miRNA-A 投与にて肝線維化が抑制される事を確認した。

○ ANG2 は、Tie2 receptor を介して血管の不安定化と関与し、ANG2 高値は血管の脆弱性とそれに伴う炎症の惹起が起こる事が報告されている。更に、肝臓における門脈血流の低下は SVR 後の肝予備能非改善と関与する事は報告されているが、我々は独自の検討にて ANG2 値が HCV 治療前の肝線維化と関連するとともに、ANG2 の値により鋭敏に SVR 後長期における肝線維化非改善を予測できる事を明らかにした(図2)。更に、申請者は ANG2 と HCV 排除後の肝病態との関連で ANG2 発現が、SVR 後の線維化の改善・非改善を長期にわたり予測可能である事を明らかにした(Kawagishi et al, Hepatol Res 2020, Kawagishi et al, Sci Rep 2021)。更に、申請者は ANG2 発現が SVR 後の肝発癌と関連する事を明らかにした。

図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tokuchi Yoshimasa, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Kitagataya Takashi, Ohara Masatsugu, Yamada Ren, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Sakamoto Naoya	4. 巻 28
2. 論文標題 Changes in the estimated renal function after hepatitis C virus eradication with direct acting antiviral agents: Impact of changes in skeletal muscle mass	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Viral Hepatitis	6. 最初と最後の頁 755 ~ 763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jvh.13484	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 Shigesawa Taku, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Tokuchi Yoshimasa, Kubo Akinori, Yamada Ren, Furuya Ken, Baba Masaru, Kitagataya Takashi, Suzuki Kazuharu, Ohara Masatsugu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Sakamoto Naoya	4. 巻 16
2. 論文標題 Baseline serum angiopoietin-2 and VEGF levels predict the deterioration of the liver functional reserve during lenvatinib treatment for hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247728	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 Kawagishi Naoki, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Yamada Ren, Tokuchi Yoshimasa, Kubo Akinori, Kitagataya Takashi, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Ohara Masatsugu, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Kudo Yusuke, Nishida Mutsumi, Sakamoto Naoya	4. 巻 11
2. 論文標題 Baseline elevated serum angiopoietin-2 predicts long-term non-regression of liver fibrosis after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-88632-7	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 Kubo Akinori, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Tokuchi Yoshimasa, Kitagataya Takashi, Ohara Masatsugu, Yamada Ren, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuizaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Ohnishi Shunsuke, Sakamoto Naoya	4. 巻 13
2. 論文標題 Characteristics and Lenvatinib Treatment Response of Unresectable Hepatocellular Carcinoma with Iso-High Intensity in the Hepatobiliary Phase of EOB-MRI	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3633 ~ 3633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13143633	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 Sho Takuya, Suda Goki, Ogawa Koji, Kimura Megumi, Kubo Akinori, Tokuchi Yoshimasa, Kitagataya Takashi, Maehara Osamu, Ohnishi Shunsuke, Shigesawa Taku, Nakamura Akihisa, Yamada Ren, Ohara Masatsugu, Kawagishi Naoki, et.al.,	4. 巻 51
2. 論文標題 Early response and safety of atezolizumab plus bevacizumab for unresectable hepatocellular carcinoma in patients who do not meet IMbrave150 eligibility criteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 979 ~ 989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13693	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 Shigesawa T, Suda G, Kimura M, Maehara O, Tokuchi Y, Kubo A, Yamada R, Furuya K, Baba M, Kitagataya T, Suzuki K, Ohara M, Kawagishi N, Nakai M, Sho T, Natsuizaka M, Morikawa K, Ogawa K, Sakamoto N.	4. 巻 16(3)
2. 論文標題 Baseline serum angiopoietin-2 and VEGF levels predict the deterioration of the liver functional reserve during lenvatinib treatment for hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247728. eCollection 2021.	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 Kazuharu Suzuki, Goki Suda, Yoshiya Yamamoto, Ken Furuya, Naoya Sakamoto	4. 巻 56(2)
2. 論文標題 Tenofovir-disoproxil-fumarate modulates lipid metabolism via hepatic CD36/PPAR-alpha activation in hepatitis B virus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol.	6. 最初と最後の頁 168-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-020-01750-3	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 Naoki Kawagishi , Goki Suda , Megumi Kimura , Naoya Sakamoto	4. 巻 50(6)
2. 論文標題 High serum angiopoietin-2 level predicts non-regression of liver stiffness measurement-based liver fibrosis stage after direct-acting antiviral therapy for hepatitis C	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatol Res .	6. 最初と最後の頁 671-681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13490	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 Taku Shigesawa , Goki Suda , Megumi Kimura , Tomoe Shimazaki , Osamu Maehara , Ren Yamada , Takashi Kitagataya , Kazuharu Suzuki , Akihisa Nakamura , Masatsugu Ohara , Machiko Umemura , Naoki Kawagishi , Masato Nakai , Takuya Sho , Mitsuteru Natsuzaka , Kenichi Morikawa , Koji Ogawa , Naoya Sakamoto	4. 巻 4(5)
2. 論文標題 Baseline angiopoietin-2 and FGF19 levels predict treatment response in patients receiving multikinase inhibitors for hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JGH Open .	6. 最初と最後の頁 880-888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12339	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 Kawagishi Naoki, Suda Goki, Yamamoto Yoshiya, Baba Masaru, Furuya Ken, Maehara Osamu, Ohnishi Shunsuke, Yoshida Sonoe, Fu Qingjie, Yang Zijian, Hosoda Shunichi, Tokuchi Yoshimasa, Kitagataya Takashi, Ohara Masatsugu, Suzuki Kazuharu, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Ogawa Koji, Sakamoto Naoya	4. 巻 15
2. 論文標題 Serum Angiopoietin-2 Predicts the Occurrence and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 181 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v15010181	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 Tokuchi Yoshimasa, Suda Goki, Kawagishi Naoki, et al.,	4. 巻 -
2. 論文標題 Hepatitis C virus eradication by direct acting antivirals causes a simultaneous increase in the prevalence of fatty liver and hyper low density lipoprotein cholesterolemia without an increase in body weight	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13899	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0件

〔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
---------	---------