

（課題 1）C 型肝炎 DAAs 治療後と NAFLD の長期観察に基づく研究

（課題 2）B 型慢性肝疾患における肝癌発症高リスク症例の拾い上げに関する研究

研究分担者 (1) 芥田憲夫 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 肝臓内科 医長

(2) 保坂哲也 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 肝臓内科 医長

研究要旨

（課題 1）C 型肝炎 DAAs 治療後で SVR を達成すると肝発癌率と肝疾患関連死亡率は減少し、肝発癌リスクが高い肝硬変症例に絞っても同様な結果が得られることが確認された。肝硬変症例における肝発癌リスク因子として治療終了後の肝硬度と AFP が実臨床で有用な指標となることが示された。肝生検 NAFLD からの肝疾患関連イベント発生率は 4.17/千人年（肝癌 3.67/千人年）、心血管系イベント 5.73/千人年、2 型糖尿病発生率 9.95/千人年。糖尿病発症は他のイベントよりも高率であった。肝疾患イベントは心血管系と大きな差を認めず、肝疾患イベントの中では肝癌が高率であった。累積生存率は、10 年 91%、20 年 91%、30 年 91% であり、FIB-4 index は生存に寄与する予測因子として有用であった。死亡例では肝疾患関連イベントが最も生命予後に影響していた。SGLT2 阻害薬の肝組織改善効果の検討では、全例が肝細胞脂肪化と NAFLD activity score が改善し、肝線維化も 30% で改善が確認され、本薬剤の長期肝発癌抑制効果を示唆する所見が得られた。

（課題 2）核酸アナログ製剤の長期投与により B 型肝炎の発症は抑制傾向となっているが一定数の肝発癌症例は存在している。よって B 型慢性肝疾患における肝癌発症高リスク症例の拾い上げが重要となってくる。本研究 3 において、核酸アナログ投与症例の肝癌高リスク症例の囲い込みを目的として、肝硬変の有無、投与中の HBcrAg 量、年齢の 3 因子を使用した簡便なスコアを作成できその予測能は良好であった。本研究 4 において、HBeAg 陰性非肝硬変症例を対象に、B 型肝炎ガイドラインを基に HBVDNA 量、ALT 値のどちらか一方のみ治療対象域に到達している症例をグレーゾーン（GZ）症例とし、GZ 症例については HB コア関連抗原（HBcrAg）量にて肝発癌リスクの層別化を行ったところ良好な層別化が得られ、肝発癌リスクの評価法の再構築が可能であった。本研究 5 においては、抗ウイルス療法無治療で肝生検を行った HBeAg 陽性例を対象に線維化進行予測モデルを構築した。年齢、血小板数、 γ GTP、AFP、HBs 抗原量の 5 因子を用いたモデルを作成し、線維化ステージ F3 以上の予測能は良好であった。

A. 研究目的

（課題 1）直接作用型抗ウイルス剤（DAAs）併用療法（IFN フリーレジメン）の登場により HCV はほぼ排除可能な時代を迎えた。治療の進歩に伴い、近年 C 型肝炎は減少傾向となり、脂肪肝を含む非 B 非 C 型肝炎が増加傾向にある。即ち、ウイルスフリー状態からの肝発癌に移行してきたといえる。

研究 1 として、C 型肝炎 IFN フリーレジメンの治療効果別に見た肝発癌率、肝疾患関連死亡率を検討する。実臨床で有用な SVR 後肝発癌リスク因子を多数例で検討する。

研究 2 として、肝生検で確定診断された非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の長期観察例に基づき生存率や各種イベント発生頻度を検討する。糖尿病発症における NAFLD のインパクトや、糖尿病治療のインパクトを検討する。

（課題 2）B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤治療が登場し約 20 年が経過した。核酸アナログ製剤の長期投与により B 型肝炎の発症は抑制傾向となっているが一定数の肝発癌症例は存在している。また分担者の所属施設は東京都の肝炎拠点病院かつ肝疾患専門医療機関であるため、肝炎スクリーニン

グ等で拾い上げた症例が多数受診する。よって B 型慢性肝疾患における肝癌発症高リスク症例の拾い上げ及び肝発癌リスクに応じたフォローアップと、リスクを軽減させる対策を確立する目的で、以下の研究を行った。

(研究 3) 核酸アナログ投与症例における肝癌発症の実態調査と、簡便かつどのタイミングでも評価可能な肝発癌リスクの評価法の確立することを目的とした。

(研究 4) 抗ウイルス療法無治療症例における肝発癌リスクの評価法を確立し、治療介入やフォローアップ基準を明確にし、肝発癌リスクを軽減する仕組みを構築することを目的とし、HBeAg 陰性抗ウイルス療法無治療非肝硬変症例を用いて新たな肝発癌リスクの層別化を行った。

(研究 5) B 型肝炎無症候性キャリアを含めた HBeAg 陽性例は若年例も多く、肝生検の実施や抗ウイルス療法導入のタイミングに苦慮する場面もしばしば遭遇するため、血液検査や HBV マーカーを用いて簡便に線維化推定を行えるモデルの構築を HBeAg 陽性抗ウイルス療法無治療症例において行った。

B. 研究方法

(課題 1)

(研究 1) 虎の門病院で C 型肝炎に対して IFN フリーレジメンを導入して Sustained virological response (SVR; 治療終了後 12 週経過時点の HCV RNA 陰性状態) を達成した肝癌既往歴のない 2,476 例を対象に、肝発癌率、肝疾患関連死亡率と肝発癌に寄与する要因を多変量解析でレトロスペクティブに検討した。

(研究 2) 虎の門病院で肝生検で確定診断された NAFLD 441 例を対象に、肝疾患関連イベントとその他各種イベント(心血管系、悪性疾患、2 型糖尿病)の新規発生頻度、生存率、死因をレトロスペクティブに検討した。更に糖尿病合併 NAFLD の 10 例を対象に、腎臓での再吸収阻害による尿中ブドウ糖排泄促進作用を示す SGLT2 阻害薬 24 週間投与の肝組織改善へのインパクトをレトロスペクティブに検討した。

(課題 2)

(研究 3) 当施設における B 型慢性肝疾患に対する

核酸アナログ投与症例 1077 例の、治療開始時および治療中の背景因子および、HBV マーカー(HBcrAg、HBeAg、HBVDNA 量等)の 1 年毎の経時的変化についてのデータベースを構築した。B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ投与症例における肝発癌率を算出し、肝癌発症に関係する因子を抽出した。作成したデータベースを学習用データセットと検証用データセットに 1:1 分割し、学習用データセットを用いて、どのタイミングでも評価可能な肝発癌予測モデルを作成した。作成したモデルを用いて、検証用データセットで妥当性を検証した。

(研究 4) 当施設において HBe 抗原陰性無治療かつ非肝硬変症例 1689 例を対象に、まず HBVDNA 量と ALT 値から現在の肝臓学会 B 型肝炎ガイドラインを基に治療対象例の層別化を行い、更に HBVDNA 量または ALT 値のどちらか一方のみ治療対象域に到達している症例をグレーゾーン(GZ)症例とし、GZ 症例については HBcrAg(HB コア関連抗原)量による層別化を行い、肝発癌率の比較とリスク評価を行った。

(研究 5) 当施設にて抗ウイルス療法無治療で肝生検を行った HBeAg 陽性例 888 例を対象とし、肝線維化ステージ F3 以上の予測モデルを作成した。モデル作成に使用した指標は、一般的な血液生化学検査および HBV マーカーである。対象症例をランダムに 6 分割し、5 つのデータセットを Derivation set (738 例)、残り 150 例を Validation set とした。5 分割した Derivation set は K-fold cross-validation (K=5) でモデル作成と交差検証を行った。作成したモデルについて Validation set にて予測精度を検証した。モデル作成のアルゴリズムには Lasso (Least absolute shrinkage and selection operator) 推定 Logistic 回帰を使用した。

(倫理面の配慮)

本研究は虎の門病院研究倫理審査委員会で承認された臨床研究である(承認番号 935-H/B、953-H/B、1526-H/B、1850-H/B、2158-H/B、2223-H/B)。

C. 研究結果

(課題 1)

(研究 1) 2,476 例の全対象で評価した肝発癌率は SVR 例 1.0%/年、non SVR 例 3.6%/年(Log-rank test, $P < 0.001$)。FIB4 index 3.25 以上の肝硬変 902

症例で評価した肝発癌率は SVR 例 2.0%/年、non SVR 例 5.2%/年 (Log-rank test, $P<0.001$)。全対象で評価した肝疾患関連死亡率は SVR 例 0.0%/年、non SVR 例 2.0%/年 (Log-rank test, $P<0.001$)。肝硬変症例で評価した肝疾患関連死亡率は SVR 例 0.1%/年、non SVR 例 2.8%/年 (Log-rank test, $P<0.001$)。

IFN フリーレジメンで SVR を達成すると肝発癌率と肝疾患関連死亡率は減少し、肝発癌リスクが高い肝硬変症例に絞っても同様な結果が得られることが確認された。肝硬変症例で肝発癌に寄与する治療終了後の独立要因として、多変量解析 (Cox 比例ハザードモデル) で肝硬度 (≥ 8.0 kPa; $P=0.016$) と AFP (≥ 5 $\mu\text{g/l}$; $P=0.077$) の 2 因子が抽出された。IFN フリーレジメン SVR 例からの肝発癌リスク因子として治療終了後の肝硬度と AFP が実臨床で有用な指標となることが示された。

(研究 2) 肝疾患関連イベント発生率 4.17/千人年 (肝癌 3.67, 肝性脳症 1.60, 食道胃静脈瘤 2.43, 腹水 0.80, 黄疸 0.40/千人年)、心血管系イベント 5.73/千人年、2 型糖尿病発生率 9.95/千人年、肝癌以外の悪性疾患発生率 8.93/千人年。糖尿病発症は他のイベントよりも高率であった。肝疾患イベントは心血管系と大きな差を認めず、肝疾患イベントの中では肝癌が高率であった。累積生存率は、10 年 91%、20 年 91%、30 年 91%であった (Kaplan-Meier 法)。FIB-4 index から生存率を評価すると、1.30 未満, 1.30-2.66, 2.67 以上の 3 群で値が高くなる程、生存率が低下することが確認された (Log-rank test, $P<0.001$)。死亡例 21 例の内訳は、肝癌 9 例、肝不全 4 例、心血管系 2 例、他臓器悪性疾患 4 例、その他 2 例であり、肝疾患関連イベントが最も生命予後に影響していた。SGLT2 阻害薬の肝組織改善効果を検討した 10 例では、24 週経過時点で全例が肝細胞脂肪化と炎症を反映する NAFLD activity score が改善し、肝線維化は 3 例 (30%) で改善した。

(課題 2)

(研究 3) 実臨床での計算を容易にするのと、Overfitting を避けるために、使用パラメータはできるだけ少なく、多変量解析で抽出された因子と過去に多数報告のある肝発癌に寄与する因子を総合的に考慮し、採用することとした。スコア作成用に用い

たパラメータは 1 年毎の HBcrAg 量、各時点での年齢と肝硬変の有パラメータであった。Cox 比例ハザードモデルで算出された回帰係数を元に図 1 に示すようにスコアを作成した。核酸アナログ開始後 5 年をランドマークとして時間依存性 AUROC を算出したところ、Traning set と Validation set ともに AUROC は 0.8 を超え、予測能は良好であった (図 2)。また算出されたスコアを元に 3 群のリスク群に層別化し、肝発癌率を比較したところ、図 3 に示すように肝発癌リスクの層別化は良好であった。

(研究 4) 図 4 に示すように、B 型肝炎ガイドラインの抗ウイルス療法導入基準を元に、HBV DNA 量と ALT 値を用いて層別化の再構築を行った。グループ 1-4 をグレーゾーンとした。対象症例を図 1 の基準で層別化し、グループ別の肝発癌率を比較したところ、抗ウイルス療法適応となるグループ 5 の発癌率が最も高率であり、治療適応とならない (所謂非活動性キャリアに相当する) グループ 0 の肝発癌率は低率であった。グレーゾーンであるグループ 1,4,3 の肝発癌率はグループ 0 と 5 の中間であった (図 5)。次にグレーゾーンに該当する症例について、HBcrAg 量で層別化した。カットオフを 4.0 logU/mL と設定し、肝発癌率を比較すると、図 6 に示すように、グレーゾーンかつ HBcrAg 量 4.0 logU/mL 以上の群では肝発癌率がグループ 5 とほぼ同率であり、またグレーゾーンかつ HBcrAg 量 4.0 logU/mL 未満の群ではグループ 0 に近い肝発癌率であった。以上の結果から図 7 に示すように、HBe 抗原陰性症例における新たなフォローアップのストラテジーを構築することができた。本邦のガイドラインだけでなく、米国や欧州などのガイドラインを用いて同様の解析を行っても結果は同様の結果が得られた。また、external validation として国立台湾大学の症例で同様の解析を行っても図 6 の結果とほぼ同様な結果が得られた。

(研究 2) Lasso 推定 Logistic 回帰により肝線維化 F3 以上予測モデル作成で抽出された因子は年齢、血小板数、 γ GTP、AFP、HBs 抗原 (HBsAg) 量の 5 因子であった。この 5 因子を用いて回帰係数を基に、図 8 に F3 以上の線維化予測のスコアリングを作成した。各項目を足し算して 0-14 点のスコアレンジの予測モデルが作成できた。予測能について評価したところ、F3 以上予測の AUROC は

Derivation set で 0.833 (95%信頼区間：0.804-0.863、以下同様)、Validation set で 0.853 (0.791-0.915)と、モデル作成に使用していない Validation set においても F3 以上の予測能は良好であった (図 9)。また同一モデルを使用して F2 以上の予測についても検討したが、F3 以上予測の場合より AUROC は低値であったが、Validation set においても予測能が低下することはなかった (図 9)。図 10 に示すように各スコア毎の実際の肝生検の線維化ステージの分布を検討したところ、スコア 6 点で約半数以上が F2 以上の線維化を有することが分かった。

D. 考察

(課題 1) 多数例に基く IFN フリーレジメン SVR 後の肝発癌と肝疾患関連死亡率に関する詳細な検討は行われていない。今回、IFN フリーレジメンの SVR 例では、IFN レジメンと同様に肝発癌率と肝疾患関連死亡率は減少し、肝発癌リスクが高い肝硬変症例に絞っても同様な結果が得られることが確認された。更に、実臨床で有用な肝発癌予測マーカーは非侵襲的かつ IFN フリー治療後の検査であることが期待される。今回、治療後の肝硬度と AFP が背景肝における悪性度のポテンシャルを示す実臨床で有用な指標であることが確認された。

SVR 後肝発癌はウイルスフリー状態からの肝発癌である。代謝要因が肝発癌に及ぼすインパクトが近年注目されている。特に、糖尿病に代表されるメタボリックシンドロームに合併する傾向にある NAFLD からの肝発癌は今後の重要課題であり、SVR 後肝発癌を考えるためにも重要である。今回、肝生検 NAFLD からの肝発癌率は年率 3.67/千人年であることが確認された。本検討は、SVR 後肝発癌における代謝要因のインパクトを考える上での重要な基礎データといえる。肝線維化が進行した NAFLD は肝発癌のリスクが高い状態と言える。SGLT2 阻害薬の肝組織改善効果を検討した本研究では肝線維化も 30%改善することが確認され、本薬剤の長期肝発癌抑制効果を示唆する所見が得られた。

(課題 2) 今回作成した核酸アナログ投与中の肝発癌リスク予測モデルは、投与中のどのタイミングでも評価可能と考えられ、また使用パラメータも実臨床で評価可能なものであるため、核酸アナログ投与例の肝発癌リスク評価が容易になると思われ、これ

によりリスクに応じたフォローアップが可能になると期待される。今後は外部妥当性の評価が必要である。

現在の B 型肝炎ガイドラインの抗ウイルス療法導入基準を参照する際に、HBV DNA 量と ALT 値のどちらか一方のみが、基準を越えている所謂グレーゾーンの場合、フォローアップ方法に苦慮する場面がある。グレーゾーンの症例について本研究の HBcrAg 量を用いた基準で層別化を行うことで、より厳密な肝発癌リスク評価を行うことができた。本研究で作成したフォローアップのストラテジーは HBV DNA 量と ALT 値に加え、HBcrAg 量のみを加えたものであり、実臨床でも簡便にリスク評価できると期待される。

HBeAg 陽性症例は HBeAg 陰性例と比べると若年齢が多く、HBV DNA 量が非常に高値であっても ALT 値が正常を維持する無症候性キャリア (所謂免疫寛容期) の呼ばれる症例の線維化進行の評価に苦慮する場面に遭遇する。肝生検は線維化評価を正確に行うことができるが、その侵襲性と入院が原則の検査であることから、施行が難しい場面も多い。今回作成した線維化進行評価モデルは、実臨床で測定している一般血液検査項目や HBV マーカーを使用したものであるため、非侵襲的にかつ簡便に線維化評価ができ、適切な抗ウイルス療法導入の判断基準になるものと期待される。

E. 結論

(課題 1)

(研究 1) C 型肝炎 IFN フリーレジメンの SVR 例では肝発癌率と肝疾患関連死亡率が低下した。SVR 後肝発癌リスク因子として肝硬度と AFP が実臨床で有用な指標であることが確認された。

(研究 2) 肝生検 NAFLD における肝疾患イベントの発生頻度は心血管系とほぼ同等で、糖尿病の発症も高率であった。SGLT2 阻害剤は糖尿病合併 NAFLD の肝組織改善を目指した食事・運動療法以外の内科的な一選択肢として期待される。

(課題 2)

(研究 3) 本研究では核酸アナログ投与中症例の肝発癌高リスク症例を囲い込める簡便なスコアを作成することができた。

(研究 4) 本研究では、HBVDNA 量、ALT 値、HBcrAg 量を用いて、抗ウイルス療法無治療症例における肝発癌リスクの評価法の再構築が可能であった。今後は治療介入による、肝発癌リスクを軽減効果を検討する必要がある。

(研究 5) 本研究で作成したモデルは肝生検などの肝線維化評価を実施する一つの判断材料となり得る。適切な肝線維化評価を行うことが肝癌高リスク症例の囲い込みにつながると期待される。

F. 健康危険情報

今回の研究内容については特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Akuta N, Kawamura Y, Arase Y, Saitoh S, Fujiyama S, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Suzuki Y, Suzuki F, Ikeda K, Kumada H. Circulating MicroRNA-122 and Fibrosis Stage Predict Mortality of Japanese Patients With Histopathologically Confirmed NAFLD. *Hepatol Commun* 2019;4:66-76.
2. Akuta N, Kawamura Y, Fujiyama S, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictors of Insulin Secretion in Japanese Patients with Histopathologically-confirmed Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Intern Med*. 2019 Sep 18. [Epub ahead of print].
3. Akuta N, Kawamura Y, Watanabe C, Nishimura A, Okubo M, Mori Y, Fujiyama S, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Impact of sodium glucose cotransporter 2 inhibitor on histological features and glucose metabolism of non-alcoholic fatty liver disease complicated by diabetes mellitus. *Hepatol Res* 2019;49:531-539.
4. Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Kobayashi M, Fujiyama S, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Complex Association of Virus- and Host-Related Factors with Hepatocellular Carcinoma Rate following Hepatitis C Virus Clearance. *J Clin Microbiol* 2019;57(1).
5. 芥田憲夫, 川村祐介, 荒瀬康司, 斎藤聡, 藤山俊一郎, 瀬崎ひとみ, 保坂哲也, 小林正宏, 小林万利子, 池田健次, 熊田博光, 鈴木文孝, 鈴木義之. SGLT2 阻害薬が糖尿病合併非アルコール性脂肪性肝炎に及ぼす長期組織学的インパクト—治療導入 3 年目の肝組織評価が可能であった 3 例—。 *肝臓* 2020;61:24-27.

6. Tseng TC, Hosaka T, Liu CJ, Suzuki F, Hong CM, Kumada H, Yang YT, Hsu CY, Su TH, Yang HC, Liu CH, Chen PJ, Chen HH, Kao JH. Hepatitis B core-related antigen stratifies the risk of liver cancer in HBeAg-negative patients with indeterminate phase. *American Journal of Gastroenterology*, In revision, 2022, in press.

2. 学会発表

1. Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, Kobayashi M, Fujiyama S, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Complex association of virus- and host-related factors with treatment resistance to DAAs regimens and HCC following HCV eradication. The 70th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, MA. USA. 2019.
2. 保坂哲也, 鈴木文孝, 熊田博光. 核酸アナログ投与中の B 型慢性肝疾患における, 簡便かつ投与中のどのタイミングでも評価可能な肝発癌リスク評価法の開発. 第 56 回日本肝臓学会総会 (PD6: 肝臓・肝炎の拾い上げとリスク評価) (大阪) 2020.8.29
3. 保坂哲也, 鈴木文孝, 熊田博光. B 型慢性肝疾患における機械学習を用いた肝線維化予測. 第 107 回日本消化器病学会総会 (WS16: 肝臓のハイリスク患者 地域, 職域, 院内での拾い上げ) (東京) 2021.4.16
4. 山重大樹, 保坂哲也, 鈴木文孝. HBe 抗原陰性 B 型慢性肝疾患無治療例における病態予測因子の検討. 第 44 回日本肝臓学会西部会 (SY3: HBs 抗原消失, 肝発がん抑制を目指した B 型肝炎治療の現状と展開) (岡山) 2021.12.9

H. 知的所有権の出願・取得状況

今回の研究内容については特になし

図 1

スコア作成

Cirrhosis at Baseline	Age (Any point)	On-treatment HBcrAg (Any point)
No: 0	< 55 yr: 0	< 3.7: 0
Yes: 4	≥ 55 yr: 1	≥ 3.7: 2

- 各項目を足し算
- 1年毎に計算する

Score range: 0 to 7

図 2

Time-dependent ROC曲線

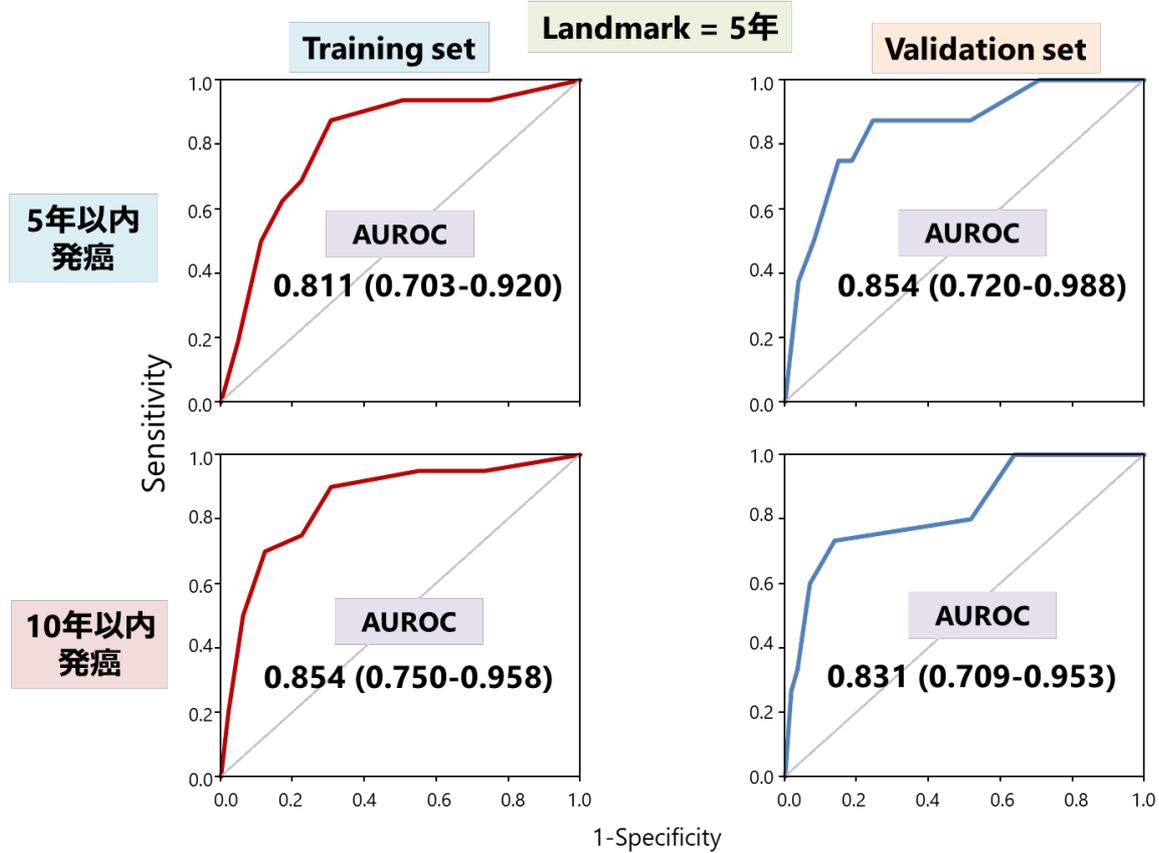


図 3

累積肝発癌率の比較 (Training setと Validation set)

Landmark = 5年

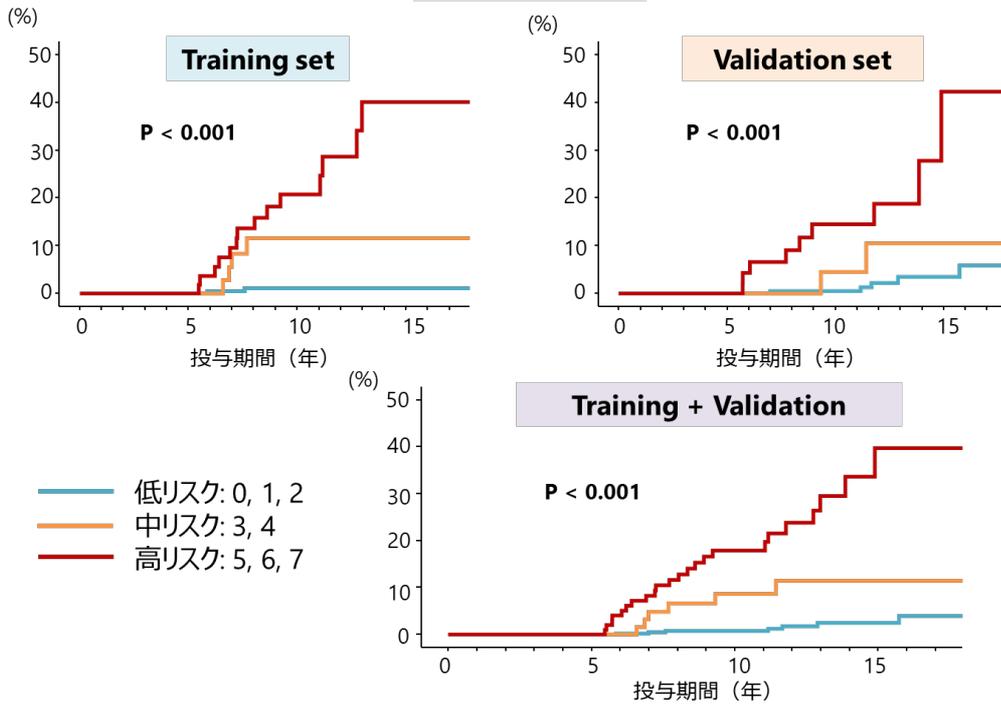


図 4

HBVDNA量とALT値による層別化を再構築

	ALT <31 IU/L	ALT ≥31 IU/L
HBV DNA < 3.3 log IU/ml	0	1
HBV DNA 3.3-4.2 log IU/ml	2	3
HBV DNA ≥ 4.3 log IU/ml	4	5

グループ1-4をグレーゾーンとする

図 5

HBVDNA量とALT値によるグルーピングから見た 累積肝発癌率

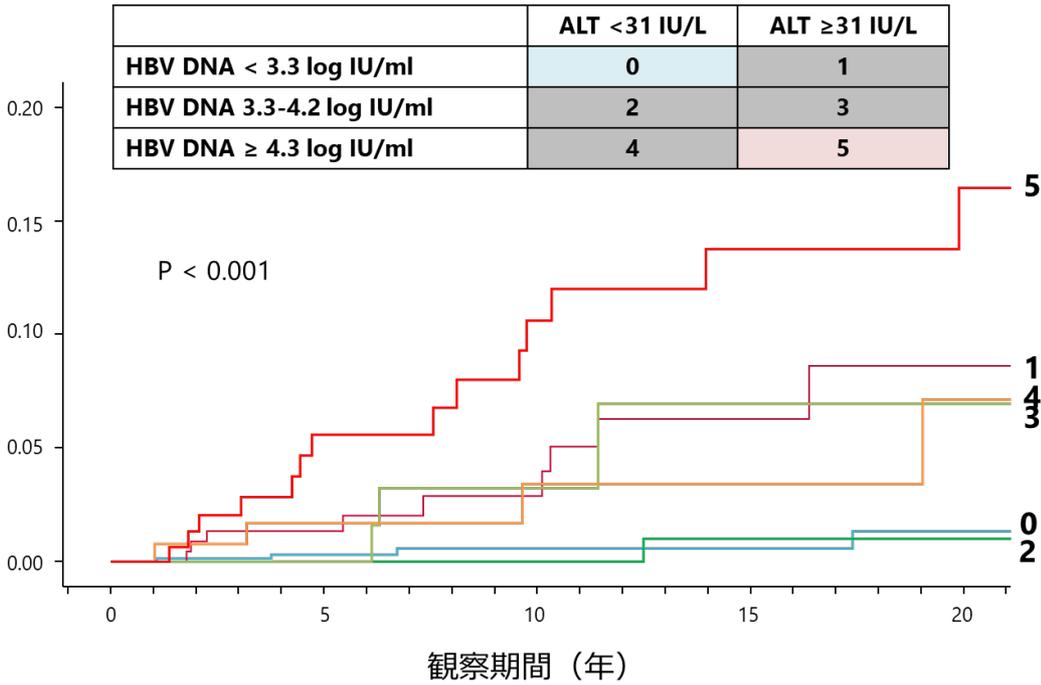


図 6

グレーゾーン症例をHBcrAg量で層別化した 累積肝発癌率

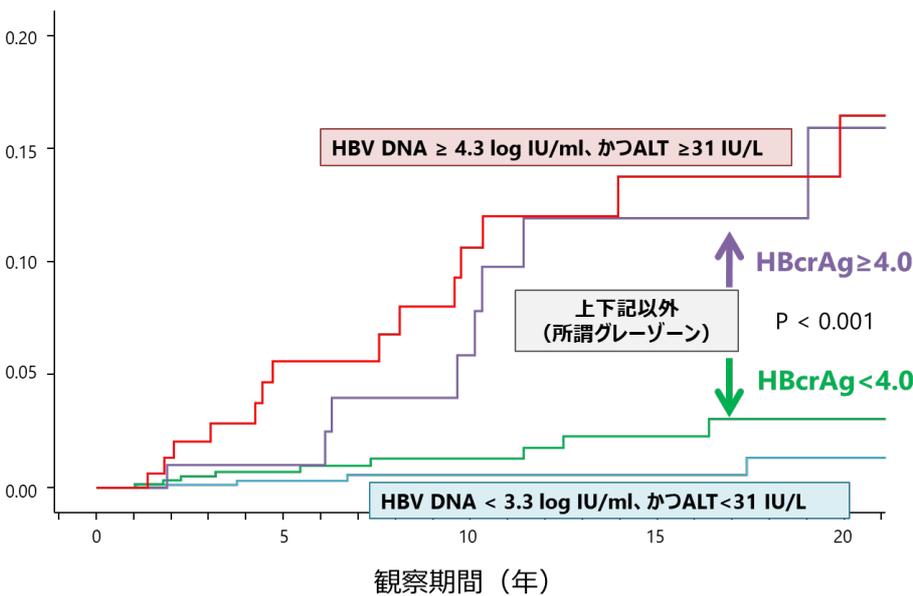


図 7

HBsAg陰性非肝硬変症例におけるフォローアップの新たなストラテジー

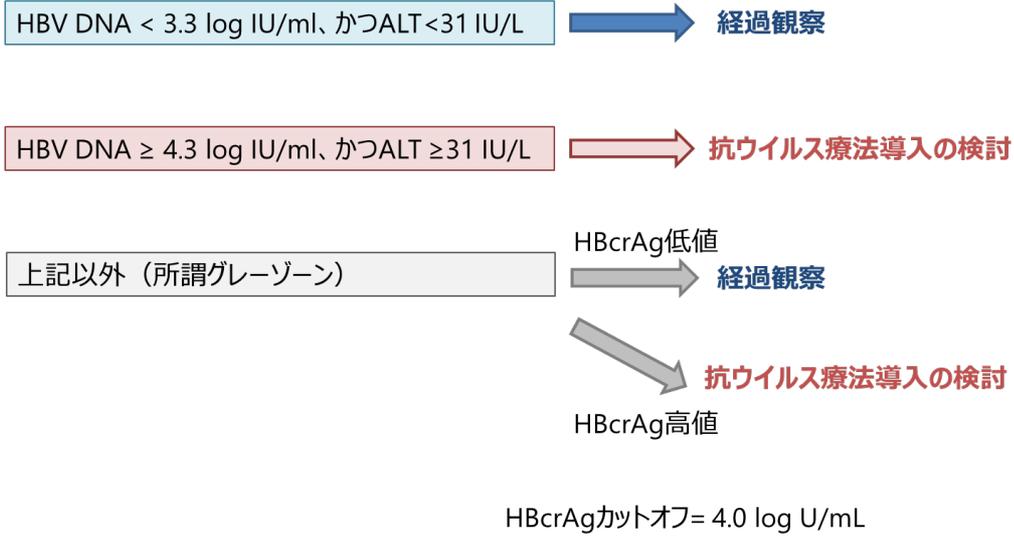


図 8

線維化予測スコアの作成

パラメータ	点数
HBsAg ≥ 50,000 IU/mL	0
HBsAg 10,000-49,999	2
HBsAg 5,000-9,999	3
HBsAg < 5,000	4
血小板数 > 20.0万	0
血小板数 15.0-19.9	1
血小板数 10.0-14.9	2
血小板数 < 10.0	4
AFP 5 ng/mL以上	2
GGTP 50 IU/L 以上	1
年齢 < 30歳	0
年齢 30-44歳	2
年齢 ≥ 45歳	3

Score range: 0-14点

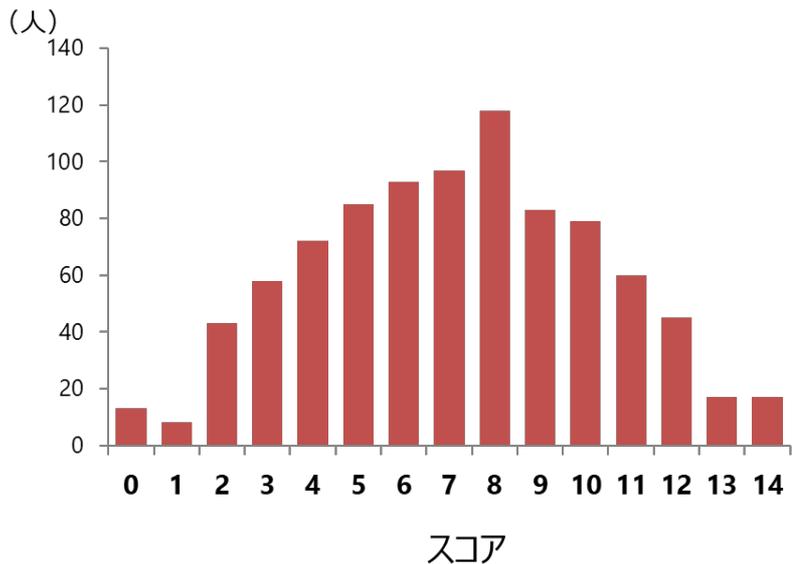


図 9

ROC曲線の比較

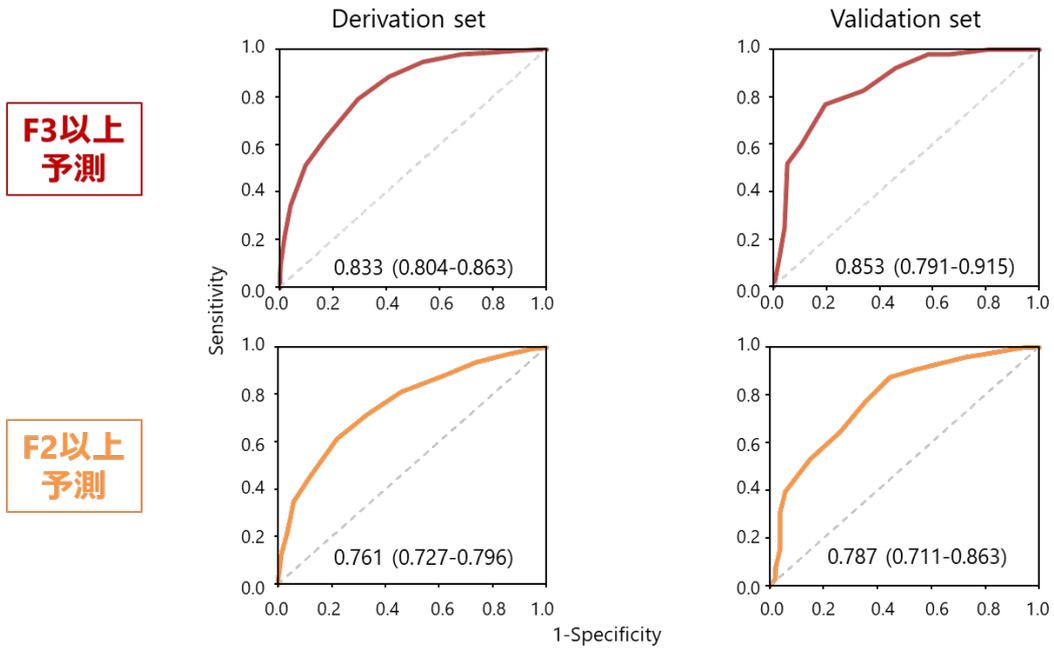
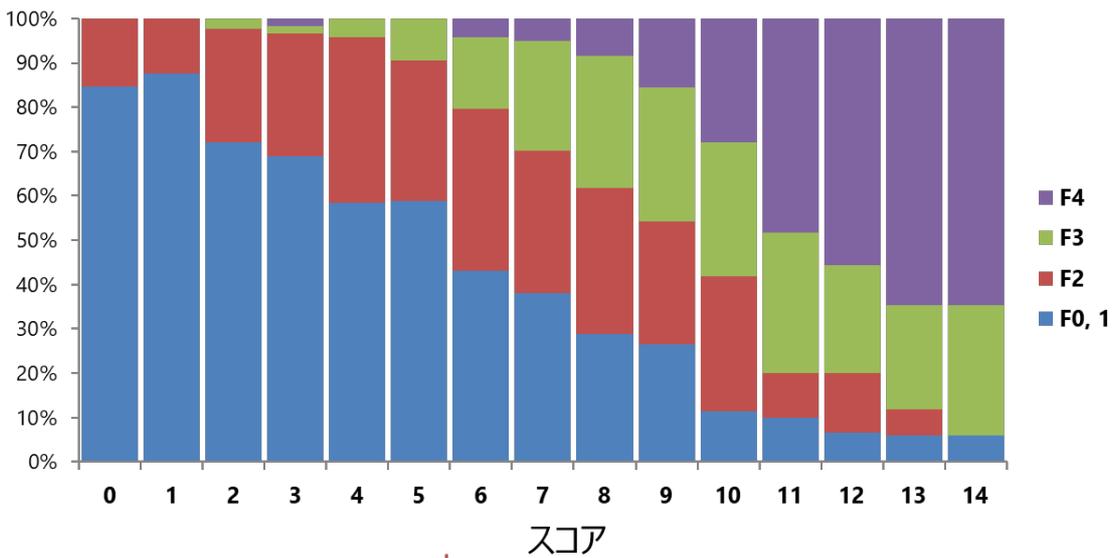


図 10

各スコア毎の線維化ステージの分布



肝線維化評価を検討 (場合によっては治療開始)