

20021393

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）

肝炎対策としての肝がんの研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

平成15年3月

主任研究者 小俣 政男

（東京大学大学院医学系研究科消化器内科 教授）

「肝炎対策としての肝がんの研究」にあたって

本研究は厚生労働科学研究費補助金による肝炎等克服緊急対策研究事業の一つを分担する研究班である。

C型肝炎が発見されてから15年が経過した。この間、日本の肝臓病の8割がこのウイルスによって惹起され、且つこのウイルス感染者が150万人とも200万人とも言われている。実際、我々東大消化器内科にも年間400名程のC型肝炎患者が入院される。

当初この研究班は、21世紀型医療開拓推進研究事業の一つとして2001年に発足した。そして現在までに明らかにした点は、

1. インターフェロンによって3割のC型慢性肝炎の患者さんからウイルスが消失する。
2. インターフェロンを投与する事によって肝癌発生は全体として1/2に減弱し、更にウイルスが駆除されれば1/5に減少する。
3. 発癌頻度は肝の線維化に伴って年0.5%以下から実に7%と顕著に増加する。つまりその線維化の程度によって発癌率が推定出来る。
4. 単に肝がんの減少が明らかにしたのみならず、心脈管系をも含めた死亡全体が減少した。
5. 炎症惹起に関連する遺伝子の多様性を解析、即ちSNP解析を行った。その結果、炎症性惹起型遺伝子の多様性が肝炎から肝癌発癌のルート解明の重要な研究課題である事が判明した。

現在節目検診を始め、本邦におけるC型肝炎患者のスクリーニングが大規模に開始されている。本邦のC型肝炎患者の特徴は感染からの時期が長く、且つ高齢者が多い。従って病気のStage (F分類) もF3、F4の集団が多く、早急なる治療対策の必要性が迫られている。

その観点からも新たな治療が開発されつつあり、本研究班は基礎並びに臨床、更には経済的側面も考慮に入れつつ、如何にウイルス駆除の効率化を図るか、そこに本研究班の目的が明確に存在すると考えられる。

平成15年3月

肝炎等克服緊急研究事業
肝炎対策としての肝がんの研究
主任研究者 小俣政男

目 次

I. 総括研究報告	1
主任研究者 小俣政男	
II. 分担研究報告	
1. 肝発癌に寄与する宿主側因子に関する研究	4
東京大学大学院医学系研究科消化器内科 吉田晴彦、加藤直也、金井文彦	
2. C型慢性肝疾患のIFN治療による生命予後改善に関する研究	6
千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学 横須賀收	
3. 血中HGF値の測定は慢性C型肝炎および肝硬変症からの肝細胞癌発生 の予測因子であるかに関する研究	8
日本大学医学部内科学講座内科3部門 荒川泰行	
4. 肝癌における細胞周期関連遺伝子のメチル化状態の検討	10
大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科 西口修平	
5. C型慢性肝疾患における酸化ストレスに関する研究	13
川崎医科大学付属川崎病院肝臓・消化器病センター 山田剛太郎	
6. C型肝炎におけるIFN治療と肝発癌、肝不全発症に関する研究	14
久留米大学医学部第二内科 佐田通夫	
7. C型慢性肝疾患に対するIFN治療の予後改善効果に関する研究	17
熊本大学医学部第三内科 藤山重俊	
8. 国立病院長崎医療センターにおけるC型慢性肝炎追跡調査症例の予後 に関する研究	19
国立病院長崎医療センター臨床研究センター 石橋大海	
9. 肝炎研究への遺伝子多型解析応用の検討	21
ヒュービットジェノミクス株式会社 村松正明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
総括研究報告書

肝炎対策としての肝がんの研究

主任研究者 小俣政男 東京大学大学院医学系研究科消化器内科 教授

研究要旨：21世紀型医療開拓推進研究事業から継続した3000名のC型慢性肝炎・肝硬変患者を対象としたコホート研究によって、C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法が肝癌死を減少させ、患者集団の生命予後を有意に改善することを示した。リバビリンとの併用療法やペグインターフェロンの導入によりインターフェロン療法の多様化と著効率の向上が見込まれる中、適応決定と治療法の選択において個々の患者の発癌リスクを評価し、テーラーメードの治療を行うことが今後ますます重要となる。このためには宿主側およびウイルス側について、病態に関与する要因を検討することが必要であり、一塩基多型(SNP)およびHCV塩基配列の解析を開始した。宿主SNPについては炎症性サイトカインであるIL-1 β プロモータ領域の多型と発癌との関連を示した。他のSNPについても病態との関連を解析中である。

分担研究者

吉田晴彦：東京大学大学院医学系研究科
消化器内科助手
加藤直也：東京大学大学院医学系研究科
消化器内科助手
金井文彦：東京大学医学部附属病院
臨床試験部助手
横須賀収：千葉大学大学院医学研究院
腫瘍内科学講師
荒川泰行：日本大学医学部第三内科教授
西口修平：大阪市立大学大学院医学研究科
肝胆膵病態内科助教授
山田剛太郎：川崎医科大学付属川崎病院
副院長
佐田通夫：久留米大学医学部第二内科教授
藤山重俊：熊本大学医学部第三内科助教授
石橋大海：国立病院長崎医療センター
臨床研究センター長
村松正明：ヒュービット・ジェノミクス（株）
所長

エロン療法によってHCVが駆除された場合に、肝硬変の解消を含む肝組織像の改善がみられることを示した。また、昨年度は21世紀型医療開拓推進研究事業として、インターフェロン療法により患者生命予後が改善することを示した。これらの検討で明らかとなったことの中で最も重要な点は、HCV感染者において肝癌のリスクは一様ではなく、線維化の進行度に基づいて、ほとんど発癌のない群から、年間7%の高発癌率を呈する群（肝硬変）まで、肝癌リスクが大きく異なることであり、これは治療戦略の検討において常に念頭に置く必要がある。

本研究の目的は、HCV感染の病態多様性について、コホート研究においてその実態を解析し、治療戦略の検討を行うとともに、その病態多様性の原因について、ウイルス側および宿主側の両面から、遺伝子レベルでの解析を含めて解明することである。最終的には、個々の患者について、生涯肝癌リスクを精密に評価し、それに応じてテーラーメード化された最適な治療を行えるようにすることを目指している。

本年度は、コホート調査を継続し、生存解析を詳細に行うとともに、あらたな視点からの検討も行なった。また、ウイルス側要因および宿主側要因の病態との関連について検討を行い、いくつかの知見を得た。

B. 研究方法

(1) コホート研究：「発癌の高危険度群を対象とした予防研究」で対象とした、肝生検施行C型慢性肝炎・肝硬変患者約3000名について、分担研究者の属する8施設において肝癌発生および生存に関する追跡調査を継続し、生命予後に関する解析をま

A. 研究目的

我が国では毎年3万人以上が肝癌のために亡くなっているが、肝癌の約8割はC型肝炎ウイルス(HCV)感染が原因である。本研究の主任研究者および分担研究者の多くは、旧厚生省「がん克服戦略研究事業発がんの高危険度群を対象とした予防研究」において、肝臓の組織学的検査を行った3000名を超えるC型慢性肝炎・肝硬変患者を対象とするコホート研究を行い、インターフェロン療法が肝癌の発生を有意に抑制すること、ならびに、インターフ

とめた。また、分担研究者横須賀・藤山・佐田・石橋らは、インターフェロン治療による肝機能の改善について検討した。

(2) 個別研究：分担研究者吉田・加藤・金井らは C 型肝炎患者 274 名および健常者 55 名から文書によるインフォームドコンセントを得た上で炎症性サイトカイン遺伝子に関する SNP 解析を行った。分担研究者西口は肝癌細胞における細胞周期関連遺伝子のメチル化について検討した。分担研究者山田は C 型慢性肝炎・肝硬変における血清および肝組織中の酸化ストレス状態について解析した。分担研究者荒川は血中 HGF 値と肝癌発生の関連について prospective に検討した。分担研究者村松は SNP 解析を効率的に行う遺伝子解析プログラムを検討した。

C. 研究結果

(1) 生命予後の改善

インターフェロン療法による生命予後については、各参加施設のデータを集積し、今年度論文化した。概要を述べると、インターフェロン非投与 459 名、投与 2430 名について平均 5.7 年の生存追跡調査を行ったところ、非投与群の本邦一般人口に対する標準化死亡比は 1.9 (95%信頼区間：1.3-2.8)、インターフェロン投与群のそれは 0.9 (信頼区間：0.7-1.1) であり、インターフェロン療法による生命予後改善が明らかとなった。また、今年度の検討により、インターフェロン療法が著効した場合に肝不全への進行がみられないことが明らかとなり、これについて今後解析を進める予定である。

本コホート研究の対象者は 1998 年までに登録されており、インターフェロン療法はすべて単独療法であった。しかし、わが国においても、2001 年末にインターフェロンとリバビリンの併用療法が保険収載され、現在、これが C 型慢性肝炎治療の主流となっている。また、近い将来にベグ化インターフェロン製剤が使用可能となる見込みであり、C 型慢性肝炎の治療法は現在転換期にあるといえる。この状況を鑑み、当研究班としても新しい治療法の成績に関しても検討を行なっていくこととなった。

(b) 個別研究

コホート研究によって、インターフェロン療法の発癌抑制、生命予後改善が実証されたわけであるが、新しい治療法の導入による選択肢の拡大もあって、治療法の選択にあたっては、個々の患者の発癌リスクの評価がますます重要となるであろう。このような視点から、肝炎の進行や発癌のメカニズムに関する基礎的検討が行われた。吉田・加藤・金井らは炎症性サイトカイン IL-1 β 遺伝子のプロモータ領域(-31)の一塩基多型 (SNP) 解析を行い、肝癌患者では非発癌患者と比べて T/T の割合が有意に高いことを示した (オッズ比 3.7)。この SNP が肝硬変の有無とは関連がないこと、およびこの領域が TATA

Box を形成することから、T/T が発癌と直接関連する可能性が示唆された。西口らは肝癌組織において細胞周期調節遺伝子のメチル化が多いこと、ならびに C 型肝炎では非 B 非 C 型肝炎と比べて非癌部におけるメチル化も多いことを示し、これら遺伝子のメチル化が C 型肝炎発癌の機序に関連している可能性を示すとともに、脱メチル化誘導薬の肝発癌に対する有効性を示唆した。山田は血中酸化ストレスマーカー ROM および肝組織中酸化的障害マーカー 8-OHdG、HNE、MDA などの測定を行い、肝線維化の進行した症例で酸化ストレスが強いことを示した。荒川は C 型肝炎・肝硬変患者の血中 HGF 値を測定し、肝発癌との関連を前向きに検討することにより、HGF 高値例は肝発癌リスクが高いことを示した。村松はヒトゲノムにおける連鎖不平衡ブロックの長さの検討を行い、SNP 解析の対象選択にあたっては候補遺伝子法が効率的であることを示し、実際に遺伝子の選定を進めた。なお、ヒトゲノムを対象とした遺伝子解析については多くの参加施設において IRB の承認が得られており、残りの施設においても申請が行なわれ審理中である。

D. 考察

本研究ではインターフェロン療法により C 型肝炎・肝硬変からの肝癌発生が抑制され、生命予後を改善することを明らかとしてきた。しかし、肝癌のリスクが患者によって大きく異なることも事実である。説明因子としての肝線維化の進行度により発癌リスクが大きく変わることは広く知られているが、同じ線維化ステージ F1 であっても、60 歳の患者と 30 歳の患者では生涯発癌リスクは大きく異なる。近年、リバピリンとの併用によりインターフェロンの著効率は向上したが、副作用も小さいとはいえず、生涯発癌リスクに応じて最適な治療を選ぶことが今後ますます重要となる。

そもそも、HCV 感染の経過が個々の患者大きく異なる原因については、ほとんど解明されていない。本研究では、炎症性サイトカイン IL-1 β のプロモータ領域の一塩基多型 (SNP) が発癌と関連している可能性が示された。いうまでもなく、他の部位の多型も病態の多様性と関連している可能性があり、それらについては現在検討中である。また、今回は成績を提示しないが、HCV の塩基配列の多型と病態多様性との間にも関連性がありそうであり、現在検討中である。本研究では今後、宿主側およびウイルス側の遺伝子レベルでの多型と病態との関連をさらに解析していく予定である。

リバピリンとの併用療法が始まり、近い将来には PEG 化インターフェロン製剤の導入も期待されるようになったことにより、HCV に対する著効率は今後向上すると思われる。それによって、インターフェロン療法による肝発癌抑制効果および生命予後改善効果は今後、さらに著しいものになるであろう。

しかしながら、ウィルスを駆除できない症例が残ることも予想され、そのような症例に対する治療を検討するうえでも、上記のような基礎研究によって発癌リスクを評価すると同時に、コホート研究を継続して予後の実態を明らかにしていく必要がある。

E. 結論

C型慢性肝炎に対するインターフェロン療法は肝癌死を減少させ、患者集団の生命予後を有意に改善した。今後、個々の患者の生涯発癌リスクを評価することにより、治療の適応を選び、インターフェロン療法をテーラーメイド化して、より効率の高い治療とすることが重要になる。このため、宿主側およびウィルス側要因について遺伝子レベルの検討を行った。

F. 健康危険情報 分担研究報告書参照

G. 研究発表 巻末に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：PCT(特許協力条約)出願中
(東京大学)
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働省科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策事業)
分担研究報告書

肝発癌に寄与する宿主側因子に関する研究

分担研究者	吉田晴彦	東京大学大学院医学系研究科消化器内科	助手
	加藤直也	東京大学大学院医学系研究科消化器内科	助手
	金井文彦	東京大学医学部附属病院臨床試験部	助手

研究要旨：C型肝炎ウイルス感染から肝臓への進展には著しい個人差があり、SNPに代表される宿主遺伝的要因が関与していると考えられる。肝病態の進展に関与すると考えられる炎症性サイトカイン遺伝子SNPにつき検討した。インフォームドコンセントが得られたC型肝炎患者274例(慢性肝炎106例、肝硬変43例、肝細胞癌125例)および健常者55例において、IL-1 β 遺伝子、TNF α 遺伝子のSNPにつきPCR、ダイレクトシーケンシングにより決定した。IL-1 β -31がT/Tである比率は、HCC患者において37%(45/122)と、非HCC患者の25%(40/158)に比し有意に高率であった。多変量解析により、IL-1 β -31 [オッズ比2.5 (T/T vs C/C)] は、年齢60才以上、肝硬変、男性、AFP陽性と共に独立した因子として肝臓に関連していた。IL-1 β -31 SNP解析により、肝発癌の超高危険群の設定が可能となる。今後は、全遺伝子領域にわたる網羅的なSNP解析が必要である。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染により、慢性肝炎、肝硬変、肝臓癌が引き起こされる。感染から肝臓癌への進展には著しい個人差がある。われわれはHCV感染の自然経過を明らかにしてきたが、感染から50年以上を経ても軽度の慢性肝炎にとどまる症例が認められる一方、20年程度で肝硬変へと進展、肝臓癌を合併する症例も認められる。このような肝病態進展速度の個人差には、single nucleotide polymorphisms (SNP)に代表される宿主遺伝的要因が寄与していると考えられる。C型肝炎では、肝臓癌は肝線維化とよく相関し、肝硬変からの肝臓癌は年7-8%にも達する。また肝線維化の進展は肝の炎症の程度に大きく影響される。実際、肝炎患者血中では、炎症に関わる様々なサイトカインが上昇し、その濃度にも著しい個人差が認められる。また、われわれは肝炎ウイルス蛋白が、NF- κ BやAP-1などの転写因子の活性化を介し、interleukin-8など炎症に関わるサイトカイン、あるいはTGF- β など肝線維化に関わるサイトカインを直接的にupregulateすることを報告してきた。炎症・線維化に関わるサイトカインの発現調節に関わる遺伝子多型(SNP)がサイトカイン発現の個人差に影響し、ひいては炎症・線維化を規定する可能性がある。本研究では、肝病態進展、特に肝臓癌リスクの個人差を解明する目的で、宿主側因子、特に炎症・線維化に関わるサイトカイン遺伝子の調節領域に存在するSNPにつき検討した。

B. 研究方法

本研究は、文部科学省、厚生労働省、経済産業省の定めたヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し行った。また、「肝臓病における炎症・線維化・発癌に関与する遺伝子の探索に関する研究」として、平成13年8月に東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を得た。

インフォームドコンセントが得られたC型肝炎患者274例(慢性肝炎106例、肝硬変43例、肝細胞癌125例)および健常者55例において、IL-1 β 遺伝子(-31, -511)、TNF α 遺伝子(-1031, -863, -857, -376, -308, -238)のSNPにつきPCR、ダイレクトシーケンシングにより決定し、臨床病態との関連につき検討した。

C. 研究結果

IL-1 β -31がT/Tである比率は、HCC患者において37%(45/125)と、非HCC患者の25%(40/149)に比し有意に高率であった。また、IL-1 β -31と-511にはほぼ完全なリンケージが認められた。TNF α 遺伝子のSNPは臨床病態との関連を認めなかった。多変量解析により、IL-1 β -31 [オッズ比3.7 (T/T vs C/C)]、年齢60才以上 [オッズ比3.3 (60才以上 vs 60才未満)]、肝硬変 [オッズ比4.0 (肝硬変あり vs なし)]、男性 [オッズ比3.9 (男性 vs 女性)]、AFP陽性 [オッズ比4.1 (AFP 20 μ g/L以上 vs 未満)]の5つが

独立した因子として肝癌に関連していた。

D. 考察

IL-1 β -31 の SNP は、C 型肝炎における肝発癌に密接に関連していた。非担癌患者では、肝硬変の有無で IL-1 β -31 SNP の頻度は変わらないことから、IL-1 β -31 の SNP は肝硬変の有無とは関連していないと考えられる。IL-1 β -31 が T となることにより、TATA box を生ずるため、IL-1 β の産生が亢進し、炎症が惹起され、結果的により高度の肝細胞障害を来し、肝発癌に関与する可能性がある。

E. 結論

IL-1 β -31 の SNP は C 型肝炎における肝発癌と密接に関連していた。これら SNP 解析により、肝発癌の超高危険群の設定が可能となる。今後は、全遺伝子領域にわたる網羅的な SNP 解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大塚基之、加藤直也、吉田英雄、小俣政男：C 型肝炎ウイルス感染と細胞内シグナル伝達分子。Pharma Medica 2002;20:33-42.
- 2) 加藤直也、吉田英雄、小俣政男：C 型肝炎ウイルス蛋白と NF- κ B 経路の活性化。肝胆膵 2003; 46: 67-74
- 3) 大塚基之、加藤直也、吉田英雄、吉田晴彦、白鳥康史、小俣政男：HCV と発癌。ウイルス 2002; 52: 295-300
- 4) Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, Carrilho FJ, Omata M. Novel nucleoside analogue MCC-478 (LY582563) is effective against wild-type or lamivudine-resistant hepatitis B virus. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2602-2605.
- 5) Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS5A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. Oncogene 2002; 21: 4801-4811.
- 6) Kato J, Kato N, Moriyama M, Goto T, Taniguchi H, Shiratori Y, Omata M. Interferons specifically suppress the translation from the internal ribosome entry site of hepatitis C virus through a double-stranded RNA-activated protein kinase-independent pathway. J Infect Dis 2002; 186: 155-163.
- 7) Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Shao R,

Wang Y, Shiina S, Omata M. Weak association of SEN-Virus viremia with liver disease. J Clin Microbiol 2002; 40: 3140-3145.

- 8) Hoshida Y, Moriyama M, Otsuka M, Kato N, Goto T, Taniguchi H, Shiratori Y, Seki N, Omata M. Identification of Genes Associated with Sensitivity to 5-fluorouracil and Cisplatin in Hepatoma Cells. J Gastroenterol 2002; 37: 92-95.
- 9) Hoshida Y, Moriyama M, Otsuka M, Nishimura S, Kato N, Shiratori Y, Omata M. Relevance network between transcriptome and chemosensitivity in hepatoma cells. Currents in Computational Molecular Biology 2002; 212-213.
- 10) Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Yoshida H, Taniguchi H, Goto T, Moriyama M, Otsuka M, Shiina S, Shiratori Y, Ito Y, Omata M. Interleukin-1 β gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus infection. Hepatology 2003; 37: 65-71.
- 11) Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. Signals Induced by HCV proteins. In: Okita K ed. Hepatitis C Virus/Oxidative Stress and Liver Disease. Springer-Verlag Tokyo. 2003: 32-47.
- 12) Otsuka M, Aizaki H, Kato N, Suzuki N, Miyamura T, Omata M, Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. Biophys Biochem Res Commun 2003; 300: 443-447.
- 13) Goto T, Kato N, Yoshida H, Otsuka M, Moriyama M, Shiratori Y, Koike K, Matsumura M, Omata M. Hepatitis B virus HBx and the large hepatitis Delta antigen synergistically activate the SRE-dependent pathway. J Infect Dis 2003 187: 820-828.
- 14) Moriyama M, Hoshida Y, Otsuka M, Nishimura S, Kato N, Goto T, Taniguchi H, Shiratori Y, Seki N, Omata M. Relevance network between chemosensitivity and transcriptome in human hepatoma cells. Mol Cancer Ther 2003; 2: 199-205.
- 15) Kanda T, Yokosuka O, Kato N, et al. Hepatitis A virus VP3 may activate serum response element (SRE) associated transcription. Scand J Gastroenterol (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得：PCT(特許協力条約)出願中
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型慢性肝疾患のIFN治療による生命予後改善に関する研究

分担研究者 横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学 講師

研究要旨：肝生検によりC型慢性肝疾患と診断された459例を対象とし、生死に関する疫学調査を行なった。平均観察期間は 8.2 ± 2.9 年で、死亡は非投与群104例のうち15例（14%）、IFN投与群355例のうち33例（9%）で著効116例中4例（3%）、非著効239例中29例（12%）であった。肝臓病関連死は32例（67%）で、肝癌死は25例（52%）と最も多かった。Cox比例ハザードモデルによる検討では、IFN非投与例に比べ投与例の全死亡に対する危険率は0.529（95%CI 0.267-1.048）、肝臓病関連死に対する危険率は0.219（0.068-0.710）で、著効例ではそれぞれの危険率は0.219（0.068-0.710）、0.030（0.003-0.266）であった。また、IFN投与群と非投与群の全死亡に対する標準化死亡率比（SMR）は1.4と2.0、肝臓病関連死に対するSMRはそれぞれ7.9と19.7であった。IFN治療は肝臓病関連死を減少させることによりC型慢性肝炎患者の生命予後を改善することが示された。

A. 研究目的

本邦における肝細胞癌による死者は年間3万人におよぶ。その90%はウイルス性肝炎によるものであり、特にC型肝炎ウイルス感染に伴うものが約70%を占めている。C型慢性肝疾患に対するインターフェロン（IFN）治療が、長期生命予後を改善するかどうかを臨床疫学的に検討した。

B. 研究方法

1986年から1998年に当科で肝生検によりC型慢性肝疾患と診断された459例を対象とした。IFN投与群（著効、非著効）と非投与群に分け、生死、死因の調査を行ない、性別、年齢、肝組織、IFN治療、治療効果、肝生検時のGOT、GPT、ALB、PLT値、ウイルス量、セロタイプ、アルコール、感染期間、BMI、合併症についてCox比例ハザードモデルを用いて統計学的に有意な因子を解析した。また、性別、年齢をマッチさせた一般集団の死亡率と比べる標準化死亡率比を算定した。

C. 研究結果

IFN投与群は355例（男228例、女127例、平均年齢 49 ± 12 歳）で著効116例、非著効239例であった。非投与群は104例（男52例、女52例、平均年齢 53 ± 11 歳）で全体の平均観察期間は 8.2 ± 2.9 年であった。死亡はIFN投与群では33例（著効4例、非著効29例）に見られ、死因は肝癌が14例（43%）、肝不全4例、静脈瘤破裂1例、その他の癌4例、脳血管障害4例、その他6例であった。一方、IFN非投与群の死亡は15例で、死因は肝癌が11例（72%）、肝不全1例、その他の癌1例、脳血管障害1例、その他1例であった。肝臓病関連死

が32例（67%）で、肝癌死が25例（52%）と最も多く認められた。

全死亡に寄与する統計学的に有意な因子の危険率は、年齢（50歳以上）が3.961（95%CI 0.355-11.582）、男性が2.666（1.290-5.511）、肝組織F3が4.116（1.400-12.106）、F4が7.210（2.576-20.177）、IFN著効が0.219（0.068-0.710）であった。IFN投与は危険率0.529（0.267-1.048）であった。

肝臓病関連死に寄与する統計学的に有意な因子の危険率は、肝組織F2が8.603（1.586-46.654）、F3が13.348（2.445-72.874）、F4が18.751（3.388-103.791）、GOT ≥ 80 が10.640（2.464-45.948）、アルコール ≥ 20 g/日が2.688（1.163-6.211）、IFN投与が0.207（0.087-0.492）、IFN著効が0.030（0.003-0.266）、IFN非著効が0.254（0.107-0.600）であった。

非肝臓病関連死に寄与する統計学的に有意な因子の危険率は男性が6.108（0.362-27.383）、肝組織F4が4.845（1.252-18.751）で、IFN投与は関連が認められなかった。

標準化死亡率比（SMR）を算定すると、対象症例の全死因では1.6、肝臓病関連死が10.4、非肝臓病関連死が0.6であった。疾患別では肝癌12.6、慢性肝疾患5.9、肝癌以外の癌0.4でこれらは統計学的に有意であった。IFN治療との関連で見ると、全死亡に対するSMRは非投与群では2.0、投与群では1.4で著効例は0.6、非著効例は1.8であった。肝臓病関連死に対するSMRは非投与群では19.7、投与群では7.9、著効例では1.3、非著効例は11.0であった。非肝臓病関連死に対するSMRは非投与群が0.3、投与群が0.7、著効例が0.5、非著効例が0.8と低値であった。

D. 考察

IFN治療は肝臓病関連死を減少させることに

より、C型慢性肝炎患者の生命予後を改善し、特に著効となった症例の生命予後は極めて良好であった。肝臓病関連死は全死亡 48 例のうち 32 例 (67%) を占め、特に肝癌による死亡が 25 例 (52%) と多いことから、肝発癌を抑えることが生命予後を改善することにつながると考えられた。

E. 結論

I FNを含めた包括的治療は、C型慢性肝疾患患者の肝発癌を抑え、肝臓病関連死を減少させることにより生命予後を改善すると考えられた。今後、より有効な I FN併用療法や抗ウイルス剤の開発により、C型慢性肝疾患患者の予後がさらに改善する事が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology*. 2003; 37(1): 19-26.
- 2) Kawai S, Yokosuka O, Imazeki F, Saisho H, Mizuno C. Evaluation of the clinical usefulness of COBAS AMPLICOR HCV MONITOR assay (ver2.0): Comparison with AMPLICOR HCV MONITOR assay (ver1.0) and HCV core protein level. *J Med Virol*. 2002; 68(3): 343-51.
- 3) Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Saisho H, Saotome N, Suzuki K, Okita K, Kiyosawa K, Omata M. Association between severity of type A hepatitis and nucleotide variations in the 5' non-translated region of hepatitis A virus RNA: strains from fulminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions. *Gut*. 2002; 51(1): 82-8.
- 4) Kato A, Miyazaki M, Ambiru S, Yoshitomi H, Ito H, Nakagawa K, Shimizu H, Yokosuka O, Nakajima N. Multidrug resistance gene (MDR-1) expression as a useful prognostic factor in patients with human hepatocellular carcinoma after surgical resection. *J Surg Oncol*. 2001; 78(2): 110-5.
- 5) Ikeuchi T, Yokosuka O, Kanda T, Imazeki F, Seta T, Saisho H. Roles of TT virus infection in various types of chronic hepatitis. *Intervirology*. 2001; 44(4):219-23.
- 6) Fujiwara K, Yokosuka O, Fukai K, Imazeki F, Saisho H, Omata M. Analysis of full-length hepatitis A virus genome in sera from patients with fulminant and self-limited acute type A hepatitis. *J Hepatol*. 2001; 35(1):112-9.
- 7) Kawai S, Yokosuka O, Imazeki F, Maru Y, Saisho H. State of HBV DNA in HBsAg-negative, anti-HCV-

positive hepatocellular carcinoma: existence of HBV DNA possibly as nonintegrated form with analysis by Alu-HBV DNA PCR and conventional HBV PCR. *J Med Virol*. 2001; 64(4):410-8.

2. 学会発表

C型慢性肝疾患 I FN治療症例の長期生命予後
第 8 8 回日本消化器病学会総会 (旭川)
パネルディスカッション (3)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書

血中 HGF 値の測定は慢性 C 型肝炎および肝硬変症からの肝細胞癌発生の予測
因子であるかに関する研究

分担研究者 荒川泰行 日本大学医学部内科学講座内科 3 部門 教授

研究要旨：我々は、C型慢性肝炎(CH)および肝硬変(LC)例について、血中 HGF 値を測定し、測定時より prospective study を行い、肝細胞癌(HCC)発生の早期診断のマーカーとして HGF 測定の有用性について検討した。研究方法は、1994 年から 1995 年度に日本大学板橋病院を受診した、血中 HCV RNA 陽性の CH;64 例,LC;23 例,HCC;26 例である。血中 HGF 値の測定は大塚アッセイ研究所製 EIA kit を用いて測定し、prospective に 2001 年一月まで経過を観察した。この結果では、血中 HGF 値は、HCC 例が CH および LC 例に比較して有意に高値を呈した。血中 HGF 値が 0.6 以上の高値例は全例が HCC 例であり、診断的価値が高いことが示唆された。また癌巣の占拠部位が広範囲になるにつれて、血中 HGF 値も有意に高値を呈した。次に CH および LC 例の HGF 値を 0.3 以下(low 群)と 0.31 以上(high 群)に分けて、prospective に累積発癌率を比較すると、low 群に比較して有意に high 群に HCC 発生例が多く認められ、HCC 発生の危険因子の多変量解析の検討でも、HGF high 例は有意に HCC 発生の risk factor であった。以上より、血中 HGF 値の測定は、C 型 CH および LC 例の HCC 発生予測および肝癌の早期診断に有用である。

A. 研究目的

ヒト肝細胞増殖因子(HGF)は、C 型肝炎硬変症合併肝細胞癌(HCC)例において、血中濃度が高値を呈することが報告されている。しかしながら長期間凍結保存された血清中の HGF は、serine protease にて活性化され高値を呈し正確な数値を反映しない。我々は、C 型肝炎慢性疾患例について採血後 48 時間以内に血中 HGF 値を測定し、測定時より prospective study を行い、HCC 発生の早期診断のマーカーとして HGF 測定の有用性について検討した。

B. 研究方法

1994 年から 1995 年度に日本大学板橋病院を受診した、血中 HCV RNA 陽性の CH;64 例,LC;23 例,HCC;26 例である。血中 HGF 値の測定は、採血後一旦凍結した後、48 時間以内に大塚アッセイ研究所製 EIA kit を用いて測定した。肝内 HGF の局在については、酵素抗体法にて光顕および電顕にて検索した。

C. 研究結果

慢性 C 型肝炎例 20 検体について採血した血液を、serine protease inhibitor 処理試験管と通常の試験管に分けて HGF 値を測定した。この結果では両者間に良好な相関関係が認められ、48 時間以内に測定するならば serine protease による影響は無視できることが示唆された。①血中 HGF 値は、HCC 例(0.62ng/ml)が CH(0.32)および LC 例(0.33)に比して有意に高値を呈した。特に CH 例では検出感度以下(0.3ng/ml)が 92%,LC 例では 85%に対して、HCC 例では見られなかった。②肝疾患の F stage の指標として血小板数を用いた。血中 HGF 値は、0.3(ng/ml)を基準値とすると、0.3 以上の割合は、血小板数が 20 万以上;10%, 10~20 万未満;35%,10 万未満;75%であり、明らかに血小板の少ない群において HGF 値は高値を呈した。③0.6 以上の高値例は全例が HCC 例であり、診断的価値が高いことが示唆された。④HCC

例における HGF 値と AFP および PIVKA-II 値には明かな関連性は見られなかった。⑤癌巣の占拠部位が広範囲になるにつれて、血中 HGF 値も有意に高値を呈した。⑥肝細胞の細胞質内の ER および細胞膜に HGF の局在を認めた。⑦HGF 値の測定が HCC 発生予測に有用かについて検討した。CH および LC 例の HGF 値を 0.3 以下(low 群)と 0.31 以上(high 群)に分けて、prospective に測定日からの累積発癌率を比較すると、low 群に比較して有意に high 群に HCC 発生例が多く認められた。HCC 発生の危険因子の多変量解析の検討では、HGF high 例は有意に HCC 発生の risk factor であった。

D. 考察

血中 HGF 値は HCC 例においてその 95%が 0.31ng/ml 以上の高値を呈したのに対して、非 HCC 例は検出感度未満の例が多く HCC 例と明らかな差異が認められた。さらに HGF 値が 0.6ng/ml 以上の例は全例が HCC 例であり HGF 値の測定は診断的価値が高いことが示唆された。一方血中 HGF 値と腫瘍マーカーとの関係では、AFP 値あるいは PIVKA-II 値が正常範囲内であっても、HGF 値が 0.6ng/ml 以上の例は全例が HCC 例であった。さらに非 HCC 例のうち初回測定時の HGF 値が 0.31ng/ml 以上の例は累積発癌率の比較より 0.3ng/ml 以下の例に比較して、HCC 発生の高危険度群であることが示唆された。したがって CH および LC 例のうち、血中 HGF 値が 0.3ng/ml 以上を呈する例は高癌化状態にあることを意味していると推定された。また多変量解析からも HGF 0.3ng/ml 以上の高値例が HCC 発生の risk factor であることから、HGF 測定が高癌化状態にある肝臓発生の高危険度群の囲い込みに有効であることが示唆された。実際に初回測定時の HGF 値が 0.3ng/ml 以下でありながら、その後 HCC を発生した例は、経過観察中に HGF 値は 0.4ng/ml 以上に上昇しその後 HCC が発見されている。以上より HGF 値の継続的な測定は臨床的に意義があると考えられる。

E. 結論

血中 HGF 値の測定は、C 型 CH および LC 例の HCC 発生予測および肝臓の早期診断に有用である。

F. 健康危険情報

HGF 値の測定に関しては何ら問題点は認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamagami H, Moriyama M, Matsumura H, Aoki H, Shimizu T, Saitou T, Kaneko M, Shioda A, Tanaka N, Arakawa Y. Serum concentration of human hepatocyte growth factor is a useful indicator for predicting the occurrence of hepatocellular carcinomas in C-viral chronic liver diseases. *Cancer*; 95: pp.824-834, 2002.8.

2. 学会発表

Yamagami H, Moriyama M, Kaneko M, Shioda A, Tanaka N, Arakawa Y: The measurement of human hepatocytes growth factor in the blood is useful for predicting the occurrence of hepatocellular carcinoma. 50th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Dalas, TX, USA, November, 2001.

B. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし
2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝癌における細胞周期関連遺伝子のメチル化状態の検討

分担研究者 西口修平 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科 助教授

研究要旨：今年度の研究では、肝細胞癌、慢性肝炎組織における細胞周期調節遺伝子のメチレーションに伴う発現異常を解析した。また培養肝細胞を用いて 5-aza-2'-deoxy-cytidine による脱メチルを誘導し細胞周期に及ぼす影響を検討した。その結果 p16, p15, 14-3-3σ の遺伝子は慢性肝炎組織においてメチル化が起り発現低下を認めた。肝癌ではより複数の遺伝子がメチル化しており、細胞周期関連遺伝子のメチレーションが発癌に関与していることが示唆された。p16 のメチレーションは肝炎ウイルス感染の有無によって影響をうけることが示唆された。特に、非 B 非 C 型肝癌の非癌部では p16 のメチル化が存在しないのに対し、C 型の肝癌では、非癌部にも高率にメチル化を認めた。肝組織のメチル化の程度が発癌ポテンシャルの指標になる可能性が示唆された。次に、肝癌培養細胞による 5-aza-cytidine 投与実験では、脱メチル化により細胞周期が G2/M にて停止した。これらの結果は、メチレーションによるエピジェネティック変化が肝発癌過程に重要な役割を担うことを示唆し、発癌コントロールに脱メチル化誘導薬が有効である可能性が示唆された。

研究協力者

田守昭博 大阪市立大学肝胆膵病態内科学 助手
武田 正 同 講師

A. 研究目的

近年、発癌とメチレーションによる遺伝子の発現異常の関係が注目されている。本来メチレーションは外来因子に対する防御機構のひとつとして獲得された能力とする説もあるが、遺伝子刷り込みや老化等広く遺伝子発現の調節に関与していること明らかとなってきた。肝癌においては p16 のメチル化による発現低下を高率に認めることが報告され、さらにウイルス性肝炎では発癌する以前にすでにメチル化がおこっていることも示唆されている。

今年度の研究では、肝炎ウイルス感染とメチル化に注目し外科切除サンプルを用いて、複数の遺伝子でのメチレーションの有無と発現量の変化を解析し、非癌部組織を含めてウイルス感染の有無でグループ分けし臨床背景とメチレーションとの関係を評価した。

本研究の目的は、肝癌および慢性肝炎において細胞周期調節遺伝子の発現異常とそのプロモーター領域 CpG のメチル化の有無を明らかとし、肝発癌におけるエピジェネティック変化の役割を臨床背景と比較検討するものである。また脱メチル化の癌治療への可能性を探るため培養肝癌細胞において基礎的解析を行った。

B. 研究方法

I. 臨床研究

対象は肝細胞癌切除例 40 症例とコントロールとして大腸癌肝転移 1 例、肝内結石切除 1 例である。肝癌症例の内訳は B 型肝癌(HBs 抗原陽性)8 例、C 型肝癌(HCV 抗体陽性)20 例、非 B 非 C 型肝癌 (HBs 抗原陰性かつ HCV 抗体陰性) 12 例である。各症例において癌部および非癌部から DNA および RNA を抽出した。今回検討した細胞周期関連遺伝子は p16, p15, 14-3-3σ であり、そのプロモーター領域における CpG のメチル化の有無について、特異的プライマーをデザインし Methylation specific PCR 法にて解析した。RNA の発現は半定量 PCR 法にて解析した。

II. 基礎検討

Huh-7, HepG2 を用いて培養液中に 5-aza-2'-deoxy-cytidine を添加し 2 日培養し、FACS にて細胞周期の変化を対照群と比較した。また脱メチル化による遺伝子発現の有無は DNA chip にて解析した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を取り扱いには、ヘルシンキ宣言と大阪市立大学医学部倫理規定を遵守した。

C. 研究結果

I. 臨床研究

非 B 非 C 型では、p16, p15, 14-3-3σ のメチル化を、癌部でそれぞれ 6/12 例 (50%)、4/12 例 (33%)、8/12 例 (68%)、非癌部でそれぞれ 0/12 例 (0%)、5/12 例 (42%)、6/12 例 (50%) 認めた。B 型あるいは C 型肝癌では、p16, p15, 14-3-3σ のメチル化を、癌部でそれぞれ 18/28 例 (64%)、11/28 例 (39%)、27/28 例 (96%)、非癌部でそれぞれ 7/28 例 (25%)、

8/28 例 (29%)、26/28 例 (93%) 認めた。原因ウイルスとメチル化の関係は、非 B 非 C 型では非癌部にメチル化を認めないが、B 型では 12.5%、C 型では 30% に陽性であった。癌部では、非 B 非 C 型、B 型、C 型のメチル化率は、50%、37.5%、75% であった(図 1)。

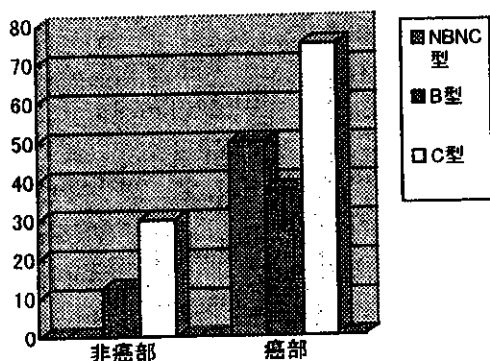


図 1 原因ウイルスと p16 のメチル化との関係

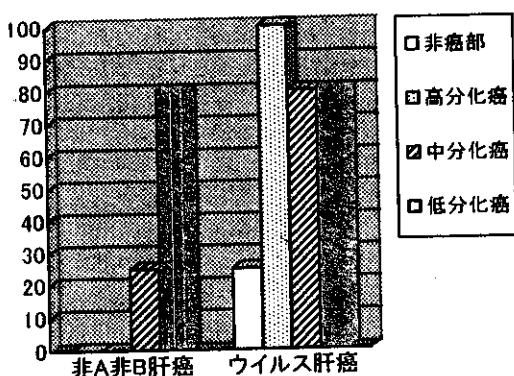


図 2 腫瘍の分化度と p16 のメチル化の関係

メチル化を認めた遺伝子の平均個数は、非癌部では 1.30 個、癌部では 1.85 個であった。また、すべての遺伝子にメチル化を認めなかった症例が、非癌部では 5 症例あったのに対し、癌部では必ず 1 個以上の遺伝子にメチル化を認めた。なおコントロール組織ではメチル化は検出されなかった。メチル化の程度は、非ウイルス性肝癌では、分化度が低くなるにつれ増加したが、ウイルス性肝癌では、非癌部病変にすでにメチル化が存在し、高分化度に関わらず高いメチル化率を認めた(図 2)。

II. 基礎研究

肝癌培養細胞株 Huh-7 は 5-aza-2'-deoxycytidine 添加により細胞周期は G2/M にて停止することが明らかとなった。

D. 考察

癌組織でのメチレーションの状態は臓器によって特徴があり、その結果癌臓器によって特異的な遺伝子の発現異常パターンを呈することが推測される。今年度の研究により細胞周期調節に関与する遺伝子 3 個について肝癌でのメチレーションパターンを明らかにした。これまでに B 型肝炎特異的にメチル化される GSTP 1 遺伝子が報告されているが、p16, p15, 14-3-3σ 遺伝子のメチル化には B 型、C 型肝炎に差異を認めなかった。一方、p16 は非ウイルス性肝癌ではメチル化の頻度も低く発癌して始めてメチル化されるのに対してウイルス性肝疾患では発癌前の組織の一部にメチル化を認めた。この結果はウイルス肝炎からの発癌が高率であり再発が多いことにメチル化が関与していることを示唆している。大腸癌では脱メチル化処理を利用した広範囲な遺伝子のメチル化検索が報告されており、同定された遺伝子群について今後、肝硬変においてメチル化の有無をスクリーニングすることは発癌危険群の設定に重要と考える。

今回の培養細胞実験結果から、脱メチル化が細胞周期の停止を誘導することが明らかとなった。将来、治療としてメチル化をターゲットとした創薬の可能性もあり肝癌制御の新たな手法として期待できる。

E. 結論

細胞周期調節遺伝子は肝疾患の病因により種々の頻度でメチル化され、発癌するとその頻度が増加した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) S. Nishiguchi, M. Enomoto, S. Shiomi, N. Obata, M. Tanaka, K. Fukuda, A. Tamori, D. Habu, T. Takeda, T. Tanaka, Y. Yano, S. Otani. GB virus C and TT virus infections in Japanese patients with autoimmune hepatitis. *J. MED. VIR.* 2002; 66: 258-262.

2) M. Enomoto, S. Nishiguchi, S. Shiomi, M. Tanaka, T. Yokogawa, K. Fukuda, T. Ueda, A. Tamori, D. Habu, T. Takeda, Y. Yano, S. Otani. Changes in serum levels of hepatitis C virus genotype 1b monitored by real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of long term response to interferon-alpha treatment. *AM. J. GASTROENTEROL.* 2002; 97: 420-426.

3) S. Nishiguchi, S. Shiomi, H. Kurooka, Y. Iwata, N. Sasaki, A. Tamori, D. Habu, T. Takeda, J. Kawabe, H. Ochi. Randomized trial assessing gastric emptying in patients with chronic hepatitis C during interferon-α or -β therapy and effect of cisapride. *DIG. DIS. SCI.* 2002;

47: 73-78.

4)S. Kubo, S. Nishiguchi, K. Hirohashi, H. Tanaka, T. Shuto, H. Kinoshita. Randomized clinical trial of long-term outcome after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma by postoperative interferon therapy. BR. J. SURGERY. 2002; 89: 418-422.

5)S. Kubo-S, K. Hirohashi, O. Yamazaki, M. Matsuyama, H. Tanaka, K. Horii, T. Shuto, T. Yamamoto, S. Kawai, K. Wakasa, S. Nishiguchi, H. Kinoshita. Effect of the presence of hepatitis B e antigen on prognosis after liver resection for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B. WORLD J. SURGERY. 2002; 26: 555-560.

6)M. Enomoto, S. Nishiguchi. SEN viruses and treatment response in chronic hepatitis C virus. LANCET. 2002; 359: 1780-1781.

7)S. Nishiguchi, M. Enomoto, M. Tanaka, K. Fukuda, A. Tamori, D. Habu, T. Takeda, S. Shiomi, T. Tanaka, Y. Yano, S. Otani. Accurate prediction of response to interferon therapy by repeated measurement of hepatitis C virus core protein in patients with chronic hepatitis C. INTERVIROLOGY. 2002; 45: 105-110.

2. 学会発表

成松 孝、田守昭博、西口修平。C型慢性肝炎における肝ミトコンドリア DNA 変異に対する IFN の抑制効果。第 61 回日本癌学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型慢性肝疾患における酸化ストレスに関する研究

分担研究者 山田剛太郎 川崎医科大学附属川崎病院肝臓・消化器病センター
センター長、副院長

研究要旨：C型慢性肝疾患における血清および肝組織中の酸化ストレスを検討し、病期の進行および肝発癌にその関与が示唆された。

A. 研究目的

C型慢性肝炎における、酸化ストレスの関与が示唆されている。今回、我々は慢性肝疾患における血清および肝組織中の酸化ストレスの有無につき検討した。

B. 研究方法

1)C型慢性肝疾患に対して、酸化ストレスマーカーの血中ROMの測定を行い、健常人と比較を行った。2)肝組織中の酸化ストレスの検討には、C型慢性肝疾患18例(F1:6例、F2:2例、F3:4例、F4:6例)についてoxidative DNA damage markerである8-OHdG、oxidative stress markerであるHNE、MDA、antioxidative stress markerであるTRXの免疫組織学的検討を行った。また、うち13例にインターフェロン(IFN)を投与し、IFN効果および発癌の有無につき、免疫染色の程度と比較検討した。3)C型慢性肝疾患10例中、発癌を認めた5例と発癌を認めなかった5例に対して、8-OHdG、HNE、MDA、TRXの発現について検討を行った。

C. 研究結果

1)血中ROMはC型慢性肝疾患 314 ± 47 、健常人 249 ± 47 とC型慢性肝疾患例が有意に高値であった。2)C型慢性肝疾患に対する、8-OHdG、HNE、MDA、TRXの免疫組織学的検討では、stageの進行とともにいずれも発現の増強を認めた。3)8-OHdGの発現は発癌例と非発癌例いずれも肝細胞の核に認めた。HNE、MDA、TRXは癌部により強く発現を認めたが、非癌部にも発現していた。

D. 結論

C型慢性肝疾患の進行および肝発癌に酸化ストレスの関与が示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Mahmood S, Niiyama G, Kawanaka M, Nakata K, Sho M, Yasuhara Y, Ito T, Yamada G. Long term follow-up of a group of chronic hepatitis C patients treated with anti-inflammatory drugs following initial interferon therapy. Hepatology Research 2002;224:213-219.

2. 学会発表

1)AASLD 2001,Dallas, TX

2)第39回日本肝臓学会総会 2003,福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得：なし

2.実用新案登録：なし

3.その他：なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型肝炎におけるIFN治療と肝発癌、肝不全発症に関する研究

分担研究者 佐田通夫 久留米大学医学部第二内科 教授

研究要旨：当施設で経過観察中のC型慢性肝炎患者例634例を対象に、肝発癌、肝不全発症例の検討を行った。634例中、IFN治療を行ったのは359例で、うち116例がIFN治療後も持続的なウイルス駆除が得られた例（CR）であり、残り243例がウイルス駆除が得られなかった（NR）。CR例からの発癌は、4例（3.5%）であり、NR例からの発癌は、30例（12.3%）でCR例に比し、約4倍の発癌率であった。Kaplan-Meier法で累積発癌率を検討すると、CR例では有意に発癌率が低かった（ $P<0.05$ ）。CR例からの発癌4例中2例は、肝癌の再発を認めていない。IFN未治療の183例からは、26例（14.2%）発癌し、NR例とほぼ同等であった。これらより、IFN治療によりウイルス駆除が得られた例では有意に発癌の危険率が低下すると考えられた。肝不全に移行した例は、CR例からは0例（0%）、NR例からは、4例（1.6%）、IFN未治療例からは、3例（1.6%）であった。肝不全に移行した7例中の6例は肝癌を合併していた。

研究協力者

井出達也	久留米大学医学部第二内科	助手
田中一雄	同	助手

た。肝不全への移行は、CR例から0例（0%）、NR例から4例（1.6%）、IFN未治療例から3例（1.6%）であった。肝不全に移行した7例中の6例は肝癌を合併していた。よって肝不全のみによる死亡例は1例のみであった。

A. 研究目的

C型慢性肝炎患者にIFN治療を行うと、約1/3の症例で、ウイルスの駆除（持続消失）が得られる。ウイルス駆除が得られた症例では、肝発癌や肝不全の危険度が低下するか否かを検討する。昨年度からさらに1年経過したので、全例追跡調査を行い解析した。

B. 研究方法

C型慢性肝炎患者例634例を対象とした。634例中、IFN治療を行ったのは359例で、うち116例がIFN治療後も持続的なウイルス駆除が得られた例（CR）であり、残り243例がウイルス駆除が得られなかった（NR）。IFN治療を行わなかった例は183例であった。CRとは、IFN治療後6ヶ月以後も持続的にHCV RNAが陰性化している例とし、それ以外をNRとした。

C. 研究結果

CR例の観察期間は、 6.4 ± 2.9 年であり、NR例のそれは 7.2 ± 3.1 年であり、NR例の方が観察期間が長かった。またCR例は、NR例に比し、有意にHCV RNA量が少なく、serotype 1の占める割合が少なかった。CR例からの発癌は、4例（3.5%）であり、NR例からの発癌は、30例（12.3%）であり、Kaplan-Meier法で累積発癌率を検討すると、CR例では有意に発癌率が低かった（ $P<0.05$ ）。CR例から発癌した4例中2例は、最終観察の時点では肝癌の再発を認めていない。IFN未治療の183例からは、26例（14.2%）が発癌し、NR例とほぼ同等であっ

D. 考察

肝発癌に関しては、ウイルス駆除例では有意に発癌率が低下しており、昨年度の結果と同等であり、IFN治療におけるウイルス駆除の重要性が再認識された。NR例では未治療例に比し発癌率には差がなかった。NR例でもALT値の正常化例では、発癌率が低いことがすでに判明しており、今後さらに調査を進める予定である。肝不全のみによる死亡例は1例であることから、死亡の要因としては、肝癌が肝不全より重要と考えられた。

E. 結論

IFN治療によりウイルス駆除が得られた例では有意に発癌の危険度が低下すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yano Y, Yamashita F, Sumie S, Ando E, Fukumori K, Kiyama M, Oyama T, Kuroki S, Kato O, Yamamoto H, Tanaka M, Sata M. Clinical features of hepatocellular carcinoma seronegative for both HBsAg and anti-HCV antibody but positive for anti-HBc antibody in Japan. *Am J Gastroenterol* 2002;97:156-161.

2) Kuromatsu R, Tanaka M, Ando E, Harada R,

- Kumashiro R, Sata M. Long-term results after PEIT for HCV-related small HCC and its prognostic factors. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Meeting 2002 2002;149-151.
- 3) Ando E, Tanaka M, Yamashita F, Kuromatsu R, Yutani S, Fukumori K, Sumie S, Yano Y, Okuda K, Sata M. Hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis: Analysis of 48 cases. *Cancer* 2002;95:588-595.
- 4) Ando E, Oriishi T, Toyonaga A, Tobaru T, Tanaka M, Shimamura R, Terai Y, Nakajima Y, Sata M. Alpha-fetoprotein- and des-gamma-carboxy prothrombin-producing advanced gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:687-691.
- 5) Yoshida H, Arakawa Y, Sata M, Nishiguchi S, Yano M, Fujiyama S, Yamada G, Yokosuka O, Shiratori Y, Omata M. Interferon therapy prolonged life expectancy among chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 2002;123:483-491.
- 6) Koga H, Sata M. Involvement of p21^{WAF1/Cip1} and p27^{Kip1} in troglitazone-induced cell cycle arrest in human hepatome cell lines. *Growth, Proliferation, and Apoptosis in Hepatocytes* Springer-Verlag. Okita K, ed. 東京. 2002;61-72.
- 7) Kumashiro R, Ide T, Sasaki M, Murashima S, Suzuki H, Hino T, Morita Y, Miyajima I, Ogata K, Tanaka E, Yoshida H, Tanikawa K, Sata M. Interferon- γ brings additive anti-viral environment when combined with interferon- α in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2002;22:20-26.
- 8) Nagao Y, Tanaka J, Nakanishi T, Moriya T, Katayama K, Kumagai J, Komiya Y, Itoh Y, Myoken Y, Fujihara M, Sata M, Yoshizawa H. High incidence of extrahepatic manifestations in an HCV hyperendemic area. *Hepatol Res* 2002;22:27-36.
- 9) Ide T, Kumashiro R, Hino T, Murashima S, Ogata K, Koga Y, Sata M. Short term and two-step interferon therapy for chronic hepatitis C patients with low HCV RNA levels. *Hepatol Res* 2002;22:145-151.
- 10) Kakumu S, Matsushima T, Sato S, Kobayashi K, Kiyosawa K, Hayashi N, Tsuji T, Sata M, Origasa H, Iino S, RAM Study Group. Serum HCV RNA levels during early phase of recombinant interferon alfa-2a (Roferon A) therapy for chronic hepatitis C and efficacy of short-term therapy with earlier loss of viremia. *Hepatol Res* 2002;22:152-160.
- 11) Nagao Y, Tsubone K, Kimura R, Hanada S, Kumashiro R, Ueno T, Sata M. High prevalence of anticardiolipin antibodies in patients with HCV-associated oral lichen planus. *Int J Mol Med* 2002;9:293-297.
- 12) Nagao Y, Tomonari R, Kage M, Komai K, Tsubone K, Kamura T and Sata M. The possible intraspousal transmission of HCV in terms of lichen planus. *Int J Mol Med* 2002;10: 569-573.
- 13) Hanada S, Kumashiro R, Kaji R, Harada M and Sata M. Additional benefit of lamivudine treatment as a preventive therapy for hepatic encephalopathy in patients with decompensated liver cirrhosis associated with hepatitis B. *Int J Mol Med* 2002;10:647-648.
- 14) Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, and Yoshimura A. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med* 2002;196:641-653.
- 15) Sakai K, Iwao T, Oho K, Toyonaga A, Sata M. Propranolol ameliorates thrombocytopenia in patients with cirrhosis. *J Gastroenterol* 2002;37:112-118.
- 16) Tsuda H, Sata M, Ijuin H, Kumabe T, Uchida M, Ogou Y, Akagi Y, Shirouzu K, Hara H, Nakashima Y. A novel strategy for remission induction and maintenance in cancer therapy. *Oncol Rep* 2002;9:65-68.
- 17) 井出達也、神代龍吉、矢野右人、古賀満明、石橋大海、林田一洋、加藤有史、中尾一彦、山本匡介、水田敏彦、坪内博仁、林 克裕、古川哲也、藤山重俊、近沢秀人、佐田通夫、九州ラミブジン研究会. Lamivudine が投与された B 型慢性肝炎の長期臨床経過. *肝臓* 2002;43:137-143.
- 18) 佐田通夫、神代龍吉. B 型肝炎 - ラミブジンの適応と治療成績. *肝臓* 2002;43:426-431.
- 19) 長尾由実子、佐田通夫. インターフェロンの副作用 (小柴胡湯との併用を含む). *日本医師会雑誌* 2002;128:1068-1069.
- 20) 上野隆登、佐田通夫. 肝臓維化治療の最前線. *日本消化器病学会雑誌* 2002;99:365-378.
- 21) 権藤和久、神代龍吉、江森啓悟、松山幸弘、古賀研志、今村賢一郎、佐田通夫. 若年者に発生した覚醒剤乱用が原因と考えられる C 型肝炎. *日本消化器病学会雑誌* 2002;99:1240-1242.
- 22) 水田由紀子、伊集院裕康、小野尚文、宮本安尚、於保和彦、神代龍吉、豊永 純、佐田通夫、中島 収、長田英輔. 側副血行路閉塞術後に大脳基底核 MRI 高信号が改善した肝性脳症の 1 例. *日本消化器病学会雑誌* 2002;99:1487-1492.
2. 学会発表
- 1) A cytokeratin mutation induces Golgi reorganization in liver-derived epithelial cell lines. Kumemura H, Harada M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Hanada S, Maeyama M, Koga H, Kumashiro R, Ueno T, Sata M. The American Association for the Study of Liver Diseases (53rd Annual Meeting)(2002)Boston, USA. (*Hepatology* 2002;36(4):240A.)
- 2) Long-term results after PEIT for HCV-related small HCC and its prognosis factors. Kuromatsu

R, Tanaka M, Ando E, Harada R, Kumashiro R, Sata M. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Meeting (2002) Taipei, Taiwan. (Asian Pacific Association for the Study of the Liver Meeting 2002 2002;149-151.)

3)Truncated type II TGF-beta receptor promotes liver regeneration in dimethylnitrosamin-treated cirrhotic rats. Nakamura T, Sakata R, Sakamoto M, Torimura T, Ueno T, Sata M. The 37th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (2002) Madrid, Spain. (J Hepatol 2002;36(Supple.1):28.)

4)Survival benefit in hepatocellular carcinoma patients with portal vein tumor thrombosis treated by hepatic arterial infusion chemotherapy. Ando E, Tanaka M, Yamashita F, Kuromatsu R, Sumie S, Fukumori K, Yutani S, Yano Y, Kumashiro R, Sata M. The 37th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (2002) Madrid, Spain. (J Hepatol 2002;36(Supple.1):76.)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C型慢性肝疾患に対するインターフェロン治療の予後改善効果に関する研究

分担研究者 藤山重俊 熊本大学第三内科 助教授

研究要旨：C型慢性肝疾患に対するインターフェロン(IFN)治療の長期効果としての生命予後改善効果の評価を目的として、肝生検施行後1年以上経過観察した537例につき、治療効果別に無治療例と合わせて検討した。IFN治療によりウイルス消失が得られた群およびALTが80U/l以下に安定化した群は、無効群、無治療群と比較して、肝癌発生、非代償期への移行、生存とも改善が認められた。多変量解析の結果、非代償期への移行、生存に寄与する独立因子は、肝癌発生の有無であった。すなわち、IFN治療による予後改善は、肝癌発生抑止に起因するものと考えられた。

A. 研究目的

C型慢性肝疾患に対するインターフェロン(IFN)治療の肝癌抑止効果は既に明らかとなっている。今回、IFN治療の予後改善に与える影響について検討した。

B. 研究方法

肝生検後1年以上経過観察したC型慢性肝疾患537例を対象とした。総投与量250MU以上のIFNを投与した症例をVSR; IFN治療後HCV RNAが持続陰性化した症例、BSR; HCV RNAが持続陰性化せずALTが持続正常化した症例、PR; HCV RNAが持続陰性化せずALTが80U/L以下を維持した症例、NR; その他の症例、に分類し、IFNを投与しなかった症例をControl群とした。肝癌発生、生存に加え、顕性黄疸、腹水、肝性脳症の出現を非代償期への移行とし比較検討した。

C. 研究結果

IFN治療群は447例(F0/F1 57例, F2 176例, F3 172例, F4 42例; VSR 190例, BSR 19例, PR 91例, NR 147例)で年齢48.7±11.0歳、観察期間6.2±2.9年、Control群は90例(F0/F1 16例, F2 22例, F3 25例, F4 27例)で年齢54.2±9.8歳、観察期間6.7±3.5年であった。1年以内の受診者の割合(追跡率)は、IFN治療群60%、Control群76%であった。肝癌発生はControl群から27例、IFN治療群から31例(VSR 3例, PR 3例, NR 25例)であり、VSR, BSR, PR例はControl群、NR例に比して肝癌発生率が有意に低かった。非代償期への移行はControl群から17例、IFN治療群から18例(VSR 1例, PR 4例, NR 13例)で、VSRからの移行は肝癌進展後の肝不全に伴うものであった。肝癌未発生例の4例(Control群2例, NR 1例, PR 1例)、肝癌発生以前に5例(Control

群3例, NR 2例)、また、肝癌無再発例の3例(Control群2例, NR 1例)が非代償期に移行した。多変量解析では、非代償期への移行に寄与する独立因子は肝癌発生であった(リスク比10.2倍)。観察期間の肝臓関連死は、Control群では12例のうち11例が肝癌発生例であり、IFN治療群では13例でいずれも肝癌発生例であった。多変量解析では、肝臓関連死に寄与する独立因子は肝癌発生であった(リスク比53倍)。

D. 考察

IFN治療によりC型慢性肝疾患患者の予後が改善されるが、主に肝癌発生抑止に起因すると考えられた。しかしながら、肝癌未発生、肝癌発生前、肝癌無再発で非代償期へ移行した12例は、肝癌発生とは直接的には関係なく肝病変が進展したためと考えられ、内訳はControl群7例、NR 4例、PR 1例であった。このことから、ウイルス駆除例およびALT安定化例では、非代償期移行抑止によるQOLの改善も期待できるものと考えられた。

E. 結論

C型慢性肝疾患に対するIFN治療は、肝癌抑止に加え、生命予後改善、QOLの改善が期待できる。

F. 健康危険情報

IFN治療により、HCV RNA消失例、ALT安定化例は生命予後改善が期待できるが、いずれも得られなかった例では、予後が改善されない可能性が高い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshida H, Arakawa Y, Sata M, et al. Interferon therapy prolonged life expectancy among chronic hepatitis C patients. *Gastroenterology* 123: 483-491,