

200400675A

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

予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える
因子に関する研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小俣 政男

平成 17 (2005) 年 3 月

「予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える因子に関する研究」にあつて

肝細胞癌の増加は、目を見張るものがあります。本邦においては、C型肝炎感染者の高齢化と共に、肝癌発症者の年齢も年々高くなっており、現在我々の施設では初発の癌の患者さんの年齢は69才になろうとしております。高齢化と共に、肝癌の診断と治療法の進歩は目覚ましいものがあります。しかしながら、既に肝硬変あるいは進行した線維化を基礎とした新たな癌の発生・再発が大きな問題となっております。Secondary Preventionによる発癌抑制で、患者さんの生命予後の改善が望まれます。

本研究班は、このSecondary Preventionを中心とした研究を行つて参りました。その中で明らかになつた重要なことは、背景の肝臓にできる線維化の寛解を目指す事であり、また発癌機構に基づいたChemopreventionを行う事があります。これは極めて臨床的な課題であると同時に、基礎的な研究手法を必要とします。

本報告書は、その研究成果をまとめたものであります。

平成17年3月

肝炎等克服緊急対策研究事業

「予後改善を目指した肝臓がん再発に
影響を与える因子に関する研究」

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. 予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える因子に関する研究	3
東京大学医学部附属病院消化器内科 椎名秀一郎、同臨床試験部 金井文彦	
2. 予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える因子に関する研究	5
岡山大学大学院医歯学総合研究科消化器・肝臓・感染症内科 白鳥康史	
3. 予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える因子のひとつとしての生体側因子に 関する研究－B型肝炎からの発癌に関与するサイトカイン遺伝子多型	7
国立病院長崎医療センター臨床研究センター 石橋大海	
4. 予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える因子に関する研究	10
ヒュービットジェノミクス（株） 村松正明	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷	

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

予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える因子に関する研究

主任研究者 小俣政男 東京大学医学部附属病院消化器内科 教授

研究要旨：肝臓がん再発に関するコホート研究を行い、再発には治療後長期にわたって続き、初発腫瘍因子との関連がない背景肝新規発癌と、早期に多く、初発腫瘍の大きさや数に依存する残存微小肝内転移の2つの機序があることが明らかとなった。前者に対しては抗ウイルス療法、後者に対しては肝毒性の低いアジュバント療法の効果が期待される。後者については非環式レチノイドの肝臓がん細胞増殖抑制の作用機序およびビタミンK2の細胞内受容体の同定を行った。また、複数の臨床試験を開始した。

分担研究者：

椎名秀一朗：東京大学医学部附属病院消化器内科
講師
金井文彦：東京大学医学部附属病院臨床試験部
助手
白鳥康史：岡山大学大学院医歯学総合研究科
消化器・肝臓・感染症内科 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)
代表取締役

A. 研究目的

肝臓がんによってわが国では年間 35000 人の死者が生じており、その大部分はウイルス性慢性肝炎を基盤に生じた肝細胞癌である。近年、画像診断法の向上による早期発見と内科的局所焼灼療法などの治療法の進歩により肝臓がん患者の予後は格段に改善した。しかしながら、その5年生存率は40%程度であり、他臓器の早期固形癌と比べると明らかに劣る。その最大の原因は年15%-20%におよぶ治療後の肝臓がん再発である。本研究では肝臓がん再発の背景因子を明らかにし、有効な対策を講じることによって5年生存率を70%まで上昇させることを目的とする。

B. 研究方法

本年度は分担研究者の椎名・金井および白鳥が、各々の施設において治療した肝臓がん患者の治療後再発について解析した。また、石橋および村松は宿主側遺伝子多型（SNP）と肝臓がんとの関連

を検討した。小俣は非環式レチノイドの肝臓がん細胞抑制作用機序を検討した。

C. 研究結果

椎名らは東京大学消化器内科で治療した HCV 陽性肝臓がん患者 632 名の治療後再発を解析し、背景肝からの新規再発が年 18%程度であること、微小肝内転移からの再発は原発巣の大きさと腫瘍数に規定され、2 cm 以下の単発癌では稀であり、一方 3 cm 3 個をこえる場合は 50%以上の症例に肝内転移があったと推定した。

白鳥は岡山大学消化器・肝臓・感染症内科で治療した肝臓がん患者 792 名の治療後再発を解析し、早期再発には原発巣の大きさと腫瘍数が寄与し、後期再発には背景肝因子が関与することを示した。また、治療後の PIVKA-II 陰性化の有無が治療後再発に関連することを示した。

石橋は国立病院機構長崎医療センターにて治療した B 型肝炎患者 236 名（内肝臓がん合併 48 名）についてサイトカイン遺伝子多型の解析を行い、TGF- β codon10(+29)のジェノタイプ C/C が肝臓がん合併例で有意に低いことを示した。

村松は HCV 陽性患者 376 名（内肝臓がん合併 170 名）について、11 箇所の SNP の組み合わせによる肝臓がん予測モデルを作成し 73%の正答率を得た。臨床データによる予測正答率は 80%であった。

小俣は邵らとともに環式レチノイドの肝臓がん細胞株増殖抑制作用を解析し、これが FGF シグナル伝達系の遮断によるものであることを示した (Shao RX, et al. Gastroenterology 2005; 128: 86-95)。

また、金井らはビタミン K2 の細胞内受容体

を同定するとともに、ビタミンK 2の肝癌再発抑制効果に関するランダム化割付臨床試験、および再発を繰り返す進行肝癌の治療法開発を目指した探索的臨床試験を進めている。

D. 考察

椎名・金井および白鳥の研究結果は、ともに、肝癌の治療後再発においては背景肝からの新規発癌と微小肝内転移残存の両者が関与していることを示している。ここで、新規発癌の危険因子は初発肝癌のそれと基本的に同じと考えられるから、C型肝炎におけるインターフェロン、B型肝炎におけるラミブジンなどの抗ウイルス療法がその抑止に有効である可能性がある。実際の治療後再発は新規発癌と肝内転移が合わさったものであることを考慮しつつ、抗ウイルス療法と肝癌再発との関連を現在解析中である。

一方、治療後早期に多い、肝内転移による再発についてはアジュバント療法が必要と思われるが、肝癌の通常用いられる抗癌剤に対する感受性が高くないこと、および肝癌患者の多くが肝機能障害を有することから、あらたに肝毒性の低い治療法の開発が必要と考えられる。その候補として、現在までに、非環式レチノイドおよびビタミンK 2について、肝癌再発抑制効果が報告されている。小俣らは非環式レチノイドの肝癌細胞増殖抑制機序を明らかにし、同薬または類似薬剤による肝癌再発抑制の可能性を示唆した。また、ビタミンK 2の肝癌再発抑制効果にも注目し、臨床試験を行うとともに細胞内ビタミンK受容体の同定などを行っている。

肝癌では末期まで肝外転移は少なく、また、腫瘍径3 cm以下3個以内または5 cm以下単発、すなわち現在の健康保険適応内にとどまる症例では肝移植後の肝癌再発は少ない。この段階で肝内微小転移が稀ならず存在するとすれば、初期の肝細胞癌転移は肝内にのみ定着しうるものであることが考えられ、その機序の解明が再発抑制に結びつく可能性があろう。

E. 結論

肝癌再発には背景肝新規発癌と残存微小肝内転移の2つの機序がある。前者に対しては抗ウイルス療法、後者に対しては肝毒性の低いアジュバント療法が有効であると考えられた。

F. 健康危険情報

分担研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表：巻末に掲載
2. 学会発表：分担研究報告書参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：分担研究報告書参照
2. 実用新案登録：分担研究報告書参照
3. その他：分担研究報告書参照

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

予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える因子に関する研究

分担研究者 椎名秀一郎 東京大学医学部附属病院消化器内科 講師
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：肝癌では根治治療後の肝内再発が高率に生じることが知られている。局所焼灼療法により原発巣を根治しえたHCV陽性肝癌 623 名について、累積肝内再発を数学的モデルを用いて解析した。その結果、(1) 背景肝からの新規発癌が年率 18%と高値であること、(2) 直径 2 cmを超える肝癌では微小肝内転移も再発に寄与していることが示され、両者に対する対策が肝癌の予後改善に重要であると考えられた。

A. 研究目的

近年、肝癌の治療として内科的局所焼灼療法および外科的肝部分切除術が発達し、画像診断能の向上もあって、早期診断、根治治療症例が増えている。しかし、これら「根治例」にあっても再発が極めて多いことが肝癌（肝細胞癌）の特徴として知られている。本研究では内科的局所焼灼療法により画像診断（CT/MRI）上根治した肝癌患者における肝癌再発を解析し、肝癌の予後改善法について検討した。

B. 研究方法

東京大学医学部附属病院消化器内科において局所焼灼療法（エタノール注入療法、マイクロ波凝固療法またはラジオ波焼灼療法）を受けたHCV陽性の初発肝細胞癌患者の内、術後造影CT（またはMRI）により、全ての腫瘍の完全壊死が確認された 623 名を対象とした。対象患者は、3 ヶ月に一度の腹部超音波検査、3-6 ヶ月に一度の造影CT、1-2 ヶ月に一度の腫瘍マーカー測定によって再発に対するスクリーニングを受け、再発が生じた場合はできる限り再治療を行った。観測された累積再発率について、初発癌関連因子（径、腫瘍数など）や背景肝因子などの影響を解析した。

なお、金井はビタミン K の肝癌再発抑制効果に関する RCT も進めている。また、再発を繰り返す進行肝癌に対する治療法開発を目指した 2 つの探索的臨床試験を多施設共同で開始した。さらに、ビタミン K2 の作用機序を解明すべく質量分析器を用いたビタミン K2 の細胞内受容体の同定を進め、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 4 に結合しエストロゲン受容体を介した転写を調節

する可能性を明らかにした。

C. 研究結果

累積肝癌再発曲線は初発癌治療後 2-4 年の間に見かけ上の変曲点を示した。これより前の早期再発については初発癌の大きさおよび腫瘍数が有意な予測因子であったが、後期再発についてはこれら腫瘍因子は有意でなかった。再発ハザードをみると、初回治療後 5 年までは 30%-40% の高値であり、その後は 20%程度に低下していた。ここで、再発肝癌を背景肝からの新規発癌と初発癌治療時点での残存微小肝内転移の増大の 2 種にわけ、また、前者のハザードを一定、後者のハザードを対数ロジスティック分布すると仮定して、累積再発率に冠する数学モデルを構築した。観測された累積再発との比較から、新規発癌ハザードは年 18%と推定された。一方、初発癌治療時に微小肝内転移を有する症例の割合は初発癌の腫瘍因子によって異なり、径 2 cm 以下単発の場合は 10%以下、最大径 3 cm 以下 3 個までの場合は約 30%、それ以上では 50%を超えると推定された。

D. 考察

HCV陽性肝癌の再発については、新規発癌、および、微小肝癌以外では肝内転移の両者が大きく関与していることが示された。肝癌再発を減らすためには両者に対する対策が必要である。C型肝炎・肝硬変からの肝癌発生はインターフェロン療法によるHCV排除により著明に抑止されることが既に示されているが、肝癌治療後の背景肝からの新規発癌についても同様の効果が期待できる。ただし、肝内転移による再発は

別途の対策が必要である。一つには微小肝内転移を伴う確率が小さい早期の段階で肝癌を発見・治療することである。ただし、直径が2 cmを超えた段階で肝内転移が生じうるとすると、微小肝内転移に対する治療法の開発も重要であろう。

E. 結論

HCV陽性肝癌の再発について数学モデルを用いた解析を行い、(1) 背景肝からの新規発癌が年率18%と高値であること、(2) 直径2 cmを超える肝癌では微小肝内転移も再発に寄与していること、を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Yoshida H, Tateishi R, Arakawa Y, Sata M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Ishibashi H, Yamada G, Yokosuka O, Shiratori Y, Omata M. Benefit of interferon therapy in hepatocellular carcinoma prevention for individual patients with chronic hepatitis C. *Gut* 2004 ; 53 : 425-430.
2. Akamatsu M, Yoshida H, Shiina S, Teratani T, Tateishi R, Obi S, Sato S, Koike Y, Fujishima T, Ishikawa T, Shiratori Y, Omata M. Neither hepatitis C virus genotype nor virus load affects survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004 ; 16 : 459-466.
3. Teratani T, Yoshida H, Shiina S, Obi S, Sato S, Koike Y, Hamamura K, Akamatsu M, Fujishima T, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. A novel display of reconstruction computed tomography for the detection of small hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2004 ; 24 : 619-624.
4. Akamatsu M, Yoshida H, Obi S, Sato S, Koike Y, Fujishima T, Tateishi R, Imamura M, Hamamura K, Teratani T, Shiina S, Ishikawa T, Omata M. Evaluation of transcatheter arterial embolization prior to percutaneous tumor ablation in patients with hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial. *Liver Int* 2004 ; 24 : 625-630.
5. Omata M, Tateishi R, Yoshida H, Shiina S. Treatment of hepatocellular carcinoma by percutaneous tumor ablation methods: Ethanol injection therapy and radiofrequency ablation. *Gastroenterology* 2004 ; 127 (5 Suppl 1) : S159-166.
6. Tanaka Y, Kanai F, Kawakami T, Tateishi K, Ijichi H, Kawabe T, Arakawa Y, Kawakami T, Nishimura T, Shirakata Y, Koike K, Omata M. Interaction of hepatitis B virus X protein (HBx) with heat shock protein 60 enhances HBx-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 318: 461-469.
7. Tateishi R, Yoshida H, Shiina S, Imamura H, Hasegawa K, Teratani T, Obi S, Sato S, Koike Y, Fujishima T, Makuuchi M, Omata M. Proposal of a new prognostic model for hepatocellular carcinoma: an analysis of 403 patients. *Gut* 2005 ; 54 : 419-425.
8. Tateishi R, Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Koike Y, Fujishima T, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103:1201-1209.
9. Otsuka M, Kato N, Tanaka Y, Kanai F, Ichimura T, Isobe T, Abe S, Kawabe T, Omata M. Vitamin K2 binds 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 4 and modulates estrogen receptor mediated transcriptional activity. *Life Sci* 2005; 76:2473-82.
10. Fujishima T, Ishikawa T, Shiratori Y, Kanda M, Tateishi R, Akamatsu M, Koike Y, Sato S, Obi S, Hamamura K, Teratani T, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Age-related comparison to the profiles of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterol* (in press).
11. Yamashiki N, Tateishi R, Yoshida H, Shiina S, Teratani T, Sato S, Mine N, Kondo Y, Kawabe T, Omata M. Ablation therapy in retaining extent of hepatocellular carcinoma: A simulative analysis of dropout from the waiting list for liver transplantation. *Liver Transplant* (in press).
12. 金井文彦、荒川義弘、小俣政男：信頼性の高い治験を迅速に実施するための東大病院の取り組み。 *PHARMSTAGE* 2004; 3: 1-8.
13. 金井文彦、小俣政男：インターフェロンによる耐糖能障害 日本臨床 耐糖能障害—基礎・臨床研究の最新情報—63 巻、2004; 315-319.

学会発表

1. H.Yoshida, R.Tateishi, N.Yamashiki, Y.Kondo, N.Mine, M.Akamatsu, T.Fujishima, T.Teratani, S.Shiina, T.Kawabe, M.Omata. Recurrence of Hepatitis C Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma after Complete Tumor Ablation: An Analysis with Mathematical Model. *Digestive Disease Week* 2005, Chicago, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中：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

予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える因子に関する研究

分担研究者 白鳥康史 岡山大学大学院医歯学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科 教授

研究要旨：肝臓治療後の予後改善を目的に、肝臓再発・再々発に関与する因子ならびに腫瘍マーカーの推移と肝臓再発予後について検討した。肝臓再発に関与する因子の検討では、早期の再発には腫瘍側因子（腫瘍径・数）が、長期の再発には背景肝（血小板）が関与していた。肝臓再々発の検討では、年率の肝臓再々発率は再発率とほぼ同頻度であり、AST が有意な関連因子であった。腫瘍マーカーの推移と肝臓再発ならびに予後との関連の検討では、AFP 単独陽性例では治療後の AFP 正常化の有無では再発率に有意差は認められなかったのに対し、PIVKA-II 単独陽性例では、治療後の PIVKA-II 陰性化の有無が肝臓再発の有意な関連因子であり、治療後に PIVKA-II の陰性化を得ることが重要であることが示された。

A. 研究目的

肝臓治療後の予後改善を目的に、1)肝臓再発・再々発に関与する因子、2)腫瘍マーカーの推移と肝臓再発予後について検討した。

B. 研究方法

1) 当科で内科的な肝臓治療がなされた肝臓患者 792 例を対象とした。肝臓再発および肝臓再々発の頻度を検討した。さらに各種パラメータについて、肝臓再発に関与する因子を解析した。

2)肝臓 1,077 例を腫瘍マーカー（AFP、PIVKA-II）により分類し、治療後の腫瘍マーカー陰性化の有無による再発率を比較した。

（倫理面への配慮）

対象症例のデータは個人識別情報を取り除き連結可能匿名化を行った上で解析に供した。

C. 研究結果

1) 肝臓再発および再々発率はいずれも年率約 20-30%であり、再発率と再々発率とで大きな相違は見られなかった。再発に関与する因子の検討では、2 年以内の早期の再発には腫瘍

側因子（腫瘍径・数）および AST が、2 年以降の再発には背景肝（血小板）が有意に関連していた。再々発については、AST が有意な関連因子であった。

2)腫瘍マーカー別に AFP 単独陽性 140 例、PIVKA-II 単独陽性 304 例、AFP、PIVKA-II 両者陽性 148 例であった。各群の治療後における腫瘍マーカー陰性化の有無による再発率を比較すると、AFP 単独陽性群および AFP、PIVKA-II 両者陽性群では腫瘍マーカー正常化の有無により再発率に有意差は認められなかった。他方、PIVKA-II 単独陽性群では、治療後の PIVKA-II 陰性化の有無が肝臓再発および生存の有意な関連因子であった。

D. 考察

肝臓再発因子の解析より、治療早期および長期の再発にはそれぞれ腫瘍自体の因子および背景肝の因子が関与していた。このことより、治療早期および長期における再発がそれぞれ治療時点における肝内転移および新規の肝発癌に起因している可能性が示唆されるが、今後さらに詳細な検討が必要である。

腫瘍マーカーの推移から見た肝癌再発の検討では、PIVKA-II の治療後の正常化が再発に関する有意な因子であったが、AFP については有意差を認めていない。AFP は肝癌の背景である肝硬変においても高値を示すことより、その正常化の意義が明らかでない可能性がある。しかしながら、われわれは PIVKA-II (DCP)が新たな増殖因子であることを見いだしており、PIVKA-II に関しては単なる腫瘍マーカーとしての意義のみならず、肝癌細胞の増殖促進といった生物学的作用を反映している可能性が示唆される。

E. 結論

肝癌再発において、早期および長期の再発にそれぞれ腫瘍側因子（腫瘍径・数）と背景肝組織（血小板、AST）が関与していた。腫瘍マーカーの推移と肝癌再発との関連では、PIVKA-II 単独陽性例において治療後の PIVKA-II 陰性化の有無が肝癌再発に有意に関連しており、治療後の PIVKA-II 陰性化が重要であることが示された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, Koike K, Takaki A, Shiratori Y: Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. J Biol Chem 2005;280(8):6409-6415.

2. 学会発表

1) 松本栄二、小林功幸、白鳥康史: 肝細胞癌の再発及び再々発因子の検討. 第90回消化器病学会総会 平成16年 4月21日(仙台).

2) Fujikawa T, Suzuki M, Shiraha H, Takaoka N,

Ueda N, Nakanishi Y, Koike K, Takaki A, Shiratori Y: Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. 55th Annual Meeting of AASLD, Boston, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:

特許出願中 白鳥康史 他

異常プロトロンビンの癌増殖効果

特許願2002-371166 平成14年12月20日出願

(整理番号EP02SD1201)

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

予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える因子のひとつとしての
生体側因子に関する研究－B型肝炎からの発癌に関与するサイトカイン遺伝子多型

分担研究者 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

研究要旨：肝炎の進展および発癌には肝炎ウイルスの持続感染が重要な因子であるが、それに加え宿主因子も関与している。基礎肝疾患がB型肝炎およびC型肝炎においては初発癌治療後も多くの症例で癌の再発がみられるが、初発癌治療後も発癌要因が残存していることが理由として大きいものと考えられる。本年度は、B型肝炎患者の宿主因子の解析として、肝炎の進展、発癌に関与すると想定されるサイトカイン遺伝子の多型について検討した。その結果、肝癌合併例において TGF- β codon10(+29)の genotype C/C 型が、非合併例に比べ有意に低いことが明らかとなり、肝発癌には宿主因子として、年齢、炎症、線維化の程度に加え、サイトカイン遺伝子多型が関与することが示唆された。

共同研究者：

右田清志 国立病院機構長崎医療センター
大黒 学 国立病院機構長崎医療センター
大畑一幸 国立病院機構長崎医療センター
小森敦正 国立病院機構長崎医療センター
八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター

A. 研究目的

肝炎の進展および発癌には肝炎ウイルスの持続感染が重要な因子であることが明らかにされており、それに加え、年齢、炎症、線維化の程度など宿主因子も関与していることが想定されている。しかし、宿主の遺伝子要因については明らかにされていない。

一方、発癌患者の基礎肝疾患がB型肝炎およびC型肝炎である場合は、多くの症例で初発癌治療後も高率に再発がみられる。その理由として、臨床的要因とともに初発癌治療後も発癌要因が残存していることが大きいものと考えられる。

そのため本年度の研究として、B型肝炎患者における肝癌（HCC）発癌の宿主因子の解析として、肝炎の進展、発癌に関与すると想定されるサイトカインの

プロモーター領域シグナルペプチドの遺伝子多型と、肝炎の進展と発癌との関与について検討した。

B. 研究方法

インフォームド・コンセントの得られたB型肝炎患者 236 名（HCC合併例 48 名、HCC非合併例 188 名）を対象とした。平均年齢は 53.7 歳、男性 160 名、女性 76 名。肝硬変(LC)合併率は非癌患者群は 34.6%、肝癌患者群が 91.7%、全体で 45.8%であった。

末梢血よりDNAを分離し、PCR-SSCP法で遺伝子多型を解析した。解析部位は、TNF- β プロモーター領域(-308)、IL-10 プロモーター領域 (-1082,-819,-592)、IL-6 プロモーター領域(-174)、TGF- β codon 10(+29)、codon 25 (+74)である。

C. 研究結果

解析した範囲では、TGF- β codon25、IL-6 プロモーター -174 の部位の遺伝子多型は認めなかった。IL-10 プロモーター領域の遺伝子多型で、ACC ハップタイプが肝癌合併患者において多い傾向にあったが有意差はみられなかった

(HCC 33.3% vs non-HCC 30.3%)。TGF- β codon10 の genotype は、LC群、non-LC群と比較して有意差はみられなかったが、HCC合併例では、HCC非合併例に比べ、TGF- β codon10 C/C genotype が有意に低かった (HCC 14.6% vs non-HCC 31.9%)。

D. 考察

日本人を対象として検討では、TGF- β codon10 の C/C genotype で血清 TGF- β の血清濃度がほかの genotype に比べ高いことが示されている。TGF- β は肝線維化に促進的に働くことが知られており、TGF- β codon 25 の遺伝子多型との関連も報告されている。

今回の検討では、日本人に TGF- β codon 25 の遺伝子多型はみられなかった。TGF- β codon 10 の遺伝子多型については、線維化との関連ははっきりしなかったが、HCC合併例では、HCC非合併例に比べ、TGF- β codon10 C/C genotype が有意に低い結果が得られたことより、TGF- β codon10 と発癌との関連が考えられた。

B型肝炎患者の発癌には、年齢、炎症、線維化の程度が大きく影響することが報告されているが、これら因子に加え、宿主の遺伝子因子としてサイトカイン遺伝子の一つである TGF- β codon10 の多型も影響することが示唆された。

E. 結論

肝発癌に関与する宿主の遺伝子因子として、サイトカイン遺伝子の一つである TGF- β codon10 の多型の関与が示唆された。肝癌再発のしやすさにも関連してくることが考えられ、TGF- β codon10 が C/C 以外の genotype (T/C, T/T) の患者ではより注意したフォローが重要であることが示唆された。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表 (誌上発表)

- 1) Migita K et al. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2005, in press
- 2) Yatsunami H. IFN Receptor and IFN Signals, Therapy for Viral Hepatitis and Prevention of Hepatocellular Carcinoma pp176-85, M. Omata, K. Okita (Eds.), Springer-Verlag Tokyo, 2004.
- 3) Daiba A, Inaba N, Ando S, Kajiyama N, Yatsunami H, Terasaki H, Ito A, Ogasawara M, Abe A, Yoshioka J, Hayashida K, Kaneko S, Kohara M, Ito S. A low-density cDNA microarray with a unique reference RNA: pattern recognition analysis for IFN efficacy prediction to HCV as a model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 315(4): 1088-1096.
- 4) Ohata K, Koji Yano, Hiroshi Yatsunami, Manabu Daikoku, Michiaki Koga, Katsumi Eguchi, Michitami Yano. Natural Interferon- β Treatment and Interferon- β Receptor 2 Levels in Acute Hepatitis C. *Digestive Diseases and Sciences.* 2004; 49(2): 289-294.
- 5) The Global Burden Of Hepatitis C Working Group. Yvan Hutin, Hiromi Ishibashi, Daniel Lavanchy, et al: Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C-Defining a strategy to estimate the GBD associated with Hepatitis C Virus infection in terms of morbidity and mortality, and deciding which parameters to use for the natural history of morbidity and mortality. *J Clin Pharmacol.* 2004;44(1):20-29
- 6) Nomura H, Sou S, Nagahama T, Hayashi J, Kashiwagi S, Ishibashi H. Efficacy of early retreatment with interferon beta for relapse in patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2004; 28(1):36-40.
- 7) Nomura H, Sou S, Tanimoto H, Nagahama T, Kimura Y, Hayashi J, Ishibashi H, Kashiwagi S.

Short-term interferon-alfa therapy for acute hepatitis C: a randomized controlled trial. Hepatology. 2004 ;39(5):1213-1219.

8) Nomura H, Tanimoto H, Kajiwara E, Shimono J, Maruyama T, Yamashita N, Nagano M, Higashi M, Mukai T, Matsui Y, Hayashi J, Kashiwagi S, Ishibashi H. Factors contributing to ribavirin-induced anemia. J Gastroenterol Hepatol. 2004;19(11):1312-1317.

9) Dohmen K, Shirahama M, Shigematsu H, Irie K, Ishibashi H: Impact of hepatologists to extend survival of cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma: Comparison with non- specialists. Hepatogastroenterology 2004; 51(1): 564-569, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特許取得：なし

実用新案登録：なし

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

予後改善を目指した肝臓がん再発に影響を与える因子に関する研究

分担研究者 村松正明 ヒュービットジェノミクス（株）代表取締役
東京医科歯科大学難治疾患研究所分子疫学分野 教授（併任）

研究要旨：C型肝炎患者の予後を予測する目的で、慢性感染経過後 35 年を経て肝細胞癌発症例および非発症例における臨床情報および遺伝子多型を合わせて解析した。その結果、3つの遺伝子に含まれる SNP およびハプロタイプが癌発症例と有意の相関を示した。そのうちのひとつはケモカイン CTCL14 であり、肝癌組織で発現が低下することが明らかとなった。また予後診断の目的で、臨床情報および遺伝子多型を同時に扱い、決定木(Decision Tree)により、肝癌発症の予測ルールの検討を行った。その結果、最も良い予測を得られた組み合わせには、AFP、Alb、Pt が残った。

A. 研究目的

C型肝炎感染者は慢性化した経過の後に肝硬変、肝癌を併発する。肝細胞癌（HCC）の発症には感染者の遺伝的素因の関与が示唆されているが、その実体は不明な点が多く残されている。本研究はHCV慢性感染者中に存在する慢性感染経過後 35 年を経てもHCC発症を来さない症例やHCC再発有無の臨床観察をもとに、ゲノム情報を取り入れた遺伝統計学的な解析からHCCリスク遺伝子の同定を試み、HCCの発症予測とHCC再発因子を探索し将来的な治療対策を目指すのが目的である。

B. 研究方法

HCV陽性患者 376 人 (男性 208 女性 168 women, 年齢分布 22 歳から 84 歳, 平均年齢 62.5 years, 肝癌 170 例)を 2 群に分け、第 1 群 188 人に対して 171 候補遺伝子、遺伝子多型サイト 393 SNP について検索を行い有意であった SNP について、第 2 群 188 人に対する検証測定を実施した。患者はHBV陰性、1日当たり 80 g の飲酒歴 10 年経過をアルコール依存既往とした。年齢、性別に加えて臨床データとしては血清 Alb、Bil、ALT、AFP、プロトロンビン時間、血小板等を用いた。候補遺伝子としては growth factors、cytokines、chemokines とその受容体、apoptosis 関連、シグナル伝達、HCV受容体候補 CD 81 などを列挙した。 遺伝子多型である SNP の測

定は T a q M a n 法を使用し、Applied Biosystems 社から販売されている試薬 Assays-on-Demand を利用した。統計解析は臨床データについては t 検定、Mann-Whitney u 検定 及びカイ 2 乗検定を 遺伝子型データについてはカイ 2 乗検定、ロジステック回帰分析を行った。ハプロタイプの推定には LDSUPPORT を使用した。決定木 (Decision Tree) 解析には CHAID と CRT,QUEST アルゴリズム Kass(1980),Breiman(1984),Loh & Shih(1997)に基づく S P S S AnswerTree Version 3.1 の Classification Tree アルゴリズムを使用して解析した。

C. 研究結果

第 1 群検体の解析において、_無調整、_性別、年齢 (63 歳で cutoff) による層別化解析、③性別、年齢による調整した Logistic 回帰の 3 つのモデルにより、測定可能であった 390 SNP から 31 SNP を 1 次探索で選抜した。第 2 群検体で検証を実行し、最終的に 3 遺伝子 3 SNP、GDNF family receptor alpha 1 (GFRA1) および corticotropin releasing hormone receptor 2 (CRHR2)、chemokine (C-X-C motif) ligand 14 (CTCL14、旧名称 SCYB14) が選抜された。2004 年度は本研究の特許化と論文公表を実施した。さらに、臨床的な有用性追求のために、データマイニングの 1 手法である「決定木 (Decision Tree) 解析」に基づく HCC 発症予測を SNP の組合せで行った。その結果、2003 年度に有意とされた 3 SNP を含む 11 SN

P (TGFB3, FGF9, SSTR3 等) の組み合わせ (臨床データを使用せず) による作った予測ルールを用いて、376HCV 患者における HCC に罹患するかどうかを 73% の正答率で予測可能であった。臨床データと遺伝子型データを同時に扱い、同じ分類の停止規則で決定木解析を実施すると、4 種の臨床値のみ (AFP, Alb, PT 等) が残った。この場合の HCC 発症の予測正答率が 80% であった。

D. 考察

臨床データと遺伝子型データを同等に扱い決定木解析を実施した場合、HCC の発症の予測には臨床値が遺伝子型よりも高く寄与する。本研究は HCV 感染者に限った HCC 患者と非 HCC 患者のケースコントロール研究であり、病像診断時の臨床データを上回る確度の高い予測を遺伝子型の集成だけで得ることは困難であった。今後、HCC 再発を同集団で追跡し再発イベントの発生率による追跡研究 prospective study を行うことにより、HCC 未発症患者の遺伝素因による再発予測が可能になると考えられる。

E. 結論

HCV 感染者に限った HCC 患者と非 HCC 患者のケースコントロール研究において、HCV 慢性感染者の HCC 発症リスクに関与する遺伝的素因を 170 人の HCC 患者と 206 人の非発症者の臨床データと遺伝子型データの比較検討を行った。患者を直接診断しうる臨床現場では、直接的な問診及び測定可能な臨床値が高い有用性があることは言うまでもない。本研究は各々のデータの比較から、更に将来の発症や再発などの予後予測の向上の為に臨床現場での前向きな追跡研究による遺伝素因の追求が必要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Large-scale search of SNPs for hepatocellular carcinoma susceptibility genes in patients with hepatitis C virus infection. Kato, N., Ji, G., Hoshida, Y., Baba, M., Wang, Y., Otsuka, M., Taniguchi, H., Moriyama, M., Goto, T., Matsuura, T., Ishii, K., Shiina, S., Kawabe, T., Sugawara, Y., Makuuchi, M., Muramatsu, M., and

Omata, M. Submitted

2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得:

出願番号; 特願 2004-252105

特許タイトル; C型肝炎ウイルス感染に起因する肝疾患に関連する多型

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yoshida H, Tateishi R, Arakawa Y, Sata M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Ishibashi H, Yamada G, Yokosuka O, Shiratori Y, Omata M.	Benefit of interferon therapy in hepatocellular carcinoma prevention for individual patients with chronic hepatitis C.	Gut	53	425-430	2004
Omata M, Yoshida H.	Prevention and treatment of hepatocellular carcinoma.	Liver Transpl (2 Suppl 1)	10	S111-114	2004
Akamatsu M, Yoshida H, Shiina S, Teratani T, Tateishi R, Obi S, Sato S, Koike Y, Fujishima T, Ishikawa T, Shiratori Y, Omata M.	Neither hepatitis C virus genotype nor virus load affects survival of patients with hepatocellular carcinoma.	Eur J Gastroenterol Hepatol	16	459-466	2004
Wang Y, Kato N, Hoshida Y, Otsuka M, Taniguchi H, Moriyama M, Shiina S, Kawabe T, Ito YM, Omata M.	UDP-glucuronosyltransferase 1A7 genetic polymorphisms are associated with hepatocellular carcinoma in Japanese patients with hepatitis C virus infection.	Clin Cancer Res	10	2441-2446	2004
Teratani T, Yoshida H, Shiina S, Obi S, Sato S, Koike Y, Hamamura K, Akamatsu M, Fujishima T, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M.	A novel display of reconstruction computed tomography for the detection of small hepatocellular carcinoma.	Liver Int	24	619-624	2004
Akamatsu M, Yoshida H, Obi S, Sato S, Koike Y, Fujishima T, Tateishi R, Imamura M, Hamamura K, Teratani T, Shiina S, Ishikawa T, Omata M.	Evaluation of transcatheter arterial embolization prior to percutaneous tumor ablation in patients with hepatocellular carcinoma: a randomized controlled trial.	Liver Int	24	625-630	2004
Omata M.	Regression of liver fibrosis in patients treated by interferon.	Intern Med	43	887-888	2004
Omata M, Tateishi R, Yoshida H, Shiina S.	Treatment of hepatocellular carcinoma by percutaneous tumor ablation methods: Ethanol injection therapy and radiofrequency ablation.	Gastroenterology (5 Suppl 1)	127	S159-166	2004
Tanaka Y, Kanai F, Kawakami T, Tateishi K, Ijichi H, Kawabe T, Arakawa Y, Kawakami T, Nishimura T, Shirakata Y, Koike K, Omata M.	Interaction of hepatitis B virus X protein (HBx) with heat shock protein 60 enhances HBx-mediated apoptosis.	Biochem Biophys Res Commun	318	461-469	2004
Daiba A, Inaba N, Ando S, Kajiyama N, Yatsuhashi H, Terasaki H, Ito A, Ogasawara M, Abe A, Yoshioka J, Hayashida K, Kaneko S, Kohara M, Ito S.	A low-density cDNA microarray with a unique reference RNA: pattern recognition analysis for IFN efficacy prediction to HCV as a model.	Biochem Biophys Res Commun	315	1088-1096	2004
Ohata K, Yano K, Yatsuhashi H, Daikoku M, Koga M, Eguchi K, Yano M.	Natural Interferon_ Treatment and Interferon_ Receptor 2 Levels in Acute Hepatitis C.	Dig Dis Sci	49	289-294	2004
The Global Burden Of Hepatitis C Working Group. Hutin Y, Ishibashi I, Lavanchy D, et al.	Global Burden of Disease (GBD) for Hepatitis C-Defining : a strategy to estimate the GBD associated with Hepatitis C Virus infection in terms of morbidity and mortality, and deciding which parameters to use for the natural history of morbidity and mortality.	J Clin Pharmacol	44	20-29	2004
Nomura H, Sou S, Nagahama T, Hayashi J, Kashiwagi S, Ishibashi H.	Efficacy of early retreatment with interferon beta for relapse in patients with genotype 1b chronic hepatitis C.	Hepatol Res	28	36-40	2004
Nomura H, Sou S, Tanimoto H, Nagahama T, Kimura Y, Hayashi J, Ishibashi H, Kashiwagi S.	Short-term interferon-alfa therapy for acute hepatitis C: a randomized controlled trial.	Hepatology	39	1213-1219	2004
Nomura H, Tanimoto H, Kajiwara E, Shimono J, Maruyama T, Yamashita N, Nagano M, Higashi M, Mukai T, Matsui Y, Hayashi J, Kashiwagi S, Ishibashi H.	Factors contributing to ribavirin-induced anemia.	J Gastroenterol Hepatol	19	1312-1317	2004
Dohmen K, Shirahama M, Shigematsu H, Irie K, Ishibashi H.	Impact of hepatologists to extend survival of cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma: Comparison with non- specialists.	Hepatogastroenterology	51	564-569	2004
Yatsuhashi H.	IFN Receptor and IFN Signals,	Therapy for Viral Hepatitis and Prevention of Hepatocellular Carcinoma		pp176-185	2004
金井文彦、荒川義弘、小俣政男	信頼性の高い治験を迅速に実施するための東大病院の取り組み	PHARMSTAGE	3	1-8	2004
金井文彦、小俣政男	インターフェロンによる耐糖能障害	日本臨床耐糖能障害—基礎・臨床研究の最新情報	63	315-319	2004

吉田晴彦、建石良介、赤松雅俊、小俣政男	肝癌の再発予防	肝胆膵	49	1023-1028	2004
Otsuka M, Kato N, Tanaka Y, Kanai F, Ichimura T, Isobe T, Abe S, Kawabe T, Omata M.	Vitamin K2 binds 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 4 and modulates estrogen receptor mediated transcriptional activity.	Life Sci	76	2473-2482	2005
Tateishi R, Yoshida H, Shiina S, Imamura H, Hasegawa K, Teratani T, Obi S, Sato S, Koike Y, Fujishima T, Makuuchi M, Omata M.	Proposal of a new prognostic model for hepatocellular carcinoma: an analysis of 403 patients.	Gut	54	419-425	2005
Shao R-X, Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Hoshida Y, Moriyama M, Kawabe T, Omata M.	Acyclic retinoid inhibits human hepatoma cell growth by suppressing fibroblast growth factor-mediated signaling pathways.	Gastroenterology	128	86-95	2005
Tateishi R, Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Koike Y, Fujishima T, Yoshida H, Kawabe T, Omata M.	Percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma.	Cancer	103	1201-1209	2005
Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, Koike K, Takaki A, Shiratori Y	Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma.	J Biol Chem	280	6409-6415	2005
Fujishima T, Ishikawa T, Shiratori Y, Kanda M, Tateishi R, Akamatsu M, Koike Y, Sato S, Obi S, Hamamura K, Teratani T, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Omata M.	Age-related comparison to the profiles of patients with hepatocellular carcinoma.	Hepato-Gastroenterol		in press	2005
Yamashiki N, Tateishi R, Yoshida H, Shiina S, Teratani T, Sato S, Mine N, Kondo Y, Kawabe T, Omata M.	Ablation therapy in retaining extent of hepatocellular carcinoma: A simulative analysis of dropout from the waiting list for liver transplantation.	Liver Transpl		in press	2005
Migita K et al.	Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection.	J Hepatol		in press	2005

LIVER

Benefit of interferon therapy in hepatocellular carcinoma prevention for individual patients with chronic hepatitis C

H Yoshida, R Tateishi, Y Arakawa, M Sata, S Fujiyama, S Nishiguchi, H Ishibashi, G Yamada, O Yokosuka, Y Shiratori, M Omata

Gut 2004;53:425-430. doi: 10.1136/gut.2003.030353

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:
Dr H Yoshida, Department
of Gastroenterology,
University of Tokyo
Hospital, 7-3-1 Hongo,
Bunkyo-Ku, Tokyo
113-8655, Japan;
yoshida-2im@
h.u-tokyo.ac.jp

Accepted for publication
20 October 2003

Background: An increase in the incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) in Japan since the 1980s suggests an imminent outbreak in other countries where viral spread occurred more recently. Interferon therapy for chronic hepatitis C, in general, has been shown to prevent HCC.

Aims: To determine the scale of benefit in individual patients.

Subjects: Histologically proven chronic hepatitis C patients in the Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy (IHIT) cohort (*Ann Intern Med* 1999;131:174), as updated in March 2003.

Methods: The lifetime risk for HCC was calculated based on HCC incidence rates, stratified by sex, age, fibrosis stage, and outcome of interferon therapy. The gain in HCC free survival was defined as the difference between expected HCC free survival with sustained virological response and that without.

Results: The gain in HCC free survival was greater when a patient was younger and fibrosis was more advanced. For example, a 30 year old male with F3 fibrosis gained 12.4 years by attaining sustained response while a patient with F1 fibrosis older than 60 years gained less than one year. For a treatment protocol with a given sustained response rate, prior estimation of the gain can be obtained by multiplying the calculated HCC free survival for responders by the response rate.

Conclusions: The gain in HCC free survival may serve as an indicator of the benefit of interferon therapy in terms of HCC prevention and be useful in the consideration of indication and selection of treatment protocol for individual patients.

Various studies have indicated that a nationwide spread of hepatitis C virus (HCV) took place in Japan in the 1950s and 1960s.^{1,2} As a result, there has been a rapid increase in hepatocellular carcinoma (HCC) incidence since 1980, now claiming more than 30 000 deaths each year. Simultaneously, there was a decline in the number of deaths assigned to cirrhosis. The decline may be partly due to advances in HCC diagnosis but the major cause seems to lie in the increasing risk of HCC as patients are getting older. The time lag of 30 years between the peaks of infection spread and HCC incidence corresponds to the observed interval between the time of blood transfusion and carcinogenesis in typical HCC patients.³ These data strongly suggest an imminent outbreak of HCC incidence in other countries, including the USA, where HCV infection is thought to have been spread more recently.^{4,5}

Shortly after the discovery of HCV in 1989,^{6,7} interferon therapy was confirmed to be effective against HCV infection.⁸⁻¹⁰ We and other groups have shown that interferon therapy significantly reduces the risk of HCC development among chronic hepatitis C patients.¹¹⁻¹⁵ In our previous study, 50% relative risk reduction, compared with untreated patients, was observed for conventional interferon monotherapy that showed an overall sustained virological response (SVR) rate of 33%, and a relative risk reduction to 20% was revealed among patients who achieved SVR.¹⁵ As the antiviral efficacy of interferon therapy has been improved by recent advances such as combination with ribavirin^{16,18} and introduction of pegylated interferons,^{19,22} we can expect that the efficacy on HCC prevention has also been strengthened.

We have also shown that cirrhosis gradually resolves once SVR is achieved,²¹ suggesting that interferon therapy will also prevent death due to liver failure or variceal rupture. However, HCC is clearly the dominant cause of death in patients with chronic hepatitis C, at least among our cohort

in Japan where the average age is over 50 years and most patients abstain from heavy alcohol consumption.²⁴ Thus we have focused on HCC prevention as the primary object of interferon therapy.

Considering the current status of therapeutics, interferon therapy is clearly recommended only in a selected group of patients.²⁵ Since the benefit of antiviral therapy differs among individual patients, the indication as well as the choice of regimen should be decided based on the expected benefit for each patient. Quantification of benefit requires reasonable assessment of the lifetime risk of HCC and the expected reduction in it with treatment. In this study, we propose an indicator, the gain in HCC free survival, to quantify the benefit specific to individual patients. The value is calculated based on both life expectancy and individualised risk of HCC, and applicable to distinct protocols with varying efficacy. It may serve as the gold standard for the benefit of antiviral therapy in terms of HCC prevention.

MATERIALS AND METHODS

Incidence rates of HCC

Crude data were obtained from the IHIT (Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy) database,^{15,23,24} as updated on 31 March 2003. Every patient underwent liver biopsy in 1990 or later, and liver fibrosis was staged according to the classification system of Desmet and colleagues.²⁶ Patients had no history of HCC, and were positive for HCV antibody and negative for hepatitis B surface antigen. We excluded those who developed HCC or dropped out of surveillance within one year after liver biopsy, and the start

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; HCC, hepatocellular carcinoma; SVR, sustained virological response; NNT, number needed to treat

of observation was set at exactly one year after liver biopsy. Entry into the cohort was closed in 1999. The cohort population analysed in this study consisted of 2392 patients who received interferon monotherapy within one year of liver biopsy, and 395 patients who did not. Among 2392 interferon treated patients, 836 (34.9%) showed SVR, as determined six months after cessation of interferon administration. After undergoing liver biopsy, 90% of patients abstained from alcohol except for infrequent social occasions, and only 2% continued drinking alcohol (>80 g daily).

Patients underwent abdominal ultrasonography every 3–6 months, and contrast enhanced computed tomography was also performed every 6–12 months in patients with advanced fibrosis. A final diagnosis was made based on haemodynamic patterns on contrast enhanced computed tomography, abdominal angiography, or computed tomography during angiography. Ultrasound guided tumour biopsy was performed in ambiguous cases. The SVR group showed 27 events of HCC development during an observation period of 4767 person years; in the non-SVR group, 214 events in 9922 person years; and in the untreated group, 67 events in 2168 person years.

HCC incidence rates, stratified by age, sex, and fibrosis stage at entry, were calculated in each group by the person year method. Risk ratios were analysed using Cox proportional hazard regression. Age, as ranked by 10 years, and fibrosis stage were represented by dummy variables in the analysis. Adjusted HCC incidence rates were calculated so that the sum of squares of differences between the adjusted and observed values, weighted by the number of patients in each category, was minimised while conserving the risk ratios obtained by proportional hazard regression.

HCC free survival

The probability that a patient remains free of HCC at n th year of observation was calculated as:

$$\frac{(1-Q_1)(1-P_1) \times (1-Q_2)(1-P_2) \times (1-Q_3) \times \dots \times (1-Q_n)(1-P_n)}{(1-P_3) \times \dots \times (1-P_n)(1-P_n)}$$

where Q_i is the age and sex specific death rate in the general population and P_i is the annual incidence of HCC specific to the patient in the i th year. Age and sex specific death rates were those published by the Ministry of Health, Welfare, and Labour of Japan for the vital statistics surveyed in 2000.²⁷ The gain in HCC free survival by interferon therapy was defined as the area between the cumulative HCC free survival curves. This model is based on an assumption that fibrosis stage remains constant with time (see model limitations in the results section).

Statistics

Values are expressed as mean (SD) unless otherwise specified. All statistical analyses were performed with SAS Software version 6.12. We used an original program coded in Object Pascal to calculate cumulative HCC free survival.

RESULTS

Incidence rates of HCC

Demographic data of the patients analysed in the current study are summarised in table 1, and observed HCC development and deaths are shown in table 2, illustrating that HCC was the major sequela among the cohort. Crude incidences of HCC did not differ between the untreated group and the non-SVR group in the corresponding category (data not shown). Patients with advanced fibrosis (stages F3 or F4) in the non-SVR group or in the untreated group showed a very high incidence rate. In fact, values obtained were greater than those found in 1999,¹⁹ suggesting that the risk of HCC has increased with time. Fibrosis stage was determined at the time of liver biopsy and had possibly progressed during the observation period. As previously described, HCC incidence rates were substantially lower in the SVR group.

Cox proportional hazard regression analysis revealed that male sex, older age, and advanced fibrosis were associated with a higher risk of HCC, both in the non-SVR groups (table 3) and in the untreated group (data not shown). Multivariate analysis showed that the risk ratio of non-SVR to no treatment was 0.835 (95% confidence interval (CI) 0.625–1.125; $p=0.2214$). We previously showed that the risk of HCC was decreased in patients who showed normalised serum alanine aminotransferase levels in spite of continued viraemia after interferon therapy.²⁴ However, active hepatitis recrudesces not infrequently in a short period²⁸ and the effect on HCC prevention in those patients appears to decline in the long run. Thus we assumed that interferon therapy without attaining SVR had no effect on HCC prevention. Table 4 shows the incidence rates of HCC, as fitted to the crude data by the least squares method. These values were used in modelling of the estimated HCC free survival of individual patients.

HCC free survival

Using the fitted HCC incidence rates and the age and sex specific death rates, we estimated the lifetime cumulative HCC free survival with or without SVR. Figure 1 shows an example of a 30 year old male patient with chronic hepatitis C with stage F3 fibrosis. The area under the curve indicates the expected HCC free survival and the area between the two curves is the gain in HCC free survival when the patient achieves SVR. The gain, or the area, was calculated to be 12.4 years in this case.

We similarly calculated the gain in HCC free survival under various conditions (see fig 2, table 5). By definition, these values are applicable only after SVR has been achieved. The gain in HCC free survival that can be expected before the virological outcome is known is the product of the value in table 5 and the prior probability of achieving SVR.

The gain in HCC free survival was greater when a patient was younger or fibrosis was more advanced. Judging by the expected gain, indications for treatment are questionable in patients with fibrosis stage F0 or F1 and older than 60 years because they would gain less than one year even if they

Table 1 Demographic data for the patients analysed in the current study

	Untreated	Interferon treated	
		SVR	Non-SVR
No of patients	395	836	1556
Age (y)	55.0 (10.7)	47.7 (11.9)	50.5 (6.4)
Sex (M/F)	204/191	583/253	942/614
Fibrosis stage			
{F0-1/F2/F3/F4} (n)	128/141/42/84	278/331/173/54	440/568/381/167
{F0-1/F2/F3/F4} (%)	32/36/11/21	33/40/21/6	28/37/24/11

SVR, sustained virological response.

Table 2 Incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) and death in the study cohort

	Untreated	Interferon treated	
		SVR	Non-SVR
No of patients	395	836	1556
Follow up (y)	6.5 (2.8)	6.7 (3.0)	7.4 (2.9)
HCC development (n)	67	27	214
Death (n)	33	11	89
With HCC (n)*	22	6	59
Hepatic deaths			
Without HCC (n)	4	1	8
Non-hepatic deaths (n)	7	4	22

*Includes deaths not directly related to HCC in patients who had developed the cancer. SVR, sustained virological response.

attained SVR. On the other hand, patients with fibrosis stage F3 or F4 and younger than 50 years will gain more than 10 years with SVR, and more than five years even if the probability of attaining SVR is 50%.

Recently, the efficacy of interferon therapy has been improved by the introduction of peginterferon and ribavirin. However, more effective protocols will be accompanied by an increase in cost and incidence of untoward effects. These must be counterbalanced by an increase in expected benefit. While the increase in cost is the same, that in benefit is directly proportional to the values shown in table 5 and differs in each patient. The SVR rate for type 1b genotype high viral load infection was approximately 7% among the current cohort where six months of interferon monotherapy was the main protocol. The combination of peginterferon and ribavirin for 48 weeks, which is still under clinical trials in Japan, is expected to show a response rate of 40% or better for those patients. This difference (33%) corresponds to five years of the gain in HCC free survival in 40 year old patients with fibrosis stage F4 and to approximately one year in 60 year olds with fibrosis stage F2 (one third of the values given in table 5). Although these values are a hypothetical extrapolation, they may be clinically useful in choosing treatment protocols.

Model limitations

The model described in this article is based on several assumptions. Firstly, we assumed that interferon therapy

that failed to achieve SVR had no beneficial effect, as described above, and this may result in underestimation of the benefit. However, the difference cannot be large: a 30 year old male with fibrosis stage F4 has a gain of 16.59 years instead of 15.98 years, and an 80 year old male with fibrosis stage F0/1 has a gain of 0.18 years instead of 0.15 years if we based the calculations on the incidence observed in the untreated group.

Secondly, we assumed that the benefit of interferon therapy was limited to HCC prevention. This is certainly an underestimation: successful interferon therapy improves liver function and may prevent death from liver failure. Several studies, failing to find an effect on HCC incidence, still indicated improvement in liver function with interferon therapy.²⁹⁻³¹ However, hepatic death without developing HCC was rare in the current cohort; one patient in the SVR group (variceal rupture (n = 1)), eight in the non-SVR group (liver failure (n = 4), variceal rupture (n = 3), not specified (n = 1)), and four in the untreated group (liver failure (n = 2), variceal rupture (n = 2)) died of a liver related cause without developing HCC, indicating annual mortality rates of 0.02%, 0.08%, and 0.18%, respectively (table 2). These values were small relative to the observed incidence of HCC.

Thirdly, we assumed that fibrosis stage remained constant, with the risk of HCC unchanged except for the increment due to aging. This may not be true: in fact, we previously indicated fibrosis progression in untreated patients and amelioration in interferon responders.³³ However, we did

Table 3 Annual hepatocellular carcinoma (HCC) incidence rates according to age and sex

Age (y)	F0/1	F2	F3	F4
SVR, male				
< 39	0.05% (0/65)	0.09% (0/59)	0.16% (0/14)	0.24% (0/4)
40-49	0.05% (0/57)	0.09% (0/66)	0.16% (1/29)	0.24% (0/9)
50-59	0.39% (0/38)	0.69% (3/62)	1.21% (5/51)	1.86% (1/18)
60+	0.70% (3/29)	1.18% (3/38)	2.01% (4/35)	3.20% (1/9)
SVR, female				
< 39	0.02% (0/32)	0.05% (0/38)	0.10% (0/7)	0.15% (0/1)
40-49	0.03% (0/25)	0.05% (0/23)	0.10% (0/3)	0.15% (1/1)
50-59	0.23% (0/20)	0.41% (1/33)	0.73% (1/20)	1.12% (1/6)
60+	0.40% (0/6)	0.71% (1/18)	1.25% (0/14)	1.93% (1/6)
Non-SVR, male				
< 39	0.05% (0/83)	0.13% (0/72)	0.28% (2/29)	0.56% (0/6)
40-49	0.35% (2/85)	1.00% (4/101)	2.16% (7/46)	4.26% (10/32)
50-59	0.82% (6/82)	2.33% (19/111)	5.06% (26/74)	10.0% (17/33)
60+	1.03% (4/36)	2.93% (13/59)	6.35% (17/64)	12.5% (15/29)
Non-SVR, female				
< 39	0.02% (0/37)	0.07% (0/21)	0.14% (0/10)	0.29% (0/2)
40-49	0.18% (0/41)	0.51% (2/44)	1.10% (3/18)	2.17% (0/6)
50-59	0.42% (1/53)	1.19% (8/96)	2.57% (19/80)	5.08% (5/32)
60+	0.52% (1/23)	1.49% (11/64)	3.23% (10/60)	6.37% (12/27)

The percentages indicate the annual incidence rates fitted by the least squares method using the risk ratios shown in table 4. Numbers in parentheses are the observed events/number at risk in each category. SVR, sustained virological response; F0-F4, fibrosis stage.

Factor	Relative risk (95% CI)	
	SVR	Non-SVR
Male v female	1.66 (0.67-4.13)	1.97 (1.48-2.62)
Age (y)		
< 39	1	1
40-49	1	7.61 (1.81-31.93)
50-59	7.67 (1.69-34.72)	17.84 (4.39-72.49)
60+	13.20 (2.93-59.53)	22.36 (5.48-91.26)
Fibrosis stage		
F0/1	1	1
F2	1.76 (0.47-6.67)	2.86 (1.59-5.13)
F3	3.10 (0.86-11.26)	6.19 (3.50-10.95)
F4	4.78 (1.13-20.18)	12.23 (6.81-21.95)

Relative risks were calculated by Cox proportional hazard regression separately in each group.

not have enough samples to calculate age stratified rates of fibrosis progression. The long term changes in HCC risk in interferon responders have not yet been clearly elucidated. Thus using the incidence rates observed in the seven year observation period was a compromise. All of the assumptions listed here may have underestimated, but not overestimated, the benefit of interferon therapy.

Lastly, we did not analyse the effect of alcohol consumption as there were very few heavy drinkers among the cohort. Alcohol is one of the major risk factors for HCC development and liver failure. The merit of successful interferon therapy may be greater in drinkers if they wish to continue alcohol. However, we recommend abstinence to chronic hepatitis C patients whether or not they receive antiviral therapy.

DISCUSSION

To date, large scale cohort studies conducted in Japan, including ours, have unanimously indicated that by far the most important sequela of chronic hepatitis C is HCC development, and that interferon therapy significantly reduces its incidence. In contrast, several studies performed in Western countries found that HCC was less common, and interferon therapy did not have significant effects. The reason for this discrepancy has not been clarified. In this study, we showed that the risk of HCC substantially increased with age when patients of the same sex and fibrosis stage were compared (table 2). The prevalence of HCV infection in Japan is highly skewed to the older generations, and this may partly explain the high incidence of HCC in Japan. If this is the case, HCC incidence will increase substantially in Western countries in the near future, as it did in Japan in the 1980s.

The clinical importance of interferon therapy should be measured in terms of its efficacy in HCC prevention, at least in countries where HCC is the predominant complication of

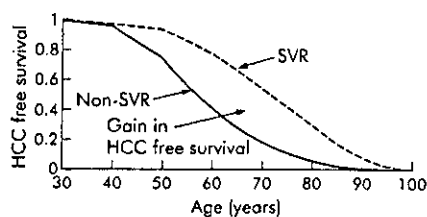


Figure 1 Gain in hepatocellular carcinoma (HCC) free survival by interferon therapy. The case of a 30 year old male patient with fibrosis stage F3. Cumulative HCC free survival curves were determined based on the patient specific HCC incidence rates and age and sex specific death rates in case of sustained virological response (SVR) and non-SVR. The area surrounded by the two curves indicates the gain in HCC free survival obtained by achieving SVR.

HCV infection. A popular indicator of efficacy of therapy in preventing a disease is the number (of patients) needed to treat (NNT), which is identical to the inverse of absolute risk reduction. Mathematically, NNT for one decrement in HCC development during a lifetime is equivalent to the life expectancy divided by the gain in HCC free survival. Supposing that the SVR rate is 100%, NNT is 3.92 (48.7/12.4; table 5) for a Japanese 30 year old male patient with fibrosis stage F3. This value should be divided by the expected SVR rate if the outcome is not known. As NNT is directly proportional to life expectancy, older patients have smaller values for NNT, indicating "higher efficacy", if the gain in HCC free survival is the same. This may not be intuitive for individualised consideration of indications for treatment.

Several authors have performed cost effective analyses of interferon therapy for chronic hepatitis C based on the Markov model.³¹⁻³³ In fact, our current model can be considered as a simplified Markov model where a chronic hepatitis C patient either achieves or does not achieve SVR with interferon therapy, and has the corresponding risk of HCC thereafter. Also, the HCC free survival is equivalent to the gain in quality adjusted life year, where a year before HCC development scores 1 and one after it scores 0. Owing to those simplifications, the model is not dependent on assumptive parameters but on observed data.

In conclusion, by using data obtained in a real cohort, we established an indicator of the benefit of interferon therapy—the gain in HCC free survival. This indicator may be useful in assessing the indications for interferon therapy and in selecting the best treatment protocol for individual patients.

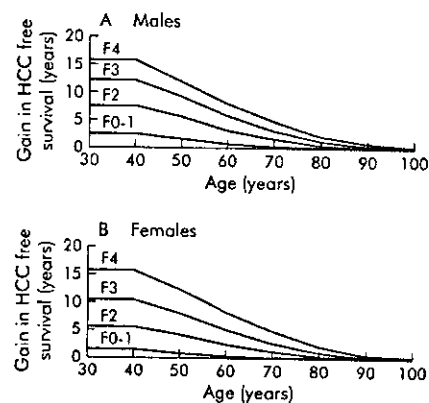


Figure 2 Gain in hepatocellular carcinoma (HCC) free survival by sustained virological response as a function of age and fibrosis stage.