

表1 HBc抗体陽性あるいは陰性のHCV抗体陽性者の解析

解析	HBc抗体陽性 (N=53)	HBc抗体陰性 (N=21)	P値
年齢 (歳)	62.3 ± 10.9	58.0 ± 16.4	NS
性別 (男:女)	23 : 30	5 : 16	NS
喫煙 (%)	16 (30.2)	4 (19.0)	NS
黄疸歴 (%)	8 (15.1)	3 (14.3)	NS
飲酒歴 (%)	3 (5.7)	2 (9.5)	NS
輸血歴 (%)	8 (15.1)	4 (19.0)	NS
ALT (IU/L)	40.6 ± 30.8	27.5 ± 17.9	NS
HBsAg (%)	1 (1.9)	0 (0)	NS
HCV RNA (%)	39 (73.6)	14 (66.7)	NS
HCC (%)	13 (24.5)	0 (0)	0.012

年齢と血中ALT値はmean ± SDで示す。

HCC : 肝細胞癌, NS; 有意差なし

表2 HCCの発生に影響を及ぼす危険因子の単変量解析

因子	HCC発生群 (n=13)	HCC非発生群 (n=61)	Odds ratio	95% CI	P value
年齢 (歳)	65.3 ± 8.1 (53-82)	60.1 ± 13.4	1.035	0.984-1.088	0.1866
男性 (%)	6 (46.2)	22 (36.1)	0.658	0.196-2.205	0.4976
喫煙 (%)	4 (30.8)	13 (21.3)	1.641	0.435-6.190	0.4646
飲酒歴 (%)	5 (38.5)	22 (36.1)	1.108	0.323-3.804	0.8706
輸血歴 (%)	3 (23.1)	8 (13.1)	1.988	0.448-8.810	0.3659
黄疸歴 (%)	5 (38.5)	5 (8.2)	7.000	1.652-29.667	0.0083*
AST (IU/l)	65.5 ± 31.1 (28-131)	33.0 ± 21.9 (13-132)	1.041	1.015-1.068	0.0016*
ALT (IU/l)	57.5 ± 24.8 (20-108)	32.6 ± 27.1 (9-160)	1.028	1.006-1.050	0.0119*
γ-GTP (IU/l)	127.1 ± 195.3 (17-720)	32.4 ± 34.2 (7-196)	1.015	1.003-1.027	0.0158*
総蛋白量 (IU/l)	7.97 ± 0.88 (6.6-10.0)	8.05 ± 0.58 (6.6-9.8)	0.808	0.309-2.107	0.6622
アルブミン (g/dl)	3.98 ± 0.49 (3.0-4.9)	4.33 ± 0.31 (3.2-4.8)	0.094	0.017-0.507	0.0060*
総コレステロール (mg/dl)	160.5 ± 33.1 (111-224)	173.8 ± 32.5 (111-257)	0.987	0.967-1.007	0.1851
総ビリルビン (mg/dl)	1.01 ± 0.50 (0.5-2.3)	0.77 ± 0.27 (0.4-1.3)	7.537	1.170-48.533	0.0335*
ZTT (KU)	15.35 ± 5.76 (1.1-21.7)	11.40 ± 4.86 (2.5-27.4)	1.161	1.026-1.314	0.0183*
HBc抗体 (%)	13 (100)	40 (65.6)	9.150	1.407-	0.0161*
HCV RNA (%)	13 (100)	40 (65.6)	9.150	1.407-	0.0161*

HCC : 肝細胞癌, CI : 信頼区間

年齢, AST, ALT, γ-GTP, 総蛋白, アルブミン, 総ビリルビン, ZTTはmean ± SD (範囲)で示す。

\*P<0.05

的に有意であった項目は、9項目 (AST, ALT, γ-GTP, Alb., T.B., ZTT, HBc抗体, HCV RNA, 黄疸)であった (表2)。Logistic回帰分析では、性別 (女性), HBc抗体陽性, HCV RNA陽性, 黄疸が肝癌の発生riskが高まる因子であった (表3)。

### Ⅲ. 結論および考察

HCV高感染地区住民に対する長期にわたる前向き疫学調査によって、HCVと不顕性HBVの重複感染者は、HCV単独感染者に比べて肝癌発生のリスクが高い結果が得られた。HCV抗体陽性

表3 HCCの亢進に影響を及ぼす危険因子の多変量解析

因子	Odds ratio	95% CI	P-value
年齢 (歳)	0.987	0.852-1.132	0.8428
女性	190.517	2.177- >999.999	0.0188*
喫煙 (%)	40.580	0.656- >999.999	0.0824
飲酒歴 (%)	5.951	0.163-3.804	0.3644
輸血歴 (%)	0.964	<0.001- >999.999	0.9918
黄疸歴 (%)	311.186	5.066- >999.999	0.0042*
AST (IU/l)	1.013	0.855-1.244	0.8776
ALT (IU/l)	0.974	0.791-1.101	0.7013
γ-GTP (IU/l)	1.006	0.990-1.080	0.6950
総蛋白 (IU/l)	15.131	0.227- >999.999	0.2035
アルブミン (g/dl)	<0.001	<0.001-11.319	0.1236
総コレステロール (mg/dl)	1.018	0.952-1.106	0.6028
総ビリルビン (mg/dl)	7.911	0.060- >999.999	0.4127
ZTT (KU)	0.695	0.370-1.196	0.1853
HBc抗体陽性	>999.999	1.556-	0.0292*
HCV RNA陰性	>999.999	3.767-	0.0063*

HCC：肝細胞癌，CI：信頼区間

\*P<0.05

者(肝癌発生13名と肝癌非発生61名)のLogistic回帰分析では、性別(女性)、HBc抗体、HCV RNA、黄疸の既往が肝癌の発生リスクを高める因子であった。以上のわれわれの結果からは、HBVとHCVの重複感染者は肝癌のリスクがHCV単独感染の場合よりも高いことを示唆している。重複感染の病態や発癌のメカニズムについては不明であるが、今後の肝癌患者の増加や高齢肝癌患者の増加を考えた場合、HCVキャリアの中でHBc抗体陽性者はより高い肝癌のリスクを持つ者として厳重なフォローが必要であるかもしれない。

#### 文 献

- 1) Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G et al : Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection. Gastroenterology 126 : 102-110, 2004
- 2) Sata M, Nakano H, Suzuki H et al : Sero-epidemiologic study of hepatitis C virus infection in Fukuoka, Japan. J Gastroenterol 33 : 218-222, 1998
- 3) Yotuyanagi H, Shintani Y, Moriya K et al : Virologic analysis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan: frequent involvement of hepatitis B virus. J Infect Dis 181 : 1920-1928, 2000

\* \* \*

## 討論

【林】 どうもありがとうございました。ご質問がございましたらどうぞ。

【清澤】 年齢やBMIで違いはありましたか。

【佐田】 BMIはみておりませんが最初の方におだしましたように年齢には差はありません。

【林】 検診の最初のときなのですが、HCV陽性率の高い地域だということだったのですが、肝癌に

占める非B非Cの割合が非常に高いような気がしたのですけれども、両者のHBs抗原とHCV抗体陰性は最初から割合が高かったのですか。

【佐田】 はい。まず肝癌になったヒトはHCV抗体陽性者の人からしかでていません。

【林】 陽性者からしかでていない。

【佐田】 それとこの地域ではHBVキャリアの1例が肝癌になっています。

【林】 どうもありがとうございました。

\* \* \*

# 1. B型肝炎からの発癌機序

岡上 武\* 南 祐仁\*

## はじめに

多くの疫学的データにより、B型肝炎ウイルス(HBV)感染と肝発癌に強い相関のあることは明らかになっているが<sup>1)</sup>、その詳細な機序はいまだに不明である。1980年に肝細胞癌においてHBVの宿主DNAへの組み込みが起こっていることが報告され<sup>2-4)</sup>、retrovirusと同様の組み込みによる癌遺伝子のcis-activationが発癌機序ではないかと想定されたが(図1)、多くのヒトの肝癌にはあてはまらないことが、その後の研究により報告された<sup>5)</sup>。HBVが肝発癌に関わる機序として、炎症の持続、ウイルス組み込みによるシス活性化、ウイルス蛋白によるトランス活性化、宿主遺伝子の不安定性の惹起など、多くの経路が想定されている(図2)。ヒトの発癌は多段階であり、発癌までに少なくとも6系統の遺伝子異常が重複して蓄積されないと発癌には至らないと推測されている<sup>6)</sup>。HBVで想定されている多様な発癌機序のいくつか、あるいは、すべてが、個々の発癌過程の進行に関与していると考えられる。

## I. HBV組み込みによる肝発癌

### 1. 1990年ごろまでの解析

HBVの近縁ウイルスである woodchuck hepatitis virus (WHV) は感染した宿主の9割以上にHCCを

惹起する。このウッドチャックの肝癌では約40%にN-myc, c-myc近傍へのウイルス組み込みがみられ、この組み込みにより正常肝ではみられないmycの活性化が起きることが証明されている<sup>7)</sup>。

HBVはDNAウイルスでありながら、プレゲノムRNAを介して逆転写酵素を用いてDNAを合成し、増殖する<sup>7)</sup>。この時に、中間的に生成される直鎖上二本鎖DNAが、宿主ゲノムに組み込まれると考えられている<sup>8)</sup>。こうした性質が代表的なRNA腫瘍ウイルスであるretrovirus属と共通であることから、HBVでもretrovirusと同様の発癌機序が存在すると考えられ、多くの研究が行われた。

1980年にヒト肝癌ゲノムへのHBVの組み込みが報告され<sup>2-4)</sup>、さらに多くの施設の報告からHBV陽性の肝癌では85%以上の症例でクロソナルな組み込みがみられることが判明した<sup>7)</sup>。しかし、HBVゲノム中には宿主由来のoncogeneは見つからず、transducing retrovirusのような発癌機序は否定された。

そこでcis-activating retrovirusにみられるような宿主のoncogene近傍への組み込みとそのシス活性化の有無が調べられた。1986年、肝癌組織でのHBVの組み込み部位のクローニングにより新たな細胞増殖に関連した遺伝子retinoic acid receptor  $\beta$  geneが同定された<sup>9)</sup>。また1990年には同様の方法で細胞周期に関係したcyclin A2 gene

\*京都府立医科大学大学院消化器病態制御学

- 1965 オーストラリア (Au) 抗原の発見 (Blumberg)
- 1968 Au 抗原がB型肝炎の原因と同定 (Prince・Okochi)
- 
- 1976 Blumberg ノーベル賞受賞
- ~1980 ころ HBV と肝癌の疫学的関連の指摘
- 1980 肝癌での HBV 組み込みの発見 (Bréchet・Koshy・Shafritz)
- 
- 1986 HBV 組み込み解析による RAR  $\beta$  遺伝子の発見 (Dejean)
- 1989 HBs トランスジェニックマウスに肝癌 (Chisari)
- 1990 HBV 組み込みによる cyclin A 遺伝子の発見 (Wang)
- 1991 HBx トランスジェニックマウスに肝癌 (Kim, Koike)
- 1990 ころ~ HBx と宿主蛋白との interaction の研究
- 
- 2001 肝癌細胞株での hTERT 遺伝子への HBV 組み込み (Horikawa)
- 2003 複数の肝癌での hTERT への HBV 組み込み (Paterlini- Bréchet・Ferber)

図1 HBVと肝発癌に関するマイルストーン

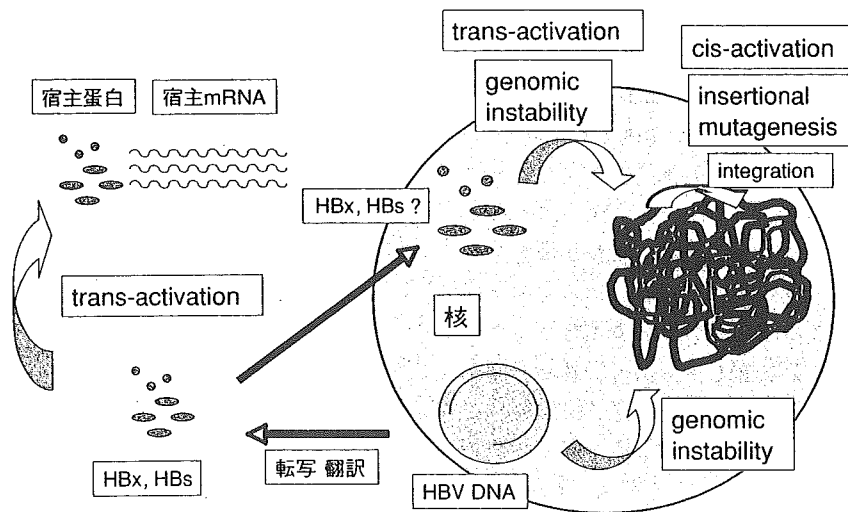


図2 HBVの発癌機序

HBx, HBsなどのウイルス蛋白が宿主蛋白との相互作用を介して、細胞増殖の活性化や増殖抑制因子の阻害などを行いうる。HBV DNAは宿主のDNAに組み込まれ、宿主遺伝子のシス活性化や機能抑制を起こしうる。また、ウイルス蛋白や組み込みHBVが染色体の不安定性を惹起させる機序も想定されている。

が発見された<sup>10)</sup>。HBV 遺伝子はこれらの遺伝子の open reading frame 内に組み込まれ、癌組織では本来のヒト遺伝子と HBV 遺伝子とが結合した chimeric mRNA が検出された。さらに、これらの chimeric transcript を用いた *in vitro* の実験で trans-

forming 活性が証明され<sup>11,12)</sup>、HBV の組み込みによる insertional mutagenesis が存在することを示した報告として注目された。しかし、ゲノム情報が少なかったこともあり、大部分の肝癌症例では組み込み遺伝子や染色体に一定の特徴や傾向は見

つからなかった<sup>5)</sup>。

## 2. ヒトゲノムプロジェクト後のHBV組み込みの解析

初期のHBV組み込みの解析には、ヒトゲノムの情報が乏しく、得られたflanking sequenceの解析が不十分であるという制限が存在した。一例をあげると、1992年にQuadeらが日本人肝癌組織からクローニングしたHBV組み込みのflanking sequenceをGenBank (S76119)に登録しているが、彼らはこれをβグロビン遺伝子の3'側にあるsemi-repetitive sequenceにあったと報告している<sup>13)</sup>。この配列を現在のデータベースで検索すると、このHBV組み込みは、human telomerase reverse transcriptase (hTERT)のプロモーター領域の上流に位置することがわかる。

また、ヒトゲノムからフェージライブラリーを作り、HBV組み込みクローンを検索していたため、比較的多量の癌組織と膨大なスクリーニングが必要であった。Bréchetらのグループは、こうした技術的な問題を解決するため、ヒト遺伝子中に多数散在する繰り返し配列Aluを用いた新しいPCR法を開発し、HBV組み込み部位の迅速な同定を可能にした<sup>14)</sup>。この方法を用いて、実際に肝癌組織より新たにsarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 (SERCA1) geneへのHBV組み込みを同定し、このSERCA1とHBVの融合蛋白がアポトーシスの調節を介して細胞増殖に関与していることを報告した<sup>15)</sup>。

## 3. hTERT遺伝子へのウイルス組み込み

BréchetらはさらにHBV-Alu PCRによる多数の症例のスクリーニングを行い<sup>16)</sup>、18例の肝癌から21個のflanking sequenceを得て、データベースとの比較により6例でヒト遺伝子近傍へのHBV組み込みを確認し、HBVによるinsertional mutagenesisが決して稀な事象でないと報告した。さらにPaterlini-Bréchetらは症例を追加し、22例の肝癌からHBV組み込みのみられる15の遺伝子を同定し、こうしたHBVによるinsertional mutagenesisを受ける遺伝子には、Rasシグナリング、細胞周期の調節、カルシウムシグナリング、テロメ

ア関連遺伝子、といった好発遺伝子がある可能性を示唆し<sup>17,18)</sup>、なかでもhTERTには2例の肝癌で共通して組み込みがみられた。

2001年Horikawaらは肝癌細胞株においてHBV組み込みがhTERTのプロモーター領域に起こり、これによりテロメラーゼ活性が上昇していることを報告した<sup>19)</sup>。hTERT遺伝子へのHBV組み込みは上述のBréchetらの一連の報告においても2例でみられ、また、上述のQuadeらの1例も存在する。これらの独立した研究グループからの報告により、HBV組み込みがランダムではなく、組み込みHBVによるhTERTのcis-activationが肝発癌における1つの重要なステップであることが明らかにされた。

さらに、2003年にFerberらは肝癌8例、肝癌細胞株5例におけるHBVの組み込みと子宮頸癌109例におけるhuman papilloma virus (HPV)の組み込みを検索し、肝癌の1例、肝癌細胞株の1例、子宮頸癌の3例からhTERT近傍へのウイルス組み込みを見つけた<sup>20)</sup>。HPVは、DNA腫瘍ウイルスであるが、HBVやWHVの属するhepadnaウイルスとは異なった属に分類されており、ウイルスの種を超えてDNA組み込みによるinsertional mutagenesisが発癌に関与すること、hTERTがウイルス発癌における重要な標的分子であることが確認された。

## 4. 慢性肝炎組織でのHBV組み込み

筆者らは、これまでにHBV組み込みが急性肝炎や慢性肝炎の時期からすでにみられることをHBV-Alu PCRを用いて明らかにしてきた<sup>21)</sup>。肝癌にみられるinsertional mutagenesisは、すでに慢性肝炎の時期にも起こりうると考えられ、また、慢性肝炎組織での検討により肝癌細胞でしばしば観察される染色体の組み換え、欠失などの影響を受けていない初期のHBV組み込みが検討できる可能性がある。

そこで、われわれは慢性B型肝炎組織より42個のviral-host junctionをクローニングし、その塩基配列を解析した。20クローンにおいてヒトゲノム配列をデータベース上で確認し、染色体上の

表1 HBxと宿主因子の相互作用

HBxによって活性化される転写領域	
NF- $\kappa$ B, AP-1, AP-2, c-EBP, ATF/CREB, NF-AT, RNA pol I, RNA pol III (HBxは直接DNAには結合せず protein-protein interaction を介す)	
HBxによって活性化される転写因子	
CREB, TFIIB, TFIIF, RPB5, c-EBP $\alpha$ , NF- $\kappa$ B	
HBxによって活性化される細胞内情報伝達系	
Ras-Raf-MAP kinase, JAK-STAT	
HBxのその他の標的分子	
p53	否定的な報告もあり
UVDDB	DNA修復に関連
HVDAC3	ミトコンドリア陽イオンチャンネルに関与
proteasome	転写因子の分解阻害に関与

位置を同定しえた。これらのHBV flanking regionの中には、肝癌において発現低下が報告されている癌抑制遺伝子AXIN1, ショウジョウバエの発生に重要な遺伝子のhuman homologueが3つあるなど, oncogeneやtumor suppressorとしての性質をもつ可能性があるものが存在し, 肝癌細胞株や肝癌の癌部, 非癌部で発現量の不均衡を認められた<sup>22)</sup>。また, これまでの他のグループから報告されたHBV組み込み染色体とあわせて解析すると, 3番染色体への組み込みが有意に多いことがわかった。

この結果よりHBV組み込みによるinsertional mutagenesisは, 慢性肝炎の時期から起こりうる大きな遺伝子変化であり, 多段階肝発癌の初期の1ステップとして重要であると考えられる。

## II. HBx蛋白による肝発癌

### 1. X蛋白の概論

HBxはHBVの作る蛋白の中で最も小さく, 機能が未知であり, 既知の蛋白との相同性も乏しかったためX proteinと名づけられた。HBVの複製, 増殖にはなくてもよいとされるが, 存在により複製効率が上昇することが示唆されている。主に, 細胞質に局在するが, 核に局在したり, 細胞質と核内を移動するという報告もある。X蛋白はHBV, WHV, grand squirrel hepatitis virusなどの

哺乳類のhepadnaウイルスでは, よく保存されているが, 鳥類のduck hepatitis B virusなどでは存在しない。哺乳類のhepadnaウイルスは肝癌を起こすが, 鳥類では肝癌の発生は知られていないため, X蛋白の肝発癌への関与が疑われた<sup>23)</sup>。また, ヒト遺伝子に組み込まれたHBVの半数以上はX蛋白をコードしており<sup>1)</sup>, その機能の解析が精力的になされた。1991年にKimら<sup>24)</sup>はHBxを導入したトランスジェニックマウスでの肝癌発生を報告し, HBxの肝発癌への関与が強く示唆されている。

### 2. HBxのトランス活性化作用

HBxは, DNAに直接結合することはないが, 蛋白間の相互作用によってさまざまな転写領域を活性化させる。また, CREB, TFIIB, TFIIF, RPB5, c-EBP  $\alpha$ , NF- $\kappa$ Bなど多くの転写因子に直接結合し, 活性化させることが報告されている(表1)。しかし, これらの報告は*in vitro*でHBxを多量に発現した解析の結果であり, *in vivo*で実際にこれらの経路がどのように影響を受けているかは明らかでない<sup>1,7,23)</sup>。

### 3. HBxによる細胞内シグナル伝達の活性化

HBxは, Ras-Raf-MAP kinase, JAK-STATといった細胞内シグナル伝達系を活性化することが*in vitro*での実験で明らかになっている。この活性化は, Src kinase, FAK/Pyk2 kinase, mitochondria

を介した細胞内Ca輸送に依存しており、HBxはこれらの上流に作用すると考えられている。また、HBxはNF- $\kappa$ Bの経路を活性化することも報告されているが、直接作用によるのか、上記のシグナル伝達の系を介しているのか不明である<sup>23)</sup>。これらの報告も*in vitro*でHBxを多量に発現した解析の結果であり、*in vivo*での作用は明確ではない。

最近、Chaら<sup>25)</sup>はHBV由来の肝癌細胞株においてのみ、Wnt-1によるWnt/ $\beta$ -cateninシグナル伝達が進むことを見つけた。この伝達はSrc kinase dependentであり、HBxを発現させると非HBV由来の肝癌細胞株においても同様のシグナル伝達を観察された。

これにより、過剰発現によらない系により、HBxのSrc kinase依存性の細胞内シグナル伝達調節が証明された。

#### 4. HBxとその他の蛋白との相互作用

HBxとp53との直接結合による抗アポトーシス作用が報告されているが、反対の結果も報告されており、結論は出ていない。また、DNA修復に関連したUVDDB、proteasomeに働くことによる転写因子の分解阻害、など多くの機序が推定、報告されている<sup>23)</sup>。HBxがtranscriptional activatorであり、また、多くの蛋白と相互作用のあることは明らかであるが、実際に生体内でどのように作用しているかは、今後の研究を待たねばならない。

#### 5. HBxの変異と発癌

HBVのbasic core promoterはX蛋白をコードする領域に存在し、肝炎の経過とともに変異(A1762T, G1764A)の起こりやすい場所として知られている。この変異はpregenomic RNAからのHBe抗原翻訳を抑制し、ウイルスの増殖には促進的に作用すると考えられており<sup>26)</sup>、臨床的にはHBe抗体陽性者に多い変異である。このcore promoter領域のdouble mutationが肝癌症例に多く見つかることが報告されている<sup>27)</sup>。この変異はHBxに対しては、アミノ酸変異をきたす(K130M, V131I)ので、これが発癌に関与してい

る可能性もある。また、HBx領域の3'末端は、宿主に組み込まれる際に高頻度に欠損するが、こうした3'末端の欠損により、wild typeのHBxで見られるcell cycle arrestやapoptosisがみられなくなり、細胞増殖促進に向かうことが報告されている<sup>28,29)</sup>。

また、YehらはX蛋白の31番目のアミノ酸変異S31Aが肝癌例で高頻度に見られることを報告している<sup>30)</sup>が、台湾以外からの報告はなく、人種やHBVジェノタイプの違いによるものかどうかを含めて検討を要する。

### Ⅲ. HBs蛋白による肝発癌

ChisariらのHBsトランスジェニックマウスにおける肝癌の発生<sup>31)</sup>やKekuleらの肝癌細胞株におけるC末端の欠損したHBs蛋白によるprotein kinase C pathwayの活性化の報告<sup>32)</sup>などにより、HBsも腫瘍原性蛋白の1つと考えられている。また、最近B型肝炎の経過中にしばしば出現するpreS2欠損変異のあるHBs蛋白にcyclin Aの活性化作用のあることが報告された<sup>33)</sup>。

こうしたS領域や上述したX領域の変異は、HBVの感染期間の長い症例に多く出現することが多く、同じく長い感染期間の後に発症することが多い肝癌と変異HBV蛋白との関連に興味もたれる。しかし、現在のところ、発癌と変異蛋白の出現が独立した現象であることを否定することは困難であり、明確な結論を得るにはさらなる根拠の蓄積が必要である。

### Ⅳ. HBVとHCVによる発癌機序の違い

HBVもHCVも慢性肝炎を起こした後、高頻度に肝癌を生じる。これらの肝癌において、ウイルスの違いによる発現遺伝子や遺伝子異常の違いはあるのだろうか。Laurent-Puigらはウイルスのetiologyによる遺伝子異常の違いをp53, Axin1,  $\beta$ -cateninの変異とLOHの解析により調べた<sup>34)</sup>。137例(HBV陽性42例, HCV陽性40例)の検討で、HBV関連肝癌は、非HBV関連肝癌に比し、染色体不安定性が高く、Axin1やp53の変異を伴う傾



向が強いことを示した。

cDNA arrayを用いた検討では、HCV由来の肝癌では薬物・毒物の解毒・代謝に関与する遺伝子群が発現亢進している<sup>35,36)</sup>のに対し、HBV由来の肝癌ではこの発現は低下している<sup>35)</sup>ことが報告されている。また、HBV由来の肝癌ではIGF2, H19, HCV由来の癌ではTGF- $\beta$ , 免疫関連遺伝子の発現が亢進していることが報告<sup>36,37)</sup>されており、ウイルスにより肝癌の発現遺伝子に差があることが示され、発癌機序にも違いのあることが示唆される。

### おわりに

ウイルスにとって、宿主細胞を維持・増殖させることは、自らの遺伝子の増殖・伝播に重要な機構であり、多くの腫瘍ウイルスでこうした仕組みが報告されている<sup>38)</sup>。retrovirusの組み込みは宿主の癌遺伝子を活性化させ、また、EBウイルスの作るLMP1は宿主のcyclin Dを活性化させる。また、アデノウイルスのE1A, E1B, HPVの作るE6, E7といったウイルス蛋白はp53やRBなどの宿主の癌抑制遺伝子を不活化して宿主細胞の維持に関与すると考えられている。

HBVでは、X蛋白やS蛋白などのウイルス蛋白やDNAの組み込みを介して、こうした宿主細胞の増殖に関与し、炎症の繰り返しによる遺伝子変異の蓄積などの宿主因子とあいまって発癌へと進展すると思われる。retrovirusやWHVなどと比し、HBVの発癌ポテンシャルは決して高いとはいえ、その機序を解明するには肝臓以外の発癌やHBV以外のウイルスの発癌からの類推を含め、さらに多くのデータの積み重ねが必要と思われる。

### 文 献

- 1) Arbuthnot P, Kew M : Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol* 82 : 77-100, 2001
- 2) Bréchet C, Pourcel C, Louise A et al : Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature* 286 : 533-535, 1980
- 3) Chakraborty PR, Ruiz-Opazo N, Shouval D et al : Identification of integrated hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in an HBsAg-producing human hepatocellular carcinoma cell line. *Nature* 286 : 531-533, 1980
- 4) Edman JC, Gray P, Valenzuela P et al : Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. *Nature* 286 : 535-538, 1980
- 5) Tokino T, Matsubara K : Chromosomal sites for hepatitis B virus integration in human hepatocellular carcinoma. *J Virol* 65 : 6761-6764, 1991
- 6) Hanahan D, Weinberg RA : The hallmarks of cancer. *Cell* 100 : 57-70, 2000
- 7) Ganem D, Schneider RJ : Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In *Fields' Virology* 4th ed, Knipe DM, Howley PM eds. Lippincott Williams & Wilkins, vol 2, 2001, pp2923-2969
- 8) Yang W, Summers J : Integration of hepadnavirus DNA in infected liver: evidence for a linear precursor. *J Virol* 73 : 9710-9717, 1999
- 9) Dejean A, Bougueleret L, Grzeschik KH et al : Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erbA and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 322 : 70-72, 1986
- 10) Wang J, Chenivresse X, Henglein B et al : Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 343 : 555-557, 1990
- 11) Garcia M, De The H, Tiollais P et al : A hepatitis B virus pre-S-retinoic acid receptor beta chimera transforms erythrocytic progenitor cells in vitro. *Cell Biol* 90 : 89-93, 1993
- 12) Berasain C, Patil D, Perera E et al : Oncogenic activation of a human cyclin A2 targeted to the endoplasmic reticulum upon hepatitis B virus genome insertion. *Oncogene* 16 : 1277-1288, 1998
- 13) Quade K, Saldanha J, Thomas H et al : Integration of hepatitis B virus DNA through a mutational hot spot within the cohesive region in a case of hepatocellular carcinoma. *J Gen Virol* 73 : 179-182, 1992
- 14) Minami M, Poussin K, Brechet C et al : A novel PCR technique using Alu-specific primers to identify unknown flanking sequences from the human genome. *Genomics* 29 : 403-408, 1995
- 15) Chami M, Gozuacik D, Saigo K et al : Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis. *Oncogene* 19 : 2877-2886, 2000

- 16) Gozuacik D, Murakami Y, Saigo K et al : Identification of human cancer-related genes by naturally occurring hepatitis B virus DNA tagging. *Oncogene* 20 : 6233-6240, 2001
- 17) Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y et al : Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 22 : 3911-3916, 2003
- 18) 南 祐仁, 岡上 武 : HBV 遺伝子組み込みと肝発癌. *肝胆膵* 49 : 537-543, 2004
- 19) Horikawa I, Barrett JC : cis-Activation of the human telomerase gene (hTERT) by the hepatitis B virus genome. *J Natl Cancer Inst* 93 : 1171-1173, 2001
- 20) Ferber MJ, Montoya DP, Yu C et al : Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene* 22 : 3813-3820, 2003
- 21) Murakami Y, Minami M, Daimon Y et al : Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 72 : 203-214, 2004
- 22) Minami M, Daimon Y, Mori K et al : Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 24 : 4340-4348, 2005
- 23) Bouchard MJ, Schneider RJ : The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol* 78 : 12725-12734, 2004
- 24) Kim CM, Koike K, Saito I et al : HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature* 353 : 317-320, 1991
- 25) Cha MY, Kim CM, Park YM et al : Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in hepatoma cells. *Hepatology* 39 : 1683-1693, 2004
- 26) Li J, Buckwold VE, Hon MW : Mechanism of suppression of hepatitis B virus precore RNA transcription by a frequent double mutation. *J Virol* 73 : 1239-1244, 1999
- 27) Hsia CC, Yuwen H, Tabor E : Hot-spot mutations in hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma. *Lancet* 348 : 625-626, 1996
- 28) Sirma H, Giannini C, Poussin K et al : Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both antiproliferative and trans-activation effects of HBx. *Oncogene* 18 : 4848-4859, 1999
- 29) Tu H, Bonura C, Giannini C et al : Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 61 : 7803-7810, 2001
- 30) Yeh CT, Shen CH, Tai DI et al : Identification and characterization of a prevalent hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 19 : 5213-5220, 2000
- 31) Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T et al : Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 5 : 1145-1156, 1989
- 32) Kekule AS, Lauer U, Meyer M et al : The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 343 : 457-461, 1990
- 33) Wang HC, Chang WT, Chang WW et al : Hepatitis B virus pre-S2 mutant upregulates cyclin A expression and induces nodular proliferation of hepatocytes. *Hepatology* 41 : 761-770, 2005
- 34) Laurent-Puig P, Legoix P, Bluteau O et al : Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 120 : 1763-1773, 2001
- 35) Okabe H, Satoh S, Kato T et al : Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 61 : 2129-2137, 2001
- 36) Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H et al : Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. *Cancer Res* 61 : 3939-3944, 2001
- 37) Delpuech O, Trabut JB, Carnot F et al : Identification, using cDNA macroarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 21 : 2926-2937, 2002
- 38) Nevins JR : Cell transformation by viruses. In *Fields Virology* 4th ed, Knipe DM, Howley PM eds. Lippincott Williams & Wilkins, vol 1, 2001, pp245-283

## 2. C型肝炎からの発癌機序

沖田 極\* 奥田 道有\*\* 古谷 隆和\*\* 日高 勲\*\*  
 横山雄一郎\*\* 坂井田 功\*\* 日野 啓輔\*\*\* 中村 和行\*\*\*\*

### はじめに

1989年にわが国にC型肝炎診断システムが導入されて以来、それまで非A非B型肝炎として取り扱われていた肝炎の実態がC型肝炎として明らかにされ、わが国の慢性肝炎、肝硬変の大半がC型肝炎ウイルス(HCV)の持続感染の結果であり、かつ、慢性肝疾患のエンド・ステージともいべき肝細胞癌(HCC)に関してはほぼ80%の患者がHCV感染者であることも明らかになった。HCV感染が肝炎を惹起するメカニズムについては免疫学の進歩により樹状細胞-CTLを介した細胞死やアポトーシスの関与が明らかとなり、また、線維化についてもクッパー細胞-肝星細胞の活性化を介して進展することも次第に明らかになってきた。今やC型肝炎をめぐる最大の関心事はHCVの持続感染による肝発癌を慢性肝炎から肝硬変というプロセスで生じる、いわゆる“炎症発癌”ととらえるべきか、HCVというウイルスのもつ特性が発癌に関与しているか、を明らかにすることにある。

本稿では、C型肝炎の進展過程で生じる宿主側の変化で発癌に関与する可能性の高い現象につい

て取り上げ、発癌の機序について考察してみたい。

### I. HCV持続感染と肝発癌

HCV持続感染の中でウイルス自体が肝発癌に直接関わっているかどうかについて直接的な証拠はない。しかしながら、抗ウイルス効果を持つインターフェロン投与によってウイルス排除、あるいはウイルス量が減じられた場合には肝発癌のリスクが無効例に比べ有意に減少するという事実は<sup>1-4)</sup>、HCVというウイルス自体に発癌に関与する因子が存在することを示唆している。

一方では、肝炎の遷延に伴いF1からF4へと線維化の進展とともに発癌のリスクが増大する<sup>5,6)</sup>ことから炎症発癌という考え方も可能であるが、炎症が持続するB型肝炎症例でみると炎症の持続と発癌の関係はC型肝炎ほど明白ではなく、やはりHCVというウイルスの持つ特性に注目せざるを得ない。

### II. HCV感染と酸化ストレス

“癌は遺伝子の病気である”という定義に従えばHCV感染は遺伝子異常を生じさせなければならない。C型肝炎患者の肝組織像については門脈域への炎症細胞浸潤と線維増生は当然としてもsteatosisも特徴的所見である。ラットではあるが、コリン欠乏L-アミノ酸置換食(cholin-deficient L-amino acid defined diet)を与えると高度脂肪肝が

\* 社会保険下関厚生病院

\*\* 山口大学医学部消化器病態内科学

\*\*\* 山口大学医学部保健学科病態検査学

\*\*\*\* 山口大学医学部分子感知医科学

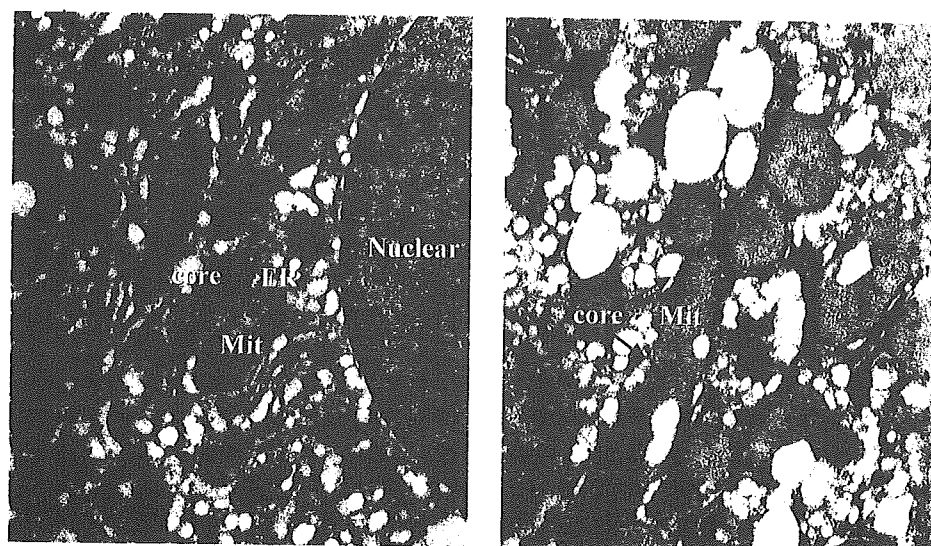


図1 HCVコア遺伝子トランスジェニック・マウス肝の電顕像  
免疫電顕法によってHCVコアの局在がミトコンドリア膜に認められる。倍率は42,000倍である。

ら肝硬変を経て肝細胞癌が発生することが知られており、その際の発癌はラジカルによるDNA障害の指標である8-hydroxy-guanosine (8-OHdG)の増加により、酸化ストレス( $O_2^-$ や $OH^-$ )によるDNA障害が惹起された結果と考えられている<sup>7,8)</sup>。

そこで、われわれはHCV感染がラジカル産生に直接的関与するのかどうかの検討を行った。慢性C型肝炎患者55例について、その肝生検組織中の過酸化脂質(malondialdehyde; MDA, 4-hydroxy-2-nonenal; HNE, 4-hydroxy-2-hexenal; HHE)をおのおのの抗体で免疫組織化学的に検討した結果、特にHHEは63.6%の症例で強発現していた<sup>9)</sup>。すでに、奥田らはHCVコアがミトコンドリア電子伝達を障害することによって $O_2^-$ や $OH^-$ が産生されることをHCVコア発現培養細胞を用いて明らかにしている<sup>10)</sup>。教室ではHCVコア遺伝子を組み込んだトランスジェニック・マウスを用いて肝発癌とHCVコアの関係を検討している。このマウスでは、電子顕微鏡的にHCVコアがミトコンドリア内膜に接着していることが明らかにされている(図1)。また、このトランスジェニック・マウスを鉄過剰飼料で飼育すると発癌率が増大することも確認しており(古谷ら、未発表デー

タ)、HCVコア→ミトコンドリア障害→酸化ストレス→DNA障害という気も発癌に至る一連の流れを明らかにすることができた。

### Ⅲ. C型HCCと Genomics

RNAウイルスであるHCVが直接宿主肝細胞DNAに組み込まれ、遺伝子異常を惹起する可能性は極めて低い。しかしながら、われわれのHCV陽性HCCのCGH解析では、1番染色体短腕、4番染色体長腕、8番染色体短腕、10番染色体長腕、13番染色体長腕、16番染色体長腕、17番染色体短腕にLOHを、また、1番染色体長腕、8番染色体長腕、11番染色体長腕にgainを認めており<sup>11)</sup>、前者は発癌促成遺伝子の不活性化、後者を発癌遺伝子の増強と考えれば遺伝異常が存在するといえる。しかしながら、これらの遺伝子異常は発癌後の材料を基にした成績であり、慢性肝炎から肝硬変、そしてHCCというステップに関連した遺伝子異常とはいえそうもない。HCCとは異なり好癌状態である硬変肝における遺伝子異常についての報告も散見されるが、その異常が機能的にどのように発癌に結びつくのかまでの検討は行われていない。表1はHCV陽性HCCで高発現

表1 C型HCCで高発現する遺伝子

解毒系	免疫系
3,4-catechol estrogen UDP-glucuronograte 71kD potransferase (UGT2B7)	complement component C1r (C1S)
Putative carboxylesterase (CES2)	complement component C6 (C6)
aldo-keto reductase family 1 (AKR1D1)	NK receptor
alcohol dehydrogenase 4 (ADH4)	complement 8 alpha subunit (C8A)
metallothionein from cadmium-treated cells	polymeric immunoglobulin receptor (PIGR)
nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)	pre-B cell enhancing factor (PBEF)
cytochrome P450 II E1 (CYP2E)	complement factor H-related protein4 (FHR-4)
nicotinamide N-methyltransferase (NNMT)	CD14 antigen (CD14)
H.szpiens mRNA for metallothionein (MTIH)	macrophage lectin 2 (ML2)
Human metallothionein-Ie gene (MT1E)	complement component 8, beta polypeptide (C8B)
Cytochrome P450, subfamily II A, polypeptide7 (CYP2A7)	dipeptidyl peptidase IV (DPP4)
Alcohol dehydrogenase 1B, beta subunit (ADH1B)	interferon-induced 17-kD/15-kD protein (ISG15)
	RIG-G (IFIT4)
	Serum amyloid A4 (SAA4)
	Serum amyloid A2 (SAA2)
	Serum amyloid A protein (SAA)

高発現する遺伝子群は解毒系と免疫系に連座している。

(文献12, 13より)

表2 C型HCCで変動するタンパク質

増強するタンパク質	減少するタンパク質
ATP synthase $\beta$ chain	aldolase B
glutamine synthetase	arginase 1
78 kD glucose-regulated protein (GRP78)	enoyl-CoA hydratase
75kD glucose-regulated protein (GRP75)	ferritin light chain
Heat shock cognate 71kD protein (HSC71)	ketoheokinase
Heat shock 70kD protein 1 (HSP70.1)	serum albumin
60kD heat shock protein (HSC60)	smoothelin
Phosphoglycerate mutase 1 (PMG1)	tropomyosin $\beta$ chain (TPM2)
Triosephosphate isomerase (TPI)	

(文献15より)

する遺伝子を機能の面から分類したもので解毒系と免疫系に連座していることがわかる<sup>12,13)</sup>。

#### IV. C型HCCとProteomics

遺伝子の網羅的解析の結果、数多くの遺伝子異常が発見されてもその異常が例えばタンパク質に翻訳され、どのような機能異常を惹起しているのかはほとんどわかっていない。そこで、われわれは逆に肝組織について proteomics 解析を行い、その変化から発癌機序を探ることを試みている。

C型HCCの proteomics 解析は比較的最近の研究でもあり手技についても若干触れておきたい。網羅的にタンパクを解析するために、C型HCCの癌部と非癌部に分けてホモジネートし、まずは二次元電気泳動を行い、MALDI-TOF MSによる peptide mass fingerprinting (PMS)、あるいは、post source decayを用いタンパク質の同定を Protein Prospector web siteの M-Fit データベースによって行っている<sup>14)</sup>。判定は、同一検体から得られる癌部と非癌部の二次元電気泳動を比較し、癌部

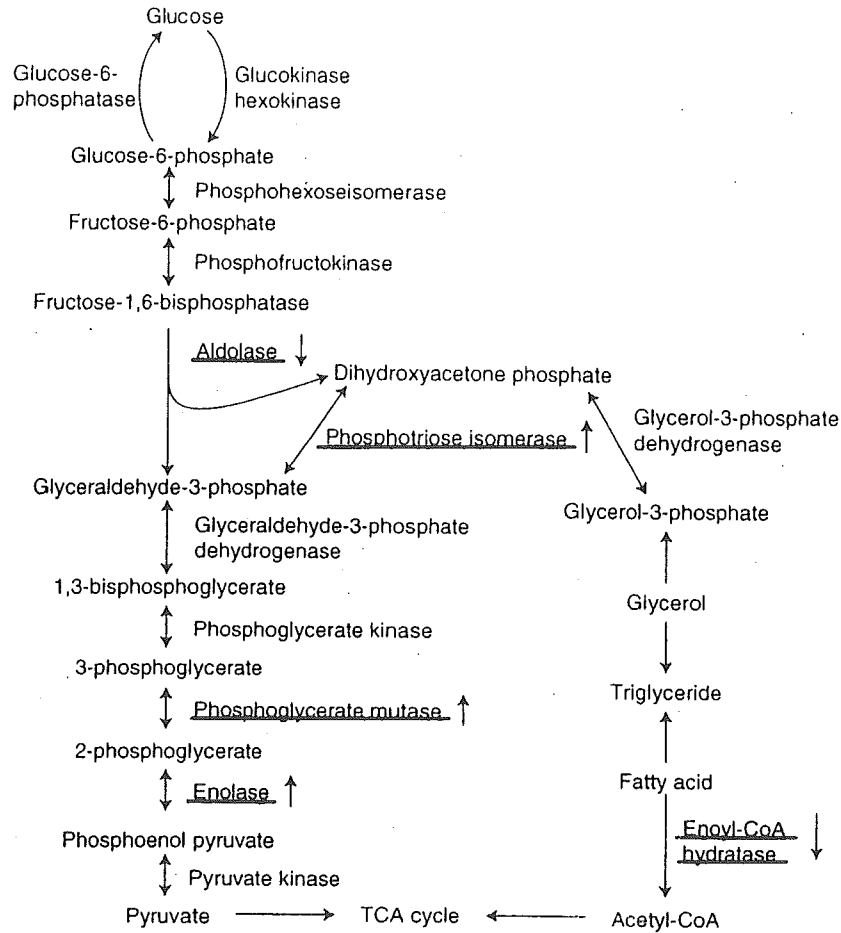


図2 C型HCCで変動する糖代謝系酵素 (文献15より)

プロテオミクス解析の結果、糖代謝に関する酵素の変動が観察された。下線を施した酵素がそれら酵素群で、右側の矢印は増 (↑)、減 (↓) を示している。

で2倍以上に染色強度が増加しているタンパク質と1/2以上に現弱するタンパク質に分けた(表2)<sup>15)</sup>。この結果をベースにしてタンパク質の増減を機能の面から考察する。

### 1. HSP70ファミリータンパクの増加

HSPファミリーであるGRP75, GRP78, HSC71, HSP70.1が癌部で増強していることは癌細胞内でのミトコンドリアや小胞体へのラジカルなどの負荷がうかがわれた。これは、HCVコアがミトコンドリアを障害し酸化ストレス産生に関与するという奥田らの報告<sup>10)</sup>と一致するものである。

### 2. ferritin light chainの減弱

Ferritin light chainの減弱は肝細胞内に遊離Fe<sup>2+</sup>の増加をきたし、より毒性の高いhydroxy radicalの生成を促進する。Hayashiらは肝に鉄の過剰蓄積を伴うC型肝炎患者に瀉血療法を行い肝機能検査値の改善を<sup>16)</sup>、また、KatoらはC型慢性肝炎患者に瀉血療法に加えて鉄制限食を行い8-HODGの低下と血清フェリチンの低下とともにHCCの発生を抑制したという報告<sup>17)</sup>はproteomics解析の結果とあいまって極めて興味深い事実である。

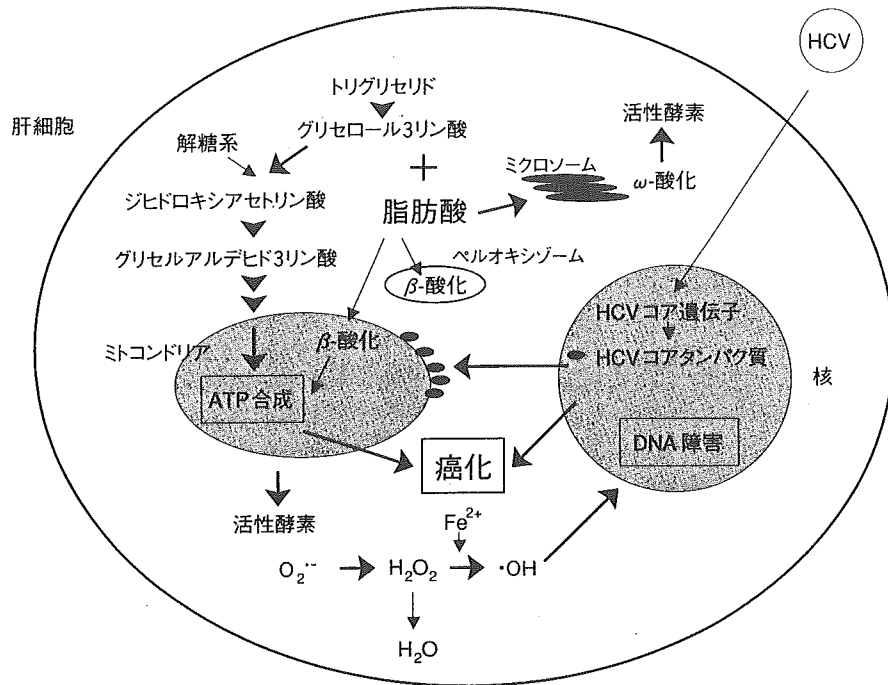


図3 予想されるC型HCCの分子病態 (文献18より)

HCVコアのミトコンドリア障害の結果として酸化ストレスが生成され、これが核DNAを傷害すること。また、プロテオミクス解析の結果、6炭糖、5炭糖の利用が低下し、トリグリセリドからグリセロール3リン酸を介したエネルギー代謝の存在が予想される。C型肝炎にはsteatosisが特徴的でもあり、このような代謝異常はNASHの病態進展を考えるうえでも興味深い。

### 3. 糖代謝関連タンパクの異常

解糖系酵素である phosphoglycerate mutase 1 (PGM1), triosephosphate isomerase (TPI) と ATP synthase  $\beta$  chain の増強は三炭糖代謝の賦活と ATP 合成の亢進が示唆される。しかも、aldolase B や Ketohexokinase の減弱は正常肝細胞とは異なり6炭糖、5炭糖の利用低下を意味しており、したがって、トリグリセリドの加水分解で生じるグリセロール3リン酸からジヒドロキシアセトンリン酸を介してグリセルアルデヒド3リン酸が供給されることと同時に、遊離の脂肪酸がエネルギー源として利用されることを示唆している(図2)<sup>18)</sup>。いずれにしても、C型HCCの発生過程で脂肪酸代謝や糖代謝の異常が生じていることがproteomics解析から予想される。

### 4. glutamin synthetase (GS) の増強

GSの発現増強は特に高分化型HCCにおいて観察されている。したがって、GSの増強は肝発癌におけるearly eventである可能性が高い。肝細胞の増殖機構にはMAPkinase系が賦活されているが、GS遺伝子がWnt/ $\beta$ -カテニン系の標的遺伝子であることが報告されており<sup>19,20)</sup>、発癌機序を考えるうえで興味深い。

以上の考察から中村はC型HCCの分子病態を図3のように考えている<sup>18)</sup>。HCV感染が生じ、慢性肝炎の成立まで15年、そこから肝硬変の成立まで10年、そして発癌まで5年、すなわち、平均30年の自然史の過程で酸化ストレスによる肝細胞DNA障害により遺伝子異常が生じ、糖代謝、脂肪酸代謝、アミノ酸代謝なども変化し図のような分子病態が成立するのではなかろうか。C型肝炎

炎からの肝発癌の機序を探る場合、そこには慢性炎症が存在することから発癌機序の解析を複雑なものにしている可能性が高い。案外、NASH (non-alcoholic steatohepatitis) の分子病態解明からC型HCCの発癌機序を探るのも面白いかも知れない。

### おわりに

C型肝炎からの発癌機序についてわれわれのグループの共同研究の成果をふまえて考察した。genomicsからpostgenomicsとしてのproteomicsならびにglycomicsの時代に入り、翻訳後の表現型から細胞内に生じたイベントを探ることが可能となってきている。今後の進歩に期待したい。

### 文 献

- 1) Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K et al : Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 27 : 1394-1402, 1998
- 2) Ikeda K, Satoh S, Arase Y et al : Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis C: a long-term observation study of 1643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology* 29 : 1124-1130, 1999
- 3) Okaoue T, Itoh Y, Minami M et al : Interferon therapy lowers the rate of progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C but not significantly in an advanced stage; a retrospective study of 1146 patients. *J Hepatol* 30 : 653-659, 1999
- 4) Hino K, Kitase A, Satoh Y et al : Interferon retreatment reduces or delays the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis. *J Viral Hepatitis* 9 : 370-376, 2002
- 5) Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama S et al : Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: National surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. *Ann Intern Med* 131 : 174-181, 1999
- 6) Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M et al : Histologic improvement of fibrosis in patients with C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 132 : 517-524, 2000
- 7) Yoshiji H, Nakae D, Mizumoto Y et al : Inhibitory effect of dietary iron deficiency on inductions of putative preneoplastic lesions as well as 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and lipid peroxidation in the livers of rats caused by exposure to a choline-deficient L-amino acid defined diet. *Carcinogenesis* 13 : 1227-1233, 1992
- 8) Sakaida I, Matsumura Y, Akiyama S et al : Herbal medicine, Shosaiko-to (TJ-9) prevents liver fibrosis and enzyme altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid defined diet. *J Hepatol* 29 : 298-306, 1998
- 9) Kitase A, Hino K, Furutani T et al : In situ detection of oxidized n-3 polyunsaturated fatty acids in chronic hepatitis C: correlation with hepatic steatosis. *J Gastroenterol* 40 : 617-624, 2005
- 10) Okuda M, Li K, Beard M et al : Mitochondrial injury, oxidative stress and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122 : 366-375, 2002
- 11) Kusano N, Shiraishi K, Kubo K et al : Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization in hepatocellular carcinomas: Their relationship to clinicopathological features. *Hepatology* 29 : 1858-1862, 1999
- 12) Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H et al : Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. *Cancer Res* 62 : 3939-3944, 2002
- 13) Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H et al : Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet* 361 : 923-929, 2003
- 14) Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M et al : Proteomics profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected hepatitis C virus. *Proteomics* 4 : 2111-2116, 2004
- 15) Kuramitsu Y, Nakamura K : Current progress in proteomic study of hepatitis C virus-related human hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Proteomics* 2 : 589-601, 2005
- 16) Hayashi H, Takikawa T, Nishimura N et al : Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic active hepatitis C and excess hepatic iron. *Am J Gastroenterol* 89 : 986-988, 1998
- 17) Kato J, Kobune M, Nakamura T et al : Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-de-



- oxuguanosne levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res* 61 : 8697-8702, 2001
- 18) 中村和行：プロテオミクスでみえてくる肝細胞癌の分子病態. *実験医学* 23 : 1072-1077, 2005
- 19) Cadoret A, Ovejero C, Terris B et al : New targets of beta-catenin signaling in the livers are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 21 : 8293-8301, 2002
- 20) Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M et al : Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 17216-17221, 2004

\*

\*

\*

## 2. B型肝炎硬変におけるラミブジン療法の発癌および予後に及ぼす効果についての検討

恩地 森一\* 松浦 可奈\* 平岡 淳\* 道堯浩二郎\*  
 廣岡 昌史\* 熊木 天児\* 日浅 陽一\* 堀池 典生\*

### はじめに

B型肝炎ウイルス (HBV) による肝硬変症例 (LC-B) の予後を左右する因子として、肝細胞癌 (HCC) の合併と肝不全があげられる。B型肝炎硬変における肝細胞癌合併率は年率4.4%/年/人、代償性肝硬変における腹水の出現率、黄疸の出現率はそれぞれ3.9%/年/人、3.2%/年/人と報告されている<sup>1)</sup>。ラミブジンはHBV増殖を抑制することで肝炎の活動性の改善が期待できる薬物であり、肝硬変例においても長期投与で肝予備能が改善されることが報告されている<sup>2,3)</sup>。しかし、HCC合併肝硬変の予後に及ぼす効果を調べた報告はなく、また肝発癌に及ぼす影響についてのコンセンサスもない。そこで筆者らは肝硬変に対するラミブジンの影響を肝発癌ならびに担癌例の長期予後の面から検討した。

### I. 対象と方法

対象は1990～2004年の間に肝硬変と診断されたLC-B患者99名 (男:67名, 女:22名, 平均年齢52.7歳) である。Child分類ではA:34例, B:26例, C:39例であった。観察開始時非担癌例80例 (L群20例, non-L群60例) でその発癌率について検討した。また観察開始時担癌例は19例 (ラミブジン投与群:L群7例, ラミブジン非投与群:

non-L群12例) で、HCC治療の可否、生存率について検討した。ラミブジンは100 mg/日を観察期間中連日投与。観察開始時 TNM stage IVのHCCを合併した症例は除外した。平均観察期間は60.2カ月である。HBV-DNAはTMA法、ラミブジン耐性株はPCR-ELMA法により測定した。

### II. 成績

#### 1. 非担癌例における発癌率

観察開始時非担癌例80例の発癌はL群で3名 (15.0%), non L群で11名 (18.3%) であった。累積発癌率は両群で有意な差はみられなかったものの、年発癌率はL群で4%/年/人, non L群で13%/年/人であった。臨床像では発癌群が非発癌群に比べてHBV-DNA量が優位に高かった (表1)。

#### 2. 担癌例の予後

観察時すでにHCCを合併していた19例の背景因子を表2に示した。L群はT-BilとALTが高い例が多く、肝予備能の悪い例、Child-Pugh scoreの高い例が多かった。発見時のHCC患者のChild-Pugh score, 腫瘍因子を表3に示した。HCCのstaging, 腫瘍径には差がみられなかった。ラミブジン開始後1年でChild-Pugh score, T.Bil, 腹水は有意に改善がみられ、ALTについても半年の内服でnon-L群に比べ改善がみられた (表4)。このためL群にはラミブジン内服後肝予備能が改善し、根治術可能になった例が2例存在し、治療断念例はなかった。一方、non-L群には肝予備能

\*愛媛大学医学部第3内科

表1 発癌例と非発癌例の比較

	発癌群 (n=14)	非発癌群 (n=66)	
性差	12 : 2	43 : 23	NS
年齢	49.0 ± 7.4	51.2 ± 14.4	NS
Child-Pugh score	8.1 ± 3.2	8.6 ± 2.6	NS
albumin	3.4 ± 0.7	3.3 ± 0.7	NS
PT	62.4 ± 24.6	58.1 ± 21.0	NS
T-Bil	3.1 ± 1.4	3.5 ± 3.3	NS
ALT	60.3 ± 34.3	100.8 ± 185.5	NS
Plt	10.2 ± 6.9	9.6 ± 4.1	NS
HBe Ag 陽性例	4	27	NS
HBV-DNA	8.1 ± 0.8	6.5 ± 1.3	NS
ラミブジン内服の有無	3	19	NS
観察期間 発癌までの期間	35.5 ± 6.0	71.2 ± 214.2	NS

表2 観察開始時HCC合併症例の背景因子

	L群 (n=7)	non-L群 (n=12)	
性差	5 : 2	7 : 5	NS
年齢	65.0 ± 9.8	59.0 ± 6.0	NS
Child-Pugh score	9.8 ± 2.6	7.8 ± 2.2	NS
albumin	2.9 ± 0.8	3.3 ± 0.6	NS
PT	55.4 ± 16.3	61.2 ± 19.7	NS
T-Bil	3.7 ± 3.0	1.2 ± 0.5	P=0.01
ALT	70.4 ± 16.6	46.8 ± 23.5	P=0.02
Plt	9.0 ± 3.2	11.7 ± 5.3	NS
HBe Ag 陽性例	2	4	NS
HBV-DNA	6.1 ± 0.8	5.2 ± 1.1	NS

表3 観察開始時HCC合併患者の背景

	L群	non-L群
Child A 症例	1	5
Child B 症例	2	3
Child C 症例	4	4
TNM分類 (I:II:III)	1:3:3	2:6:4
平均腫瘍径 (mm)	25.2 ± 5.7	29.1 ± 6.0

表4 観察1年後の臨床データの推移

	L群 (n=7)	non-L群 (n=12)	
Δ CPS	-2.2 ± 1.8	-0.1 ± 1.1	P=0.02
Δ アルブミン	0.3 ± 0.5	0 ± 0.5	NS
Δ PT	14.9 ± 11.2	5.2 ± 9.3	NS (P=0.08)
Δ T-Bil	-2.2 ± 3.2	0.3 ± 0.5	P=0.01
腹水の改善例	4/5	1/7	P=0.02
Δ ALT	-35.3 ± 18.4	-11.8 ± 21.1	P=0.02

悪化のために治療断念した例が6例存在した。L群は全例が治療可能であったのに対し、non-L群は12例中6例という結果であった(表5)。肝臓癌例における生存率の差は有意でないもの

の、Child B, C症例に限るとL群の方が優位に生存率が高かった(図1)。またラミブジン投与中にHCCを合併した症例においてラミブジン投与前のChild-Pugh scoreは11.6 ± 2.8点であったが、

表5 観察開始時HCC合併症例における治療の成否

	L群 (n=7)	non-L群 (n=12)	
治療可能例合計	7	6	P=0.04
〔根治術施行可能〕	3	1	NS
〔繰り返し加療可能〕	4	5	NS
加療断念	0	6	P=0.02
予後 (生存:死亡)	6:1	5:7	NS (P=0.06)
観察期間	25.2 ± 15.4	49.9 ± 58.3	NS

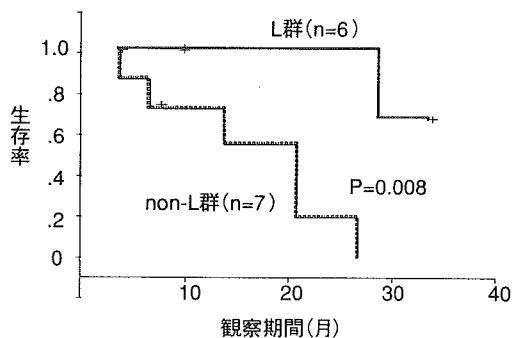


図1 観察開始時HCC合併症例におけるChild B, C症例の生存率

HCC診断時は $9.3 \pm 1.5$ に改善しており全例治療が可能であった。一方、観察中にHCCを合併したnon-L群では開始時とHCC発生時のChild-Pugh scoreはそれぞれ $7.0 \pm 2.3$ ,  $6.6 \pm 2.9$ であり、治療可能であったのは6例であった。

### 3. Breakthrough肝炎

全体のラミブジン投与例27例においてYMDD領域の耐性株は13例に出現し、4例でbreakthrough肝炎がみられた。全例にアデフォビルを併用し、2例では肝機能が改善したが、死亡した2例は投与前のChild分類はBとCで、HBV-DNAは2例とも $8.4 \text{ LGE/ml}$ とウイルスの多い症例であった。

## Ⅲ. 考 察

B型慢性肝炎においてHCC発生の危険因子には年齢、男性、fibrosis (F2以上)、血小板数(15

万以下)、血清アルブミン(4 g/dl以下)、HBV-DNA量、ALTなどがあげられている<sup>4)</sup>。B型慢性肝炎、肝硬変に対する発癌抑制の試みとしてインターフェロンとラミブジンの報告がある。インターフェロンの使用により発癌率が低下するとの報告は散見される<sup>4,5)</sup>。しかし肝硬変例では血小板低下例が多く、インターフェロン使用が困難な例が多い。ラミブジンは血小板低下例でも安全に使用できた。今回の検討では症例数が少ないため有意差はないが(P=0.06)、年発癌率はL群で低かった。慢性肝疾患におけるラミブジンの発癌抑制効果に関して、Liawら<sup>6)</sup>はラミブジン内服群は3.9%の発癌率に対し、コントロール群は7.4%であったと報告し、Matsumotoら<sup>7)</sup>はラミブジン群は年率0.4%でコントロール群は1.8%と報告している。本研究の成績もこれらの報告を支持する結果であった。

HCCの治療は腫瘍側因子のみならず、肝予備能の因子も重要である。肝予備能の低さからHCCの治療を断念する例も少なくなく、HCCを伴ったB型肝炎患者の死亡率は高い。背景のLCの肝予備能が改善すれば治療の選択肢が増え、HCCの予後改善が期待できる。ラミブジンは非代償性肝硬変患者においてChild-Pugh scoreが改善することは多いが、担癌の非代償期肝硬変の予後をラミブジンが改善するか否かについての報告はない。今回の検討により担癌例においてもChild-Pugh scoreが改善することにより、治療可能となる例が有意に多く、Child分類Bならびに