

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 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小俣 政男

平成 19(2007)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」にあたって

肝細胞癌の増加は著しく、殊に新規発癌もさることながら、再発の症例が増えてきている現状であります。肝細胞癌の原因はウイルス性、特にその8割がC型肝炎ウイルスによる事例においては、既に多くの症例において発癌時に肝硬変の結節が存在し、その結節から新たな且つ、とめどもない再発が起こってきております。この要因の研究は極めて直接的に肝癌患者さんの予後を規定し、また臨床上、最も大きな問題であります。

本研究班においては、過去3年間、この再発の基礎的及び臨床的特長を明らかにし、再発抑止対策に取り組んでまいりました。そこで明らかにされた事実を報告書としてまとめ、今後の医療の現場及び国民の健康福祉の増進に寄与する事ができればと考えております。究極的には、肝細胞癌患者の5年生存率を70%にする手段が明らかになったと考えております。

平成19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. | 3 |
| | 東京大学医学部附属病院消化器内科 吉田晴彦、椎名秀一朗、建石良介 |
| 2. | 6 |
| | 東京大学医学部附属病院消化器内科 加藤直也、吉田英雄 |
| 3. | 9 |
| | 国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター 石橋大海 |
| 4. | 11 |
| | 東京医科歯科大学難治疾患研究所分子疫学分野 村松正明 |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 13 |
| 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：肝臓がん治療後再発には新規発癌と治療時微小癌残存の二つの機序があると考えられる。肝臓がん患者の予後改善には新規発癌の抑止と治療時癌残存の防止の両者が重要と考えられる。前者については発癌の基盤である炎症、線維化の改善が重要と考えられ、HCV に対するペグ IFN・リバビリン併用療法、HBV に対するラミブジン等逆転写阻害剤の効果が期待される。

分担研究者：

吉田晴彦：東京大学医学部附属病院消化器内科
講師
椎名秀一朗：東京大学医学部附属病院消化器内科
講師
加藤直也：東京大学医学部附属病院消化器内科
助手
吉田英雄：東京大学医学部附属病院消化器内科
助手
建石良介：東京大学医学部附属病院消化器内科
助手
石橋大海：国立病院機構長崎医療センター
臨床研究センター長
村松正明：東京医科歯科大学難治疾患研究所
分子疫学分野 教授

A. 研究目的

肝臓がんはわが国の癌死原因の第三位を占める疾患であり、その8割はC型肝炎ウイルス（HCV）、1割はB型肝炎ウイルス（HBV）感染に起因する。現在、HCV 新規感染は激減し、HBV キャリアも母子感染防止対策により若年層では激減した。しかし、既存感染者からの肝臓がんは当分の間続くと考えられる。HCV の発見により、肝臓がん高危険度群が明確化された。診断法の進歩と相俟って肝臓がんは早期発見されるようになった。また、ラジオ波焼灼療法の発展により、一部手術不適合症例でも根治的治療が可能となった。これらにより、肝臓がんの予後は著明に改善した。しかし、その5年生存率は現在 40%程度であり、決して十分とはいえない。

肝臓がんの長期予後改善を妨げている最大の原因は年率 20%に及ぶ治療後再発である。本研究では肝臓がん再発の機序を検討し、有効な対策を講じることにより、5年生存率を 70%まで向上させることを目的とする。

B. 研究方法

再発に関する生存時間解析は、個人情報保護法に則り、随時蓄積・更新されている臨床データベースを用いて行った。遺伝子解析はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき、各施設の倫理審査委員会等の承認のもとに施行され、検体採取前に文書でインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1. 再発に関する生存時間解析

分担研究者吉田・椎名・建石はラジオ波焼灼療法などにより画像的に根治、すなわち残存癌組織が検出できなくなった肝臓がん症例について、再発を含む予後解析を行った。今年度の主な成績は次のとおりである。

1-1. 腫瘍マーカーと予後

根治的治療を行った肝臓がん患者の5年間の累積再発率は 72%であり、無再発死亡率 11%と比べてもはるかに高く、予後における再発の重要性があらためて示された。治療後 AFP-L3 高値群では再発が特に多かった。

1-2. IFN 療法と肝臓がん治療後の予後

治療後 6年累積生存率は IFN 著効後発癌例で

93%、肝癌治療後 IFN 著効例で 88%ときわめて良好であった。

1-3. 肝癌再発後の予後

治療後 1 年間の再発率は初発肝癌では 16%、1 回目再発癌では 21%、2 回目以降の再発では 55% であり、再発を重ねた場合、短期間で再再発が増加した。

2. 遺伝子多型 (SNP) と肝癌再発

1-1. 分担研究者加藤・吉田は MDM2SNP309 と肝発癌との関連を示し、一連の研究で肝癌との関連を認めた遺伝子 SNP は計 6 となった。また、肝線維化進行と関連する 3 遺伝子 SNP を確認した。

1-2. 分担研究者石橋は HBV キャリアにおいて、IL-1 β SNP と肝線維化進行との関連を示した。分担研究者村松は BMP-7 の HCV 増殖抑制能を検討した。

D. 考察

前年度までに我々は肝癌患者の予後予測として、腫瘍因子および肝機能に基づく Tokyo Score を提唱した。治療後の 5 年生存率はスコア 0 点の場合 79%、1 点の場合 62%である。今年度の研究では IFN により HCV を持続陰性化し得た症例ではさらに良好な予後が期待できることを示した。HCV 関連肝癌では HCV 駆除により新規発癌が抑止される可能性があり、現在臨床試験を行っている。また、HBV 関連肝癌においても、lamivudine 等の抗ウイルス剤投与により同様の効果が得られる可能性があり、臨床研究を進めている。

一方、治療後 AFP-L3 が陽性の症例や再発を繰り返した症例では画像上根治が得られても短期間で治療後再発することが多かった。これらの症例では画像で捉えられない残存癌が存在したと考えられる。治療前に血管造影下 CT を行い、このような病変をあらかじめ検出して治療することにより予後を改善できる可能性があり、現在臨床試験を実施中である。

SNP の検討では肝発癌と関連する SNP および線維化進行と関連する SNP を同定したが、肝癌治療後再発との関連は統計的に明らかでなかった。今後、癌細胞における遺伝子変化を解析し、クロナリティーの検討および再発等に関連する遺伝子増幅、欠失などを検討する。

E. 結論

肝癌治療後再発には新規発癌と治療時微小癌残存の二つの機序があると考えられる。肝癌患者の予後改善には新規発癌の抑止と治療時癌残存の防止の両者が重要と考えられる。特に、前者に

ついては抗ウイルス療法が有効である可能性があり、臨床的検証が必要である。

F. 健康危険情報

分担研究報告書参照

G. 研究発表

論文発表 : 巻末に掲載

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

特許取得 : 分担研究報告書参照

実用新案登録 : 分担研究報告書参照

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

肝がん再発に影響を与える臨床要因に関する研究

| | | | |
|-------|-------|------------------|----|
| 分担研究者 | 吉田晴彦 | 東京大学医学部附属病院消化器内科 | 講師 |
| | 椎名秀一朗 | 東京大学医学部附属病院消化器内科 | 講師 |
| | 建石良介 | 東京大学医学部附属病院消化器内科 | 助手 |

研究要旨：当科で治療した約2000名の肝臓がん患者の臨床データを引き続き解析した。肝臓がんの治療後再発には腫瘍因子と背景肝因子が関わっていた。再発を2回以上繰り返している状態は腫瘍因子の極端な場合であり、3年間で約9割の患者に更なる再発を認めた。これらの多くは微小残存肝臓がんが増大したものと考えられる。一方、初発早期肝臓がんにおいても3年以降にも再発を認めたが、これらは新規発がんが主体だと考えられた。残存肝臓がんの防止には初回治療における診断能の向上、新規発がんの防止には抗肝炎ウイルス（HCV、HBV）療法の施行が有効と考えられ、現在臨床研究を実施している。

研究協力者：

赤松雅俊 東京大学消化器内科
山敷宣代 東京大学臓器移植医療部

A. 研究目的

本研究のコア施設の東京大学消化器内科では、過去15年間に約2000名の肝臓がん患者を治療し、治療法としては内科的局所療法であるエタノール注入療法（PEIT）を延べ1200回、同じくラジオ波焼灼療法（RFA）を延べ3200回行っている。これは世界的にも最大の規模だと考えられる。局所療法は外科的肝切除術に耐えない肝機能であっても施行可能である。特にRFAは腫瘍の局所制御にすぐれており、今では小肝臓がんに対する標準的治療法となった。以前と比べて肝臓がん患者の生命予後は明らかに改善している。しかし、「根治」した肝臓がん患者において、治療後長期間たった後でも肝臓がんの再発が多く、肝臓がんの長期的生命予後は現在でも良好とはいえない。

分担研究者らは昨年度までに、RFAとPEITの比較（Gastroenterology. 2005; 129: 122）を行うとともに、RFA施行肝臓がん患者の予後を解析し（Cancer. 2005; 103: 1201）、予後予測のためのスコアリングシステム（Tokyoスコア）を提唱した（Gut 2005; 54: 419）。局所治療後の5年生存率はスコア0群で78.7%、スコア1群で62.1%

であった。本研究の目的である、5年生存率70%を目指すためにはすべての患者をこのスコア0群に近づけること、すなわち腫瘍径2cm以下、3個以内での早期発見と肝機能の保持が重要であることを示してきた。

本年はこれらの臨床研究の継続として、治療前後の腫瘍マーカーの推移と予後の関連、C型肝臓がん患者におけるインターフェロン療法（IFN）の意義、および再発と予後の関連を解析した。

B. 研究方法

（倫理面への配慮）

東京大学消化器内科肝臓がんデータベースに登録されている肝臓がん患者について、生命予後および肝臓がん再発を含めて調査した。すべての登録および解析は個人情報保護法に則って行われた。CT下血管造影に関する臨床研究、肝臓がん治療後のIFN療法に関する臨床研究は東京大学医学部倫理委員会ないし同附属病院治験審査委員会による承認を得ており、文書によるインフォームドコンセントを得た上で行っている。

C. 研究結果

①腫瘍マーカーと予後の関連

当科で局所療法により画像的に根治した肝臓がん患者416名を対象として、治療前後の腫瘍マーカー（AFP、AFP-L3、DCP）の推移と予後の関係を解析した。5年累積再発率は72%であり、競合イベ

ントである無再発死亡率 11%と比べてはるかに高率であった。再発寄与因子として治療前 AFP または AFP-L3 の高値、治療後の AFP または AFP-L3 の高値が有意であり、特に治療後に AFP-L3 が高値の症例では短期間での再発が必至であった (Hepatology 2006; 44: 1518)。

②IFN 療法と肝癌の予後

局所療法を施行した C 型肝癌患者を対象に、発癌前に IFN を受けた 191 名 (SVR15 名)、癌治療後に IFN を受けた 53 名 (HCV 持続陰性化=SVR17 名)、IFN を受けていない 399 名の予後を比較した。6 年生存率は SVR 後肝癌で 93.3% (死亡リスク比 0.124)、癌治療後 SVR で 87.5% (同 0.388)、非 IFN で 53.2% (基準) であり、HCV 駆除が生存を改善することが示された。 (Liver Int 2006; 26: 536)。

③肝癌再発と予後

局所療法を受けた肝癌患者を初発 207 名、1 回目の再発 100 名、2 回目以降の再発 69 名に分け、画像的根治後の再発時間を解析した。1 年後の累積再発率は初発癌治療後で 15.6% (基準)、1 回目再発治療後で 21.2% (再発リスク比 1.46)、2 回目再発治療後で 55.0% (同 3.01) であった。また、3 年間の累積再発率は各々 56.1%、67.0%、87.7% (J Gastroenterol Hepatol in press)。

D. 考察

肝癌治療後の腫瘍マーカー陽性群、とくに AFP-L3 陽性群において肝癌再発率が高かったことは、画像的に根治であっても肝癌が残存していることを強く示唆する。肝移植を前提とする場合を除いて、肝癌では画像的に確認された病変のみが治療されることになる。2 回目以降の再発肝癌に対する治療後の再発率が高いことも、そのような場合に画像で描出されない残存病変が多いことを示唆している。病変検出能を向上することによって残存病変を減らし、予後を改善することが可能か否かを検討するために我々は CT 下血管造影に関する RCT を実施中である。

2 回目以降の再発癌に対する治療では 3 年間で 9 割が新たな再発を生じた。これらの多くが治療時残存癌によるものだとすると、逆に 3 年以上経過して生じた再発は残存癌ではなく新規発癌である可能性が高いと推測できる。初発肝癌の根治治療後においても 3 年以上経過して生じる遅発再発は少なくないが、これらに対しては初発癌抑止と同様の対策、C 型であれば IFN による HCV 排除が有効であると考えられる。今回の検討でも肝癌治療後の IFN 療法において、SVR 症例の生命予後が改善していることを示した。ただし、SVR 症例は少なく再発に関する十分な解析は行えなかつ

た。著効率の向上したペグ IFN+リバビリン併用療法を用いてあらたな臨床研究を開始した。

HBV 関連肝癌に関しても、近年開発の続いている RNA 依存 DNA ポリメラーゼ阻害剤が生存、再発に関して有効である可能性があり、臨床研究を予定している。

E. 結論

肝癌の治療後再発には腫瘍因子と背景肝因子が関わっていた。再発を 2 回以上繰り返している状態は腫瘍因子の極端な場合であり、3 年間で約 9 割の患者に更なる再発を認めた。これらの多くは微小残存肝癌が増大したものと考えられる。一方、初発早期肝癌においても 3 年以上経過にも再発を認めたが、これらは新規発癌が主体だと考えられた。残存肝癌の防止には初回治療における診断能の向上、新規発癌の防止には抗肝炎ウイルス (HCV、HBV) 療法の施行が有効と考えられ、現在臨床研究を実施中である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Akamatsu M, Yoshida H, Shiina S, Teratani T, Obi S, Tateishi R, Mine N, Kondo Y, Kawabe T, Omata M. Sustained viral response prolonged survival of patients with C-viral hepatocellular carcinoma. Liver Int 2006; 26: 536-542.

Obi S, Yoshida H, Toune R, Unuma T, Kanda M, Sato S, Tateishi R, Teratani T, Shiina S, Omata M. Combination therapy of intraarterial 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with portal venous invasion. Cancer 2006; 106: 1990-7.

Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, Teratani T, Obi S, Yamashiki N, Yoshida H, Akamatsu M, Kawabe T, Omata M. Prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma after curative ablation using three tumor markers. Hepatology. 2006;44:1518-27.

Yamashiki N, Yoshida H, Tateishi R, Shiina S, Teratani T, Yoshida H, Kondo Y, Ohki T, Kawabe T, Omata M. Recurrent hepatocellular carcinoma has an increased risk of subsequent recurrence after curative treatment. J Gastroenterol Hepatol in press

Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Nojiri K, Omata M, Makuuchi M. Selection of

liver-transplant candidates for adult-to-adult living donor liver transplantation as the only surgical option for end-stage liver disease. Liver Transpl 2006; 12: 1077-83.

Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. Step-wise progression of fibrosis toward hepatocellular carcinoma and its resolution. In:Schinazi RF, Schiff ER, eds. Framing the Knowledge of Therapeutics for Viral Hepatitis. Georgia:IHL Press. 2006: 29-40.

学会発表

Akamatsu M, Yoshida H, Shiina S, Ooki S, Kondo Y, Mine M, Masuzaki M, Imamura J, Yoshida H, Tateishi R, Kawabe T, Omata M: Hepatocellular carcinoma in sustained virologic responders to previous therapy is associated with excellent prognosis. Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006.5

Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, Teratani T, Obi S, Yamashiki N, Yoshida H, Akamatsu M, Kawabe T, Omata M: Prediction of Recurrence of Hepatocellular Carcinoma After Curative Ablation by Three Tumor Markers. American Association for the Study of the Liver, Boston, 2006.10

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

肝がん再発に影響を与える遺伝的要因に関する研究

分担研究者 加藤直也 東京大学医学部附属病院消化器内科 助手
吉田英雄 東京大学医学部附属病院消化器内科 助手

研究要旨：前年度に引き続き肝発癌と関連する SNP の解析を続け、MDM2 の SNP309 と発癌との関連を確認して有意な SNP は計 6 個となった。また C 型慢性肝炎における肝線維化の進行と TLR3、2, 5-AS、IRF7 の SNP との関連を確認した。ただし、これらの SNP と肝癌再発との明らかな関連は示されなかった。今後、癌細胞における遺伝子変化（増幅、欠失、LOH）の網羅的解析と癌結節クロナリティーの検討が必要であり、臨床検体を用いた予備的検討を行った。

研究協力者：

田中康雄 東京大学臨床薬効評価学講座

A. 研究目的

肝癌に対する早期診断能および根治的治療法の向上により肝癌患者の予後は改善し、5 年生存率は 40% 前後となっているが、年率 15-20% にも及ぶ治療後再発が更なる予後改善を阻んでいる。本研究では再発要因として、従来の臨床・病理的パラメーターに加えて遺伝的背景を解析するために遺伝子解析を行った。

分担研究者らは肝細胞癌と関連する遺伝子多型として IL-1 β （オッズ比 2.3）および UGT1A7（2.7）（Clin Cancer Res. 2004; 10: 2441）の SNP を報告した。また前年度には細胞増殖等に関連する 171 遺伝子上の計 393 ケ所の SNP について網羅的解析を行い、肝癌と関連する SNP として GFRA1（2.1）、GRHR2（5.7）、SCYB14（2.4）を報告した（Hepatology. 2005; 42: 846）。本年度は発癌との関連が報告された MDM2 の SNP309 について肝癌の発癌、再発との関連を検討した。

また、我々は肝細胞における種々のタンパク発現と線維化進行度の関連（World J Gastroenterol 2005; 11: 1995）、肝癌治療前後の血清中諸タンパクの変化（Proteomics. 2005; 5: 4287）など、SNP に代表される先天的遺伝因子以外の分子生物

学的背景にも注目してきたが、本年度は HBV が産生する HBx の細胞内伝達系への影響および肝癌細胞における p110 の変異について調べた。

B. 研究方法

（倫理面への配慮）

患者 SNP の解析にあたっては東京大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会にて承認されたプロトコールに従い、文書によるインフォームドコンセントを得た上で検体（末梢血白血球）を採取し、匿名化した後に解析した。

C. 研究結果

①MDM2SNP309 と肝癌との関連

187 名の肝癌患者と 248 名の対照における解析により、SNP309 の T/T と比べて T/G はオッズ比 1.62、G/G はオッズ比 2.28 でより強く肝癌と関連していた（Clin Cancer Res 2006; 12: 4867）。SNP309 は MDM2 遺伝子のプロモーター領域にあり、T→G 変異は転写因子 Sp1 との結合を強め、MDM2mRNA の増加により p53 の分解を促進している可能性が考えられた。

なお、その他に TLR3（toll-like receptor 3）、2, 5-AS（2, 5-oligoadenylate synthetase）および IRF7 の SNP が慢性 C 型肝炎における線維化の進行と肝硬変に関連していることを示した。これらは生体の抗ウイルス反応に重要な働きをする遺伝子であり、C 型肝炎の病態を考える上できわめて興味深い。今回、肝発癌との直接の関連

は認められなかった。

②HBx 標的分子の解析

HBV の X 遺伝子がコードする HBx タンパクは肝発癌との関連が議論されているが細胞内での働きは明らかでなかった。標的分子を網羅的に同定するため、myc、flag 複合体型タグ付き HBx を用いて結合するタンパクを免疫沈降法により収集、SDS-PAGE で分離した後タンデム MS 法により同定した。得られた HBx 結合タンパクの一つに COP9 signalosome (CSN) があり、これは Jab1 をサブユニットの一つとする複合体である。機能解析の結果、HBx と Jab1 は相乗的に AP-1 活性化を増強し、また免疫染色により細胞質に共局在することが示された (Oncogene 2006; 25: 633)。HBV 関連肝癌の発癌機序との関連で注目される。

③肝癌細胞における p110 変異

p110 は phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) シグナル伝達系に関与するタンパクであり、最初は大腸癌において活性型への変異が報告され、続いて肝癌においても変異も報告された。直接シーケンシング法により本邦の肝細胞癌 47 検体を検索したが、変異は 1 例もみられなかった。内 13 例には別波形の混入がみられ解析の結果 22q11.2 領域に存在する偽遺伝子に由来することが判明した (Oncogene 2006; 25: 2950)。

D. 考察

本年度までに計 6 個の遺伝子 (IL-1 β 、UGT1A7、GFR1、CRHR2、SCYB14、MDM2) 上の SNP が肝発癌と関連することを報告した。ただし、肝癌再発との有意な関連は示されなかった。また、前年度に肝癌治療後再発との関連を報告した MMP1 および LT4AH についても、その後の解析によりその臨床的意義については再検討が必要であることが判明した。

臨床データの解析によると、肝癌の治療後再発には早期に生じる微小残存癌の増大によるものと、後期まで引き続き生じる新規発癌によるものとの 2 種類があると考えられる。後者については初回発癌に関与する遺伝因子が同様に寄与すると予想されるが、従来の方法で前者と後者の再発を区別することは困難であり、両者を合わせて検討した結果、統計的有意差を検出できなかった可能性がある。

今後の研究方針としては、まず、肝癌細胞における somatic な遺伝子変異、すなわち増幅や欠失などの遺伝子コピー数の異常、およびヘテロ接合性の消失 (LOH) などを GeneChip などを用いて網羅的に検索することを検討している。これにより、一つには同一患者に異時的に出現した癌結節のクロナリティーを検討し、残存癌再発と新規発癌

とを客観的に区別できる可能性がある。また、残存癌再発のリスクと癌細胞における遺伝子変異との関連も検討する予定である。実際に、肝癌臨床検体を用いて高度遺伝子増幅領域の解析を開始し、大腸癌とパターンが異なることを確認している。

E. 結論

肝発癌と MDM2SNP との関連を確認した。また C 型慢性肝炎における肝線維化の進行と TLR3、2, 5-AS、IRF7 の SNP との関連を確認した。ただし、肝癌再発との明らかな関連は示されなかった。今後、癌細胞における遺伝子変化の網羅的解析が必要と考え、予備的検討を行った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表:

Dharel N, Kato N, Muroyama R, Moriyama M, Shao RX, Kawabe T, Omata M. MDM2 promoter SNP309 is associated with the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. Clin Cancer Res 2006; 12: 4867-71.

Tanaka Y, Kanai F, Ichimura T, Tateishi K, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, Ohta M, Imamura J, Ikenoue T, Ijichi H, Kawabe T, Isobe T, Omata M. The hepatitis B virus X protein enhances AP-1 activation through interaction with Jab1. Oncogene 2006; 25: 633-42.

Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, Ohta M, Ikenoue T, Tateishi K, Obi S, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M. Absence of PIK3CA hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. Oncogene 2006; 25: 2950-2.

学会発表:

Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, Ohta M, Ikenoue T, Tateishi K, Obi S, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M: Absence of PIK3CA hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. 97th Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Washington, DC, 2006.4.

Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, Ohta M, Ikenoue T, Tateishi K, Obi S, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M: Absence of PIK3CA hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients - the effect of PIK3CA pseudogene on mutational analysis. Digestive Disease Week 2006, Los Angeles, 2006.5

Kato N, Li Q, Dharel N, Shao RX, Muroyama R, Chang JH, Kawabe T, Omata M: Association of Toll-like receptor 3 gene polymorphism with inflammatory activity and platelet count in chronic hepatitis C. American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, 2006.10

田中康雄、金井文彦、小俣政男：複合体型タグシステムと質量分析を用いた HBx 標的分子の網羅的解析 第 92 回日本消化器病学会総会 2006 年 4 月

Dharel Narayan、加藤直也、室山良介、森山 優、邵 潤軒、川邊隆夫、小俣政男：MDM2 プロモーター-SNP309 は C 型肝炎患者における肝細胞癌の発生と関連する 第 42 回日本肝臓学会総会 2006 年 5 月

田中康雄、金井文彦、小俣政男：高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた肝癌細胞株におけるゲノム異常の網羅的解析 第 42 回日本肝臓学会総会 2006 年 5 月

田中康雄、金井文彦、多田素久、浅岡良成、バヤスグラン、ジャザグアマラサナー、大田幹、池上恒雄、立石敬介、小尾俊太郎、川邊隆夫、横須賀收、小俣政男：肝癌における PIK3CA の遺伝子変異-偽遺伝子の存在と変異解析に与える影響 第 42 回日本肝臓学会総会 2006 年 5 月

田中康雄、金井文彦、多田素久、池上恒雄、小尾俊太郎、川邊隆夫、横須賀收、小俣政男：肝癌における PIK3CA の変異解析 第 17 回日本消化器癌発生学会総会 2006 年 9 月

加藤直也、李強、小俣政男 Toll-like レセプター-3 の C6300T (Leu412Phe) 多型は C 型肝炎における炎症・線維化と関連する 第 10 回日本肝臓学会大会 2006 年 10 月

加藤直也、小俣政男 C 型肝炎における病態と宿主遺伝子多様性の関連性に着いての検討 第 36 回日本肝臓学会東部会 2006 年 12 月

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

サイトカイン遺伝子多型とウイルス肝炎の進展について

分担研究者： 石橋大海 国立病院機構長崎医療センター臨床研究 センター長

研究要旨：HBV キャリアの肝病変の進展と、IL-1・プロモーター領域の遺伝子多型との関連を検討した。その結果、肝硬変症例では、非肝硬変症例に比べ、有意に IL-1・-31 T キャリア (T/T、T/C) が多いことが明らかとなり、HBV キャリアにおいて、IL-1・-31 T キャリアと肝線維化進展との関連が示唆された。C 型肝炎症例についても検討したが、症例数が少ないこともあり、IL-1・-31 遺伝子多型と線維化との関連は証明できなかった。

共同研究者：

右田清志 長崎医療センター臨床研究センター
濱田久之 長崎医療センター臨床研究センター
小森敦正 長崎医療センター臨床研究センター
矢野公士 長崎医療センター臨床研究センター
八橋 弘 長崎医療センター臨床研究センター

A. 研究目的

肝細胞癌の臨床的再発には局所再発と異所性再発があり、異所性再発には、既に存在していた癌が画像で捉えることができるまで増大したものと新規に発生する癌とがある。肝細胞癌の特徴は、既に存在していた可能性のある癌の増大とともに、異所性に新規に発生する癌が存在することである。この異所性新規癌の発生は、初発癌と同じように肝線維化の進展度が大きな要因となる。

ウイルス性肝炎の進展にはウイルス側の要因に加え宿主要因も関係しており、ウイルス肝炎の炎症、線維化の進展にはサイトカインの関連が示唆されている。さらに、サイトカイン産生の個体差にはサイトカイン遺伝子のプロモーター領域の遺伝子多型が大きく影響する。

今回、肝炎・肝線維化の進展との関連が示唆されている IL-1・遺伝子のプロモーター領域の遺伝子多型について、異所性新規癌の発生の大きな要因としての観点からウイルス性肝炎

の進展との関連について検討した。

B. 研究方法

対象：

1. インフォームドコンセントが得られた HBV キャリア 237 名（無症候性キャリア 65 名、慢性肝炎 58 名、肝硬変 65 名、肝細胞癌合併例 49 名）。
2. インフォームドコンセントが得られた C 型肝炎症例で、感染時期が特定され感染から 30 年以上経過し、肝生検にて肝線維化を評価した C 型肝炎症例 99 名（F0/F1=30、F2=21、F3/4=48）。

方法：

IL-1・のプロモーター領域（-31）遺伝子多型は、PCR-RFLP 法で解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は長崎医療センターの倫理審査委員会の承認のもと施行され、検体を採取する前に、書面でインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1. HBV キャリアにおいて、IL-1・-31 T キャリア (T/T、T/C) は、non-LC 群 (n=129) で 72.1%、

LC 群 (n=108) で 86.1%と有意に LC 群で高かった。また肝生検症例において、T キャリアの比率は F0-F2 群 (n=28) 71.4%、F3-F4 群 (n=51) 88.2%と線維化が進行した群で多い傾向にあった。

2. C 型肝炎症例において IL-1・-31 T キャリアは、F0-F2 群 (n=51) 72.5%、F3-F4 群 (n=48) 85.4%と線維化が進行した症例で高い傾向にあった。

D. 考察

炎症性サイトカインである IL-1・は、肝星細胞を活性化することで肝線維化に関与しており、最近の知見では血管新生、発癌を誘導する PGE₂ 合成酵素である COX-2、mPGES- I の発現を誘導することも明らかにされている。今回の検討において、HBV キャリアにおいて、IL-1・-31T キャリアと肝線維化との関連が明らかになった。C 型肝炎の検討において、HCC 合併と IL-1・-31 T/T genotype の関連が既に明らかになっており、HCC 合併 B 型肝炎患者でも同様の結果が報告されている。今回、対象とした HBV キャリアには、HCC 症例が少なく、統計学的に有意差は認めなかったが、HCC 合併 HBV キャリアにおいて IL-1・-31 T キャリアは多い傾向にあった。今後、IL-1・-31 遺伝子多型と HBV キャリアの発癌についても症例を蓄積し、明らかにする必要がある。

C 型肝炎症例においては、症例数が少ないこともあり、IL-1・-31 遺伝子多型と線維化との関連は証明できなかったが、今後、発癌を含め検討する予定である。

E. 結論

HBV キャリアにおいて、IL-1・-31 T キャリア (T/T、T/C) は肝線維化のリスクファクターの 1 つと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) Migita K, Abiru S, Maeda Y, Daikoku M, Ohata K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Serum levels of interleukin-6 and its soluble receptors in patients with hepatitis C virus infection. *Hum Immunol.* 2006;67(1-2):27-32.

2) Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Miyazoe S, Nakao K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Polymorphisms of interleukin-1beta in Japanese patients with hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2007;46:381-386.

学会発表

なし

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 東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授

研究要旨：HCV 感染症はインターフェロン製剤の進歩によりその治療成績が向上したが、本邦では感染者の高齢化が進んでおり、ウイルス増殖を抑制するより有効で安全な治療法の開発が急務である。bone morphogenetic protein (BMP)-7 は TGF β スーパーファミリーに属するサイトカインで、細胞増殖制御、細胞分化誘導作用等が報告されており、整形外科領域での局部投与薬として臨床治験も行われている。今回我々は BMP-7 が *in vitro* において HCV 増殖抑制効果を示し、interferon- α (IFN) との併用により強い相乗的な抗ウイルス効果を認めた。

A. 研究目的

HCV 感染症はインターフェロン製剤の進歩によりその治療成績が向上したが、本邦では感染者の高齢化が進んでおり、ウイルス増殖を抑制するより有効で安全な治療法の開発が急務である。昨年度、TGF- β が HCV ウイルス増殖を *in vitro* で抑制することを見出し、報告した。本研究では TGF- β スーパーファミリーのひとつである BMP7 が HCV ウイルス抑制効果があるかどうかを検討することを目的とする。

B. 研究方法

HCV-Feo replicon 発現細胞 (genotype 1b/2a)、および HCV-JFH1 ウイルス感染細胞を使用した。培地に 50-200 ng/ml の BMP-7 を添加し、replicon 増殖レベルをルシフェラーゼ測定により定量的に検出した。また western blotting によりウイルス蛋白発現を検出した。培養上清の HCV 抗原測定によりウイルス粒子排出を定量した。ISRE-luciferase レポーターアッセイ、および IFN 誘導遺伝子である 250AS、MxA mRNA 定量により薬剤添加による Jak/STAT 系・インターフェロン誘導遺伝子の発現レベルを解析した。FACS により BMP-7 による細胞周期 profile の影響を解析した。HCV 増殖系に BMP-7 および IFN を種々の濃度の組み合わせで

添加し、薬剤相互作用を isobologram にて解析した。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

BMP7 は濃度依存性に HCV replicon および HCV 感染系の弱い抑制作用を示した (IC₅₀ = 200 ng/ml)。BMP-7 添加培養細胞では明らかな増殖速度の変化を認めなかったが G2/S 期に比して G1 期の細胞が増加しており、細胞周期に影響を及ぼすことが示された。一方、Interferon と低濃度の BMP-7 を HCV replicon 細胞に併用添加すると、HCV replicon 増殖を相乗的に抑制した。HCV ウイルス培養系においても replicon 同様 HCV 増殖抑制効果、IFN との相乗効果が確認された。BMP-7 は ISRE 活性上昇を起こさず、HCV 増殖抑制機構は IFN とは独立した経路を介すると考えられたが、IFN と BMP-7 の併用添加培養により IFN による ISRE 活性化、250AS、MxA の発現誘導を有意に増強した。

D. 考察

BMP-7 は HCV 増殖を抑制し、IFN との併用により抗ウイルス効果を相乗的に増強した。BMP-7 の抗ウイルス機構を解析し、*in-vivo* 感

染モデルを用いた効果の確認・安全性の検証により、HCV 治療に対して有効な治療薬となる可能性が考えられた。

E. 結論

BMP-7 の HCV 増殖抑制作用を持つ。BMP-7 がすでに治療薬として臨床研究段階に入っているに入っている事から、インターフェロンの新しい併用療法となる可能性がある

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Kimura T, Saito T, Yoshimura M, Song Y, Baba M, Ji G, Muramatsu M, Kawata S. Association of Transforming Growth Factor- β 1 Functional Polymorphisms with Natural Clearance of Hepatitis C Virus. J Infect Dis. 193:1371-1374, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特許取得：

BMP-7 を含む抗 C 型肝炎ウイルス剤

国際特許出願番号:PCT/JP2006/308051

国際公開番号:W02006/112441

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 |
|---|---|-------------------------|-----|-----------|------|
| Yamashiki N, Yoshida H, Tateishi R, Shiina S, Teratani T, Yoshida H, Kondo Y, Ohki T, Kawabe, T, Omata M. | Recurrent hepatocellular carcinoma has an increased risk of subsequent recurrence after curative treatment. | J Gastroenterol Hepatol | | in press | 2007 |
| Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Miyazoe S, Nakao K, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. | Polymorphisms of interleukin-1beta in Japanese patients with hepatitis B virus infection. | J Hepatol | 46 | 381-386 | 2007 |
| Akamatsu M, Yoshida H, Shiina S, Teratani T, Obi S, Tateishi R, Mine N, Kondo Y, Kawabe T, Omata M. | Pre- or post-tumor ablation interferon therapy prolongs the survival of patients with C viral-hepatocellular carcinoma. | Liver Int | 26 | 536-542 | 2006 |
| Dharel N, Kato N, Muroyama R, Moriyama M, Shao RX, Kawabe T, Omata M. | MDM2 promoter SNP309 is associated with the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. | Clin Cancer Res | 12 | 4867-4871 | 2006 |
| Kimura T, Saito T, Yoshimura M, Song Y, Baba M, Ji G, Muramatsu M, Kawata S. | Association of Transforming Growth Factor-β1 Functional Polymorphisms with Natural Clearance of Hepatitis C Virus. | J Infec Dis | 193 | 1371-1374 | 2006 |
| Migita K, Abiru S, Maeda Y, Daikoku M, Ohata K, Nakamura M, Komori A, Yano K, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. | Serum levels of interleukin-6 and its soluble receptors in patients with hepatitis C virus infection. | Hum Immunol | 67 | 27-32 | 2006 |
| Obi S, Yoshida H, Toune R, Unuma T, Kanda M, Sato S, Tateishi R, Teratani T, Shiina S, Omata M. | Combination therapy of intraarterial 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma with portal venous invasion. | Cancer | 106 | 1990-1997 | 2006 |
| Tanaka Y, Kanai F, Ichimura T, Tateishi K, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, Ohta M, Imamura J, Ikenoue T, Ijichi H, Kawabe T, Isobe T, Omata M. | The hepatitis B virus X protein enhances AP-1 activation through interaction with Jab1. | Oncogene | 25 | 633-642 | 2006 |
| Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Asaoka Y, Guleng B, Jazag A, Ohta M, Ikenoue T, Tateishi K, Obi S, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M. | Absence of PIK3CA hotspot mutations in hepatocellular carcinoma in Japanese patients. | Oncogene | 25 | 2950-2952 | 2006 |
| Tateishi R, Shiina S, Yoshida H, Teratani T, Obi S, Yamashiki N, Yoshida H, Akamatsu M, Kawabe T, Omata M. | Prediction of recurrence of hepatocellular carcinoma after curative ablation using three tumor markers. | Hepatology | 44 | 1518-1527 | 2006 |
| Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Nojiri K, Omata M, Makuuchi M. | Selection of liver-transplant candidates for adult-to-adult living donor liver transplantation as the only surgical option for end-stage liver disease. | Liver Transpl | 12 | 1077-1083 | 2006 |

| | | | | | |
|----------------------------------|---|---|--|-------|------|
| Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. | Step-wise progression of fibrosis toward hepatocellular carcinoma and its resolution. | Framing the Knowledge of Therapeutics for Viral Hepatitis In:Schinazi RF, Schiff ER, eds. | | 29-40 | 2006 |
|----------------------------------|---|---|--|-------|------|

Polymorphisms of interleukin-1 β in Japanese patients with hepatitis B virus infection

Kiyoshi Migita^{1,*}, Yumi Maeda¹, Seigo Abiru¹, Minoru Nakamura¹, Atsumasa Komori¹, Seiji Miyazoe², Kazuhiko Nakao², Hiroshi Yatsushashi¹, Katsumi Eguchi², Hiromi Ishibashi¹

¹Clinical Research Center, National Nagasaki Medical Center, Kubara 2-1001-1, Omura 856-8562, Japan

²First Department of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine, Sakamoto 1-7-1, Nagasaki 852-8501, Japan

Background/Aims: Hepatitis B virus (HBV) induces liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC) mainly by causing chronic necro-inflammatory hepatic disease. Our aim was to investigate the relationships between the polymorphisms of the interleukin-1B (*IL-1B*) promoter region and the interleukin-1 receptor antagonist gene (*IL-1RN*) and disease progression in an HBV-infected Japanese population.

Methods: Genomic DNA was extracted from the peripheral blood of 237 HBV carriers. Polymorphisms in *IL-1B* and *IL-1RN* were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and PCR with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) methods. These polymorphic sites include the promoter regions of *IL-1B* at positions –511 and –31, and *IL-1RN* variable tandem repeats.

Results: The *IL-1B* –31 and –511 loci were in complete linkage disequilibrium, and the frequency of the *IL-1B* –31 T carrier (*IL-1B* –31 T/T or T/C) was significantly higher in HBV carriers with LC compared to those without LC (LC; 86.1% vs non-LC; 72.1%, $P = 0.009$). There was no difference in the genotype distribution of the *IL-1RN* polymorphism.

Conclusions: This is the first report describing the association between *IL-1B* polymorphism and HBV-related hepatic fibrosis, and our data suggest that *IL-1B* polymorphisms may be related to disease progression of HBV-related hepatitis in Japan.

© 2006 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cytokines; Hepatitis B virus; Interleukin-1 β ; Liver cirrhosis; Polymorphism; Hepatic fibrosis

1. Background

Recent studies have emphasized that hepatic satellite cells (HSC) play an important role in the pathogenesis of hepatic fibrosis [1]. Following liver injury, HSC pro-

duce matrix metalloproteinase (MMPs) resulting in the development of hepatic fibrosis [2]. IL-1 has been implicated in the regulation of MMPs production by HSC [3]. IL-1 β is known to be a proinflammatory cytokine and mediate several immune responses [4]. It is encoded by the *IL-1B* gene with several promoter elements, including a TATA box, a typical motif of includible genes [5,6]. The *IL-1B* gene has diallelic polymorphisms at –511, –31 base pairs (bp) from the transcriptional start site [7]. IL-1-receptor antagonist (*IL-1RN*) is an anti-inflammatory molecule that competes for receptor binding with IL-1 β [8,9]. The *IL-1RN* gene contains an 86-bp variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism in intron 2 [10]. These polymorphisms are, therefore, of

Received 12 May 2006; received in revised form 15 August 2006; accepted 9 September 2006; available online 2 November 2006

* Corresponding author. Tel.: +81 957 52 3121; fax: +81 957 54 0292.

E-mail address: migita@nmc.hosp.go.jp (K. Migita).

Abbreviations: HBV, hepatitis B virus; LC, liver cirrhosis; HCC, hepatocellular carcinoma; IL-1B, interleukin-1B; IL-1RN, interleukin-1 receptor antagonist gene.

Table 1
Baseline characteristics of HBV carrier

| | ASC (n = 65) | CH (n = 58) | LC (n = 65) | HCC (n = 49) (CH:6, LC:43) |
|--------------------------------|--------------|---------------|--------------|----------------------------|
| Mean age (yr) | 55.7 ± 17.6 | 42.6 ± 14.4 | 58.2 ± 9.3 | 62.9 ± 9.4 |
| Sex (M/F) | 34/31 | 37/21 | 50/15 | 40/9 |
| Mean ALT (U/L) | 21.2 ± 8.1 | 134.7 ± 159.1 | 71.4 ± 89.3 | 59.2 ± 62.8 |
| Mean PLT (10 ³ /μl) | 197.8 ± 52.2 | 199.5 ± 51.1 | 125.9 ± 55.2 | 121.6 ± 84.0 |
| Mean albumin (g/dl) | 4.6 ± 0.3 | 4.5 ± 0.4 | 4.2 ± 0.6 | 3.8 ± 1.0 |

Abbreviations: ASC, asymptomatic carrier; CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis; HCC, hepatocellular carcinoma; ALT, alanine aminotransferase; PLT, platelet.

potential functional importance in their modulation of IL-1β protein production and its biological activity.

Increasing evidences indicate that genetic factors influence the natural history of chronic liver diseases [11]. Recent studies have proposed that a number of gene polymorphisms influence the progression of fibrosis in patients with hepatitis C virus (HCV) infections, autoimmune chronic cholestasis, and alcohol-induced liver disease [12–14]. The aim of the present study was to elucidate the association of *IL-1B* and *IL-1RN* loci polymorphism as host genetic factors with an increased risk of developing HBV-related liver diseases in a Japanese population.

2. Patients and methods

2.1. Patients

A total of 237 patients who were positive for hepatitis B surface antigen (HBsAg) visited the clinics for liver diseases at the Nagasaki University Hospital or Nagasaki Medical Center between August, 1999, and June, 2004. As controls, 63 healthy Japanese volunteers (33 men and 30 women, 22–66 years old, with a mean age of 36.6 ± 7.7 years) without any history liver disease were enrolled in the study after obtaining informed consent. The patients were regularly followed, with measurements of serum ALT and HBV markers such as HBsAg, HBeAg, anti-HBe using commercially available radioimmunoassay kits (Dainabot, Tokyo, Japan), and HBV DNA. Tumor markers such as alpha fetoprotein and/or des-γ-carboxy-prothrombin were also measured every month, and with ultrasonography or computed tomography of the liver every 3 months to detect HCC in a early stage. The diagnosis of HCC was made by several imaging modalities in all patients and confirmed histologically by sonography-guided fine-needle biopsy specimens, if needed in all patients. All patients did not have any other types of liver diseases such as chronic hepatitis C, alcoholic

liver diseases, autoimmune liver diseases, or metabolic liver diseases. The study protocol was approved by the Ethics Committees of both Nagasaki University Hospital and National Nagasaki Medical Center, and informed consent was obtained from each individual.

Of the 237 HBV carriers, 65 patients were considered to be asymptomatic carriers (ASC) based on sustained normalization of the serum ALT levels together with seropositivity for anti-HBe throughout the study (Table 1). On the other hand, 172 of the 237 HBV carriers were considered to have chronic progressive liver disease (CPLD) such as chronic hepatitis (58), cirrhosis (65), or hepatocellular carcinoma (49) manifested by elevated ALT levels and by clinical or histological findings on examination of liver tissue during the follow-up period (Table 1). Of the 49 patients with HCC, 6 (12%) were found to have chronic hepatitis; 43 (88%) had cirrhosis. The clinical data, including bilirubin, albumin, prothrombin time and the presence of ascites or hepatic encephalopathy, were collected and Child–Pugh score was calculated in LC patients. Of 237 HBV carriers, 79 had undergone liver biopsy during the study period to assess the degree of liver fibrosis using the METAVIR system [15]. Liver biopsy was not performed in parts of patients who had apparent biochemical, endoscopic and ultrasound features of LC.

2.2. DNA extraction

Genomic DNA was isolated from whole blood using the QIAamp DNA blood protocol according to the manufacturer's instruction (Qiagen Ltd., UK).

2.3. Genotyping

The polymerase chain reaction (PCR) amplification was conducted using the primers listed in Table 2.

2.3.1. *IL-1RN*

The *IL-1RN* intron 2 contains a VNTR of an 86-bp length of DNA. The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Allele 1 (four repeats) was 410 bp, allele 2 (two repeats) was 240 bp, allele 3 (three repeats) was 325 bp, allele 4 (five repeats) was 500 bp, and allele 5 (six repeats) was 595 bp [16].

Table 2
PCR condition for *IL-1B* and *IL-1RN*

| Polymorphism | Primers | PCR conditions |
|----------------------------------|---|--|
| IL-1B, T to C at –31 | F1 5'-AATGTGGACATCAACTGCA-3' R1 5'-CTCCCTCGCTGTTTTATA-3' F2 5'-ACTTCTGCTTTTGAAAGCC-3' R2 5'-TCAGCTGTTAGATAAGCAG-3' | PCR-CTPP (confronting two-pair primers) 10 min at 95 °C, 30 cycles of 1 min at 95 °C, 48 °C and 72 °C and 5 min at 72 °C |
| IL-1B, C to T at –511 | 5'-GCCTGAACCCTGCATACCGT-3' 5'-GCCAATAGCCCTCCCTGTCT-3' | PCR-RFLP (<i>Ava</i> I) 10 min at 94 °C, 5 cycles of 30 sec at 94 °C, 65 °C and 72 °C and 30 cycles of 30 sec at 94 °C, 60 °C and 72 °C and 5 cycles of 30 sec at 94 °C, 55 °C and 72 °C and 7 min 72 °C |
| IL-1RN 86 bp VNTR at intron 2 | F 5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3' R 5'-TCCTGGTCTGCAGGTA-3' | 10 min at 95 °C, 35 cycles of 1 min at 95 °C, 55 °C and 72 °C and 5 min at 72 °C |

Table 3
IL-1RN genotype frequencies in HBV carriers

| Variables | Patients with HBV | | | | | Healthy volunteers (<i>n</i> = 63) (%) |
|---------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---|
| | Total (<i>n</i> = 237) (%) | ASC (<i>n</i> = 65) (%) | CH (<i>n</i> = 58) (%) | LC (<i>n</i> = 65) (%) | HCC (<i>n</i> = 49) (%) | |
| <i>IL-1RN</i> | | | | | | |
| 1/1 | 216 (91.1) | 59 (90.8) | 53 (91.4) | 58 (89.2) | 46 (93.9) | 53 (84.1) |
| 1/2 | 13 (5.5) | 5 (7.7) | 1 (1.7) | 6 (9.2) | 1 (2.0) | 7 (11.1) |
| 1/3 | 1 (0.4) | 0 | 1 (1.7) | 0 | 0 | 0 |
| 1/4 | 4 (1.7) | 0 | 2 (3.4) | 1 (1.5) | 1 (2.0) | 2 (3.2) |
| 2/2 | 1 (0.4) | 0 | 0 | 0 | 1 (2.0) | 0 |
| 2/4 | 2 (0.8) | 1 (1.5) | 1 (1.7) | 0 | 0 | 1 (1.6) |

Note. The genotype are shown as frequency (percentage).

Abbreviations: HBV, hepatitis B virus; ASC, asymptomatic carrier; CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis; HCC, hepatocellular carcinoma; IL-1RN, IL-1 receptor antagonist.

2.3.2. *IL-1B* –511

A fragment containing the *Ava*I polymorphic site at position –511 of the *IL-1B* gene was amplified by PCR. Fragments were separated by electrophoresis on 3% agarose with ethidium bromide staining using appropriate commercially available size markers for comparison. The C allele was designated if two bands of 92 and 63 bp were obtained, and the T allele was designated if a signal band of the undigested 155 bp was obtained. Genotypes were designated as follows: C/C, two bands of 92 and 63 bp; C/T, three bands of 155, 92, and 63 bp; and T/T, a single band of 155 bp [17].

2.3.3. *IL-1B* –31

For the polymorphisms at –31 of *IL-1B*, a new method named PCR-CTPP (PCR with confronting two-pair primers) was applied, which does not require a step to digest DNA products for single nucleotide polymorphism genotyping [18]. All PCR products were visualized on a 2% agarose gel with ethidium bromide staining.

2.4. Statistical analysis

Results are expressed as means ± SD. Comparisons were made by Fisher's exact probability test and the χ^2 test. All *p* values were two-tailed, and *P* values <0.05 were considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. *IL-1RN* gene polymorphisms

Six *IL-1RN* genotypes (1/1, 1/2, 1/3, 1/4, 2/2, and 2/4) were included in our study. Genotype 1/1(4/4

repeats) was the most common genotype in the HBV carrier patients (91.1%). In contrast to Caucasian populations, the homozygote allele 2* (2/2 repeat) was found in only one patient with HCC. The heterozygote allele 2* (1/2, 2/2, and 2/4) was found in 9.2% of ASC, 3.4% CH, 9.2% LC, and 4.0% of the HCC group (Table 3). The present study found no significant difference in *IL-1RN* genotype frequencies among various liver diseases of HBV carriers.

3.2. *IL-1B* gene polymorphisms

Table 4 shows the genotype frequencies of *IL-1B* gene polymorphism. Since *IL-1B* –511C/T was in complete linkage equilibrium with *IL-1B* –31T/C, only *IL-1B* –31T/C was described in this haplotype analysis. Although no statistical difference was found in allelic frequencies between liver cirrhosis patients and healthy subjects, *IL-1B* –31C/C homozygotes were less frequently seen in HBV carriers with LC or HCC. The proportion of the C/C genotype of *IL-1B* –31 in patients with HCC (14.3%) was not different from that in patients with LC (15.4%). However, when cases were subdivided according to the presence of LC (Table 5), the frequency of the C/C genotype in patients with LC (13.9%) was significantly lower than that in patients without LC (27.9%), while inversely the frequency of

Table 4
IL-1B genotype frequencies in HBV carriers

| Variables | Patients with HBV | | | | | Healthy volunteers (<i>n</i> = 63) (%) |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---|
| | Total (<i>n</i> = 237) (%) | ASC (<i>n</i> = 65) (%) | CH (<i>n</i> = 58) (%) | LC (<i>n</i> = 65) (%) | HCC (<i>n</i> = 49) (%) | |
| <i>IL-1B</i> –511 | | | | | | |
| C/C | 69 (29.1) | 17 (26.2) | 18 (31.0) | 17 (26.2) | 17 (34.7) | 20 (31.8) |
| C/T | 117 (49.4) | 27 (41.5) | 27 (46.6) | 38 (58.5) | 25 (51.0) | 29 (46.0) |
| T/T | 51 (21.5) | 21 (32.3) | 13 (22.4) | 10 (15.4) | 7 (14.3) | 14 (22.2) |
| <i>IL-1B</i> –31 | | | | | | |
| C/C | 51 (21.5) | 21 (32.3) | 13 (22.4) | 10 (15.4) | 7 (14.3) | 14 (22.2) |
| C/T | 117 (49.4) | 27 (41.5) | 27 (46.6) | 38 (58.5) | 25 (51.0) | 29 (46.0) |
| T/T | 69 (29.1) | 17 (26.2) | 18 (31.0) | 17 (26.2) | 17 (34.7) | 20 (31.8) |

Note. The genotype are shown as frequency (percentage).

Abbreviations: HBV, hepatitis B virus; ASC, asymptomatic carrier; CH, chronic hepatitis; LC, liver cirrhosis; HCC, hepatocellular carcinoma; IL-1B, interleukin-1B.