

強制発現させたヒト HCC 細胞株 SK-Hep1/GPC3 を皮下注射して生着させた後に、HLA-A2 拘束性エピトープペプチド GPC3₁₄₄₋₁₅₂ あるいは HLA-A24 拘束性エピトープペプチド GPC3₂₉₈₋₃₀₆ で刺激することにより、HCC 患者の PBMC より誘導されたヒト CTL 株を養子免疫した。GPC3 エピトープペプチドにて誘導した CTL 株を静脈内投与した NOD/SCID マウスでは、コントロールの T 細胞株あるいは生理食塩水のみを投与した群と比較して、有意差をもって腫瘍の増殖抑制が観察された (図 4)。現在、国立がんセンター東病院にて HCC 患者を対象にして、これらのペプチドを用いた癌免疫療法の臨床試験を計画中である。

おわりに

GPC3 由来の CTL エピトープは、HCC の免疫療法の新たなターゲットとして、その臨床応用が期待される。腫瘍の免疫逃避に対抗するためには多様な腫瘍拒絶抗原のレパートリーを確立することが望まれる。GPC3 がその一つとして、これを用いた免疫療法が HCC の再発、発症防止に寄与することを期待したい。

文 献

- 1) Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., *et al.*: Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, glypican-3, evokes T-cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin. Cancer Res.* 10: 8630-8640, 2004.
- 2) Motomura, Y., Senju, S., Nakatsura, T., *et al.*: Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res.* 66: 2414-2422, 2006.
- 3) Komori, H., Nakatsura, T., Senju, S., *et al.*: Identification of HLA-A2-or-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12: 2689-2697, 2006.
- 4) Butterfield, L.H.: Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127: S232-241, 2004.
- 5) Veugelers, M., De Cat, B., Ceulemans, H., *et al.*: Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 274: 26968-26977, 1999.
- 6) Gonzalez, A.D., Kaya, M., Shi, W., *et al.*: OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J. Cell Biol.* 141: 1407-1414, 1998.
- 7) Capurro, M.I., Xiang, Y.Y., Lobe, C., *et al.*: Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res.* 65: 6245-6254, 2005.
- 8) Nakatsura, T., Yoshihiro, Y., Monji, M., *et al.*: Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 16-25, 2003.
- 9) Hippo, Y., Watanabe, K., Watanabe, A., *et al.*: Identification of soluble NH₂-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 64: 2418-2423, 2004.
- 10) Capurro, M., Wanless, I.R., Sherman, M., *et al.*: Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 125: 89-97, 2003.

4. 肝細胞癌における遺伝子異常

長岡 克弥* 佐々木 裕*

<Key point>

はじめに

肝発癌増殖進展過程では、慢性肝炎、肝硬変を経て前癌病変である腺腫様過形成あるいは過形成結節が生じ、早期肝細胞癌(hepatocellular carcinoma; 以下, HCC)から進行HCCへと移行する。本邦においてHCCの約90%はウイルスの持続感染を基礎疾患として有しており、持続感染による炎症が遺伝子異常をはじめとしたさまざまなメカニズムを介して発癌進展に関与すると考えられている。また、B型肝炎ウイルス(以下, HBV)やC型肝炎ウイルス(以下, HCV)が宿主遺伝子の機能変化をもたらし、発癌に関与する可能性もある。

本稿ではこれまでに明らかになっているHCCにおける遺伝子異常を、Weinbergらにより提唱された多段階発癌の概念¹⁾と対比しながら、肝炎ウイルスの関与を交えつつ概観する。

Key words : 肝細胞癌, 遺伝子異常, LOH, メチル化, 肝炎ウイルス

Genetic Alterations in Hepatocarcinogenesis

Katsuya Nagaoka/Yutaka Sasaki

*熊本大学大学院医学薬学研究部消化器内科学 (〒860-8556 熊本市本荘1-1-1)

I. 肝発癌の各段階に認められる遺伝子異常

1. 増殖シグナルの自己増強(癌原遺伝子などの変異による)

癌原遺伝子や細胞周期関連遺伝子に変異が生じると増殖シグナルの自己増強が起こるが、一般に認められる変異は点突然変異と遺伝子増幅とに大別される。

点突然変異

点突然変異では、塩基の一つが正常とは異なる塩基に置き換わる(図 a)。例えば、癌原遺伝子のなかで *ras* 遺伝子ファミリーである *H-ras*、*N-ras*、*Ki-ras* に点突然変異が起こると、増殖シグナルは恒常的に活性化される。しかしながら、*ras* 遺伝子ファミリーの活性化変異は HCC では数%とその頻度は低い。

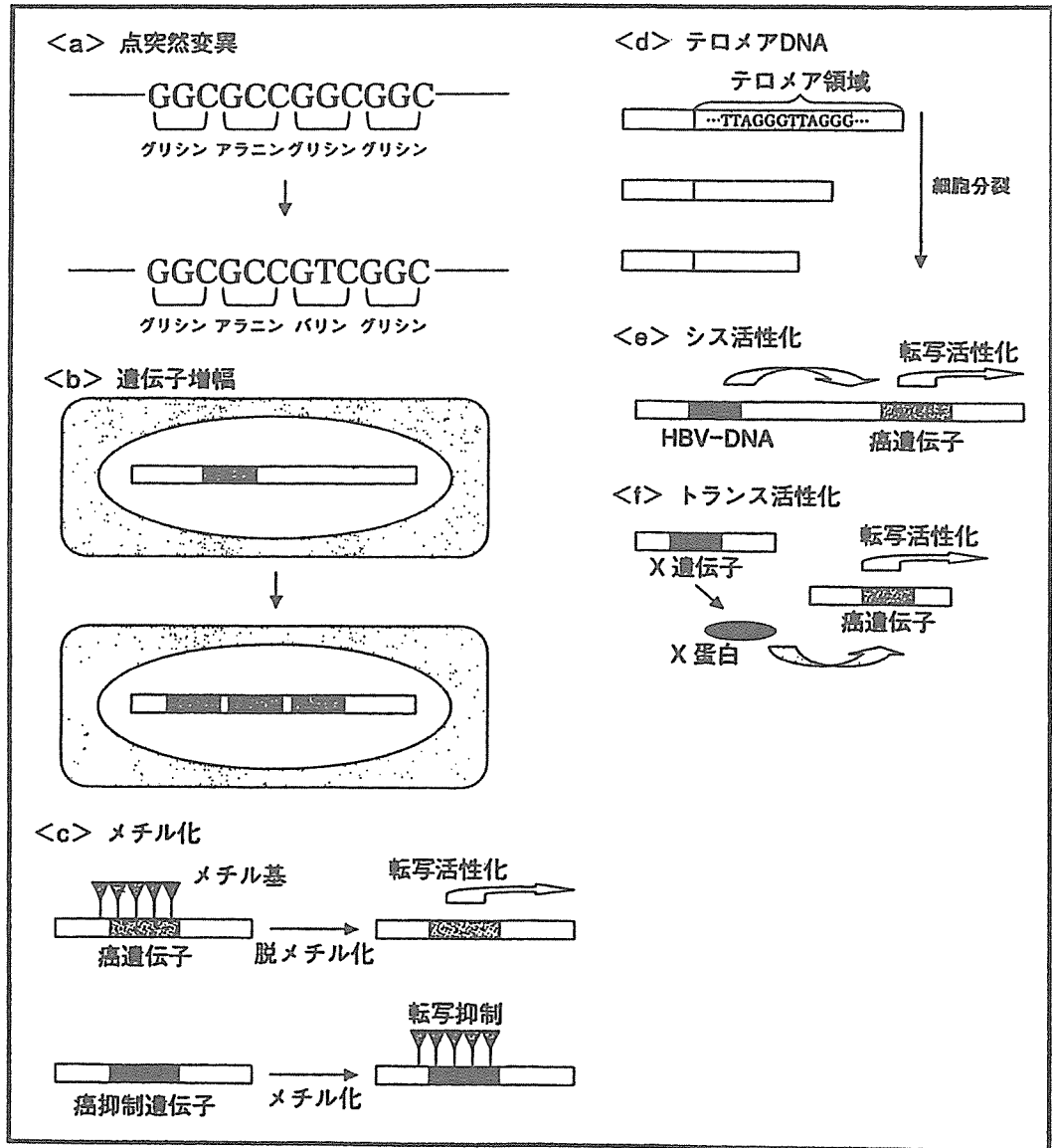


図 肝細胞癌の遺伝子異常

一方、遺伝子自体の構造には異常がなく、特定の遺伝子を含む染色体領域が多数コピー増幅され、そのために遺伝子発現が大幅に増強している場合を「遺伝子増幅」と呼ぶ(図b)。癌原遺伝子 *c-myc* 遺伝子の存在する 8q24 は HCC の 40% で 2~5 倍の獲得が観察され、*c-myc* 遺伝子自体にも遺伝子増幅が報告されている²⁾。

一方、G₁期から S 期への進行を制御する細胞周期関連遺伝子サイクリン D₁ は、2~10 倍の遺伝子増幅と 6~10 倍の過剰蛋白発現が進行 HCC において約 10% の頻度で報告されている³⁾。またインスリン、インスリン様増殖因子 1 (IGF-1) の増殖シグナルに関与するインスリン受容体基質 (IRS-1)⁴⁾ でも遺伝子増幅が認められる。一方、 β -カテニンは Wnt シグナル伝達を担い、*c-myc* 遺伝子やサイクリン D₁ 遺伝子などの転写を誘導する癌原遺伝子であるが、早期 HCC において β -カテニン遺伝子の変異が報告されている⁵⁾。

2. 増殖抑制シグナルに対する不応性(癌抑制遺伝子などの変異による)

癌抑制遺伝子は正常細胞で発現しており、増殖シグナルを抑える働きをしている。通常、正常組織の遺伝子座において、父方由来と母方由来の対立遺伝子は同じでないが、この一方が欠失してホモ接合体に変化している場合をヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity ; 以下、LOH) と呼ぶ。LOH の頻度は染色体部位にかかわらず、概して進行癌において頻度が高くなり、前癌状態である腺腫様過形成あるいは過形成結節の段階では散在性に認めるにとどまり、特定領域に LOH 集積の報告はない。

一方、慢性肝炎から直接に HCC が発生する症例では、LOH の集積を 1p, 6q, 8p, 13q の部位に認める頻度が高い⁶⁾。また早期 HCC では 1p, 4q, 6q, 8p などでの LOH の頻度が高い。

1p の LOH は 2cm 以下の早期 HCC でテロメア側に比較的高頻度に認められる。この部位には癌抑制遺伝子 *p53* と相同性を有する *p73* 遺伝子が存在するが、HCC において *p73* 遺伝子変異はまれであり、*p73* 蛋白質の発現はむしろ増強していることから⁷⁾、*p73* の不活化は HCC と関連が乏しい可能性がある。

6q25-27 に存在するマンノース 6-リン酸/インスリン様増殖因子-II 受容体 (以下、M6P/IGF2R) は、TGF- β を不活性型から活性型へ変換する働きを有しており、増殖抑制に働く。M6P/IGF2R の変異の大部分は肝細胞の異形成領域で検出され⁸⁾、HCC の早期に機能欠損を介した増殖亢進への関与が示唆される。

進行 HCC では、1 p, 4 q, 6 q, 8 p に加え、13 q, 16 q, 17 p などに LOH の報告が多い。HCC の進展過程で LOH を認める染色体部位が増加することから、複数の遺伝子(とくに癌抑制遺伝子)に多段階に変異が蓄積すると考えられている。13 q には癌抑制遺伝子 *Rb* が存在しており、進行 HCC において LOH のみられる残存アレルに高率に点突然変異を認め、その機能欠損が明らかになっている⁹⁾。

癌抑制遺伝子
p53

癌抑制遺伝子 *p53* の LOH が 17 p に報告されている¹⁰⁾。*p53* 蛋白質は DNA 傷害時に細胞周期を停止させ DNA を修復するが、修復が不可能な場合にはアポトーシスを誘導する。*p53* 遺伝子の変異は前癌状態や早期癌では報告がなく、むしろ分化度の低下、腫瘍径の増大に伴い変異の頻度が高くなることから¹¹⁾、癌の発生ではなく進展に関与すると考えられている。その他、癌抑制遺伝子の変異としては *PTEN*, *CDKN2A (p16^{INK4A})* などがある¹²⁾。

異常メチル化

一方、癌抑制遺伝子は、プロモーター領域の異常メチル化によっても機能が抑制される。哺乳動物における DNA のシトシン(C)の一部はメチル化されており、とくに CpG 部位(C と G が連続した場所)の約 80% はメチル化されている。一般的にメチル化はその領域に存在する転写単位の発現を抑制する。メチル化に異常が生じると細胞の癌化が引き起こされるが、その機序として、①メチル化により発現が抑制されていた癌遺伝子が、その低下により過剰に発現する、②通常発現している癌抑制遺伝子が異常メチル化により不活性化される、などが考えられる(図 c)。例えば、癌抑制遺伝子 *p16^{INK4A}* はサイクリン依存性キナーゼ 4 とサイクリン D₁ との複合体形成を阻害し、細胞周期を G₁ 期に停止させる働きがあるが、早期 HCC においてプロモーター領域の高頻度のメチル化により p16 蛋白質の発現が低下している¹³⁾。

3. アポトーシスの回避

アポトーシス回
避能

通常、遺伝子異常をきたした肝細胞はアポトーシスにより排除されるが、なんらかの機序でアポトーシスからの回避能を獲得すると、クローナルに増殖して癌組織へと進展する。

この回避能の分子機構として、アポトーシス実行機構の障害や制御機構の活性化が挙げられる。

アポトーシスの実行には Fas リガンド(以下、FasL)や TNF- α などの death factor が中心となる。例えば、活性化 T 細胞に発現する FasL が細胞表面上の Fas に結合すると、カスパーゼと呼ば

れる蛋白質分解酵素が活性化されアポトーシスが惹起される。一方、制御因子である Bcl-2 ファミリーのなかで、アポトーシス抑制因子(Bcl-2, Bcl-XL)の増強と促進因子(Bax, Bad, Bid など)の減弱が相まってアポトーシス回避能がもたらされるが¹⁴⁾、HCC におけるアポトーシスからの回避能と遺伝子変異との関連は十分には解明されていない。p53 蛋白質は Fas や Bax の転写を介してアポトーシスを誘導する。前述のように HCC では p53 遺伝子が存在する 17p に高頻度に LOH が認められ、さらに残存アレルで Fas や Bax の誘導に必要なドメインIV, ドメインV に点突然変異が集まるために¹¹⁾、p53 蛋白質によるアポトーシスの誘導は著しく阻害されている。

4. テロメラーゼの活性化

テロメア

真核生物の染色体末端(テロメア)にはテロメア DNA が位置しており(図 d)、その長さは細胞分裂に伴い短くなる。一方、生殖細胞、癌細胞ではテロメア DNA を延長する酵素であるテロメラーゼの働きにより、テロメア DNA の長さが保たれている。HCC においても 83%の頻度でテロメラーゼ活性の陽性が確認されているが、中低分化 HCC ほど陽性率は高い傾向にある¹⁵⁾。

5. 腫瘍血管新生

VEGF

bFGF

血管上皮増殖因子(vascular endothelial growth factor ; 以下, VEGF)や塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor ; 以下, bFGF)などは、腫瘍血管の新生に非常に重要な働きをする。実際に HCC 患者血清や HCC 組織、あるいはその周辺の非癌部組織で VEGF の濃度が高いこと¹⁶⁾、術前の血清中の bFGF 濃度が高値を示す患者は切除後の予後が不良であること、進行 HCC 患者では bFGF 濃度は高値であることが報告されている¹⁷⁾。

また悪性腫瘍では正常組織に比べ VEGF や bFGF の発現が増加し、逆に内因性阻害因子であるトロンボスポンディン1(以下, TSP-1)や β -インターフェロンの発現が低下している。TSP-1 は p53 蛋白質によってその発現が制御されており¹⁸⁾、p53 遺伝子の変異により TSP-1 濃度が低下し、その結果、血管新生因子の作用が相対的に強くなる可能性が考えられる。

第 16 染色体の
LOH

E-カドヘリン

6. 組織浸潤と転移

第 16 染色体の LOH は、HCC の腫瘍径、分化度、転移との間に
関連が認められること、また進行 HCC に高頻度に観察されること
から、この染色体上に進展転移に関与する遺伝子の存在が示唆され
ている¹⁹⁾。例えば、16q に存在する細胞接着因子 E-カドヘリン遺
伝子は異常メチル化の標的遺伝子であり、16q の LOH に加えてプ
ロモーター領域のメチル化異常を介したカドヘリン機能低下が浸潤
転移の一翼を担っている²⁰⁾。

II. 肝炎ウイルスと遺伝子異常

1. HBV による宿主遺伝子の変化

HBV 感染によってもたらされる宿主遺伝子変化のメカニズムと
しては、① insertional mutagenesis, ② トランス活性化機能, ③
in vitro recombination (genomic instability) が挙げられる。

1) insertional mutagenesis

シス活性化

HBV はウイルス自体がコードする逆転写酵素の働きで宿主染色
体へ部分欠失した形で組み込まれるが(insertional mutagene-
sis), 慢性肝炎組織ではほぼ全例に HBV DNA のクローナルな組
み込みが観察される²¹⁾。HBV DNA が宿主ゲノムの癌原遺伝子や
細胞周期関連遺伝子の近傍に組み込まれた場合に、それらが活性化
され発癌がもたらされると考えられており、このような遺伝子の活
性化機構はシス活性化(図 e)と呼ばれている。

これまでは、染色体上の HBV DNA の組み込み部位は random
であると考えられてきたが、近年、多数の症例の検討から、inser-
tional mutagenesis によるシス活性化はまれではないことが示唆
されている²²⁾。とくにテロメア合成に関与するヒトテロメラーゼ逆
転写酵素(*hTERT*)遺伝子の promoter 領域への組み込みが報告さ
れており²³⁾、組み込み部位が random でない可能性が示されてい
る。

2) トランス活性化機能

トランス活性化

トランス活性化とは、その遺伝子が存在する DNA 以外の遺伝子
を活性化させることである(図 f)。例えば、HBV の X 蛋白は、細
胞増殖に関与する RNA ポリメラーゼ II, III や *c-myc*, *c-fos* の遺
伝子の転写をトランスに活性化する²⁴⁾。また、p 53 蛋白質の核内
への移行を阻害して不活性化することや、またカスパーゼ 3 の活性
を抑えてアポトーシス回避に働くこと²⁵⁾、などが明らかである。ま

HBV X 蛋白

た増殖シグナルの恒常的活性化がHCCで報告されているが²⁶⁾、X蛋白はRas/MAPキナーゼカスケードを活性化する²⁷⁾。一方、X遺伝子のトランスジェニックマウスでは高率にHCCが発症する²⁸⁾。このようにX蛋白の発癌誘導作用が示唆されているが、ヒトHCCにおけるX蛋白の発現は非癌部、癌部ともに50%前後であり²⁹⁾、発癌進展にどの程度関与しているかについては未だ明らかではない。

3) *in vitro* recombination (genomic instability)

HBV DNAのpre C領域の61塩基断片(15 AB配列)が宿主DNAの再編成(recombination)を誘導し³⁰⁾、染色体の不安定性(genomic instability)をもたらす可能性が考えられる。

2. HCVによる宿主遺伝子の変化

HCV コア蛋白

HCVは逆転写酵素を有さないために、宿主遺伝子への組み込みは認められず、そのためにHBVのようなinsertional mutagenesisや*in vitro* recombinationを介した発癌誘導は当てはまらない。むしろコア蛋白は、①トランスに働き*c-myc*プロモーターを活性化する、細胞周期を停止させる*p21^{Waf1/CIP1/SDI1}*のプロモーター活性を抑制する³¹⁾、②転写因子であるNF- κ BやAP-1の機能を変化させ、細胞増殖や細胞免疫を修飾する³²⁾、などの報告があり、HCVはHBVとは共通した、あるいは特異的な機構で発癌進展に関与しており、今後の研究が期待される。

3. 細胞内環境の変化

活性酸素

8-OHdG

HCVコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓、あるいはC型慢性肝炎例ではC18:1不飽和脂肪酸が増加しており、そのため、脂肪酸代謝が過度に亢進し多量の活性酸素が産生される³³⁾。その結果、遺伝子変異が起こりやすくなると考えられている。実際に酸化DNA損傷産物である8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG)は、慢性ウイルス性肝疾患においてその発現が増強している³⁴⁾。

おわりに

HCCも他の癌と同様に多段階の発癌機構が想定されているが、HCCに特異的な遺伝子異常は未だ見出されていない。HCC発症の背景として、肝炎ウイルスの持続感染による慢性炎症が関与して

いることは疫学的にも明らかであるが、この慢性炎症から早期HCCに至る機構を現在の遺伝子異常の知見のみで説明することは不可能である。HCCの早期発見、高い再発率の抑制、分子標的治療の開発など、HCC撲滅にむけた臨床応用につなげるためにも、遺伝子異常の詳細な解明が待望される。

文 献

- 1) Hanahan, D. and Weinberg, R. A. : The hallmarks of cancer. *Cell* 100 ; 57-70, 2000
- 2) Fujiwara, Y., Monden, M., Mori, T., et al. : Frequent multiplication of the long arm of chromosome 8 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 53 ; 857-860, 1993
- 3) Nishida, N., Fukuda, Y., Komeda, T., et al. : Amplification and overexpression of the cyclin D 1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 54 ; 3107-3110, 1994
- 4) Ito, T., Sasaki, Y. and Wands, J. R. : Overexpression of human insulin receptor substrate 1 induces cellular transformation with activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell Biol.* 16 ; 943-951, 1996
- 5) de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., et al. : Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 ; 8847-8851, 1998
- 6) Nagai, H., Pineau, P., Tiollais, P., et al. : Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 14 ; 2927-2933, 1997
- 7) Tannapfel, A., Wasner, M., Krause, K., et al. : Expression of p 73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 91 ; 1154-1158, 1999
- 8) De Souza, A. T., Hankins, G. R., Washington, M. K., et al. : Frequent loss of heterozygosity on 6 q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors. *Oncogene* 10 ; 1725-1729, 1995
- 9) Murakami, Y., Hayashi, K., Hirohashi, S., et al. : Aberrations of the tumor suppressor p 53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 51 ; 5520-5525, 1991
- 10) Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., et al. : Mutations in the p 53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342 ; 705-758, 1989
- 11) Oda, T., Tsuda, H., Scarpa, A., et al. : p 53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 52 ; 6358-6364, 1992
- 12) Ding, S. F., Habib, N. A., et al. : Loss of heterozygosity in liver tumours. *J. Hepatol.* 22 ; 230-238, 1995
- 13) Yang, B., Guo, M. Z., Herman, J. G., et al. : Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Pathol.* 163 ; 1101-1107, 2003
- 14) Chang, J., Hsu, Y., Kuo, P., et al. : Increase of Bax/Bcl-XL ratio and arrest of cell cycle by luteolin in immortalized human hepatoma cell line. *Life Sci.* 76 ; 1883-1893, 2005
- 15) Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., et al. : Telomerase activity in human liver tissues : comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 55 ; 2734-2736, 1995
- 16) El-Assal, O. N., Yamanoi, A., Soda, Y., et al. : Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver : possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirr-

- hotic liver. *Hepatology* 27 ; 1554-1562, 1998
- 17) Poon, R. T., Ng, I. O., Lau, C., et al. : Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. *Am. J. Surg.* 182 ; 298-304, 2001
 - 18) Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., et al. : Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265 ; 1582-1584, 1994
 - 19) Tsuda, H., Zhang, W. D., Shimosato, Y., et al. : Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 ; 6791-6794, 1990
 - 20) Kanai, Y., Ushijima, S., Hui, A. M., et al. : The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *Int. J. Cancer* 71 ; 355-359, 1997
 - 21) Rogler, C. E., Sherman, M., Su, C. Y., et al. : Deletion in chromosome 11p associated with a hepatitis B integration site in hepatocellular carcinoma. *Science* 230 ; 319-322, 1985
 - 22) Paterlini-Brechot, P., Saigo, K., Murakami, Y., et al. : Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 22 ; 3911-3916, 2003
 - 23) Horikawa, I. and Barrett, J. C. : Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* 24 ; 1167-1176, 2003
 - 24) Spandau, D. F. and Lee, C. H. : Transactivation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J. Virol.* 62 ; 427-434, 1988
 - 25) Gottlob, K., Fulco, M., Levrero, M., et al. : The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. *J. Biol. Chem.* 273 ; 33347-33353, 1998
 - 26) Itō, Y., Sasaki, Y., Horimoto, M., et al. : Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 27 ; 951-958, 1998
 - 27) Benn, J. and Schneider, R. J. : Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 ; 10350-10354, 1994
 - 28) Koike, K., Moriya, K., Iino, S., et al. : High-level expression of hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 19 ; 810-819, 1994
 - 29) Su, Q., Schroder, C. H., Hofmann, W. J., et al. : Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 27 ; 1109-1120, 1998
 - 30) Hino, O., Tabata, S. and Hotta, Y. : Evidence for increased in vitro recombination with insertion of human hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 ; 9248-9252, 1991
 - 31) Ray, R. B., Steele, R., Meyer, K., et al. : Hepatitis C virus core protein represses p21 WAF1/Cip1/Sid1 promoter activity. *Gene* 208 ; 331-336, 1998
 - 32) Shrivastava, A., Manna, S. K., Ray, R., et al. : Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J. Virol.* 72 ; 9722-9728, 1998
 - 33) Moriya, K., Nakagawa, K., Santa, T., et al. : Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 61 ; 4365-4370, 2001
 - 34) Shimoda, R., Nagashima, M., Sakamoto, M., et al. : Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in human livers with chronic hepatitis. *Cancer Res.* 54 ; 3171-3172, 1994