

2010J00J0A

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

ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の
抑制に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 紀夫

平成23(2011)年 3月

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

ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の
抑制に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 紀夫

平成23(2011)年 3月

ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の抑制に関する研究

班員名簿

班長	林 紀夫	独立行政法人労働者健康福祉機構 関西労災病院 消化器内科学	病院長
班員	坪内 博仁	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 消化器疾患・生活習慣病学	教授
	野村 秀幸	国家公務員共済組合連合会 新小倉病院 肝臓センター	部長
	上田 啓次	大阪大学大学院医学系研究科 ウイルス学	教授
	片野 義明	名古屋大学医学部附属病院 消化器内科学	講師
	廣石 和正	昭和大学大学院医学部 消化器内科学	准教授
	中本 安成	福井大学医学部医学科 病態制御医学講座内科学（2）領域	教授
	竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	准教授
	平松 直樹	大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学	講師
	考藤 達哉	大阪大学大学院医学系研究科 樹状細胞制御治療学	寄附講座准教授

目 次

I. 総括研究報告書

- ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の抑制に関する研究・・・1
林 紀夫

II. 分担研究報告書

1. 肝炎の進展過程における炎症の調節因子オステオアクチビンの役割・・・5
坪内 博仁
2. 肝細胞癌の造影超音波像と病理像との比較・・・9
野村 秀幸
3. HBV感染受容体同定に向けたアプローチに関する研究・・・11
上田 啓次
4. C型肝炎における PEGIFN/Ribavirin 併用療法後の発癌に関連する臨床的背景因子の解析・・・13
片野 義明
5. IFN- α と抗 PD-1 抗体を用いた消化器癌に対する免疫療法の検討・・・18
廣石 和正
6. ウイルス性肝炎・肝がんにおける抗原特異的な免疫制御に関する研究・・・21
中本 安成
7. ソラフェニブによる肝がん細胞のオートファジー誘導について・・・23
竹原 徹郎
8. Peg-IFN/RBV 併用療法の肝発癌抑制効果について・・・27
平松 直樹
9. 原発性肝癌における TIE2 陽性単球の意義・・・32
考藤 達哉

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・35

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・45

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
総括研究報告書

ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の抑制に関する研究

研究代表者： 林 紀夫
独立行政法人労働者健康福祉機構関西労災病院・病院長

研究要旨： ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の抑制を目指して、Peg-IFN/RBV 併用治療時代の肝発がんの実態の解明、肝がんの分子・免疫病態の解明、肝がんの画像診断・診断マーカーの開発を目的に研究を行う。初年度の成果として、Peg-IFN/RBV 併用療法後の C 型肝炎症例では、高齢、男性、血小板低値 ($<12 \times 10^4/\mu\text{l}$)、ALT 高値 ($>40\text{IU/l}$)、Peg-IFN/RBV 併用療法無効が、有意に肝発がんに関与していることが明らかとなった。また、肝がんの診断マーカーとして TEM の有用性、肝がんの分子標的薬剤耐性機構のひとつとしてオートファジー誘導の重要性、肝がんに対する免疫応答として広汎な CTL レスポンスの存在などが示された。

A. 研究目的

ウイルス性肝炎、特に C 型肝炎からの発がんは我が国の肝がんの 4 分の 3 を占めている。2004 年 12 月以降、C 型肝炎に対する抗ウイルス治療は Peg-IFN/RBV の併用投与が標準であるが、なおウイルス排除に至らない症例が存在する。C 型肝がんは早期に発見され、根治的な治療が行われたとしても高率に再発し、患者の予後を不良なものとしている。

本研究課題では Peg-IFN/RBV 治療が臨床に登場し 6 年が経過した現時点における我が国の発がんの実態を 8,000 例以上の Peg-IFN/RBV 治療開始登録データベースをもとに解析を行う。このような検討を行うことにより、慢性肝炎、肝硬変、肝がん根

治後の各段階からの発がんの実態が解明されるとともに、Peg-IFN/RBV 治療が発がんをどの程度抑止し得るのかが明らかになる。また、Peg-IFN/RBV 併用を行うことにより、IFN 単独治療時代に比べ、高齢者、線維化進展例などのより難治群から SVR が得られるようになったが、このことは SVR からの発がんが従来よりも上昇している可能性を示唆している。さらに、non-SVR 例に対する肝庇護療法や IFN 少量長期投与が発がんを抑止しているか否かについては明らかにされていない。このような問題に関しても、正確なエビデンスを提示することが可能となる。さらに、肝生検試料を用いた分子生物学的解析、末梢血単核球を用いた免疫学的解析を行うことにより、C 型肝炎からの発

がんに関連する分子・免疫病態を検討する。Peg-IFN/RBV 治療によるウイルス排除や IFN 少量長期投与、肝庇護療法による肝炎の鎮静化がこのような分子・免疫病態を改善するかどうかについて解明を目指す。

C 型肝炎からの発がん/再発に影響する臨床的背景因子、分子免疫病態を明らかにすることは、ハイリスク群の患者を囲い込み、さらに発がん抑止の戦略を構築する上で有用であると考えられる。本研究の成果は、医療の均てん化、医療費の効率的な運用、C 型肝炎患者の QOL と生命予後の改善に資するものと考えられる。

B. 研究方法

1) Peg-IFN/RBV 併用時代における C 型肝炎からの発がん実態の解明：大阪地区 (Osaka Liver Forum)、名古屋地区 (名古屋 Hepatitis セミナー) の Peg-IFN/RBV 併用治療開始登録データベースより、発がんについての解析を行う。

2) B 型肝炎の感染機構：HBV 膜蛋白粒子外領域をプローブとした大腸菌発現ライブラリーのスクリーニングにより HBV 付着因子を探索する。

3) 炎症と肝発がん：動物モデルを用いて肝障害におけるオステオアクチビンの意義について検討する。

4) 肝がんに対する免疫応答と免疫治療：肝がんにおける TIE2 陽性単球 (TEM) の意義を検討するため、末梢血での同細胞の頻度と病態の関係を解析する。肝がん患者における CTL レスポンスを ELISPOT 法で解析し、治療介入との関連を解析する。動物モデルを用いて PD-1 阻害の抗腫瘍効果について検討する。

5) 肝がんの造影超音波による悪性度診断：造影超音波の画像と肝がん切除標本を対比することにより、肝細胞がんの分化度、脈管構築などを検討する。

6) 肝がんにおける分子標的薬剤耐性機構：肝がん細胞株にソラフェニブを投与し、オートファジーの誘導とその意義を検討する。

C. 研究成果

1) Peg-IFN/RBV 併用時代における C 型肝炎からの発がん実態の解明

(大阪地区)

Peg-IFN/RBV 併用療法後の C 型肝炎症例では、高齢、男性、血小板低値 ($<12 \times 10^4/\mu\text{l}$)、ALT 高値 ($>40\text{IU/l}$)、Peg-IFN/RBV 併用療法無効が、有意に肝発がんに関与していた。65 歳以上の高齢者においても、Peg-IFN/RBV 併用療法著効例や再燃例では、無効例に比し、肝発がんが約 7 割抑制された。Peg-IFN/RBV 非著効例における肝発がんは、治療後の ALT 値を低値 ($\leq 30\text{IU/l}$) に維持することで有意に抑制された。

(名古屋地区)

Peg-IFN/RBV 併用療法後の発がん率は、1 年 1.3%、3 年 4.4%、5 年 7.0%であった。発がん例は非発がん例に比し、有意に年齢が高く、肝線維化進展例が多く、Alb 値が低値であり、非 SVR 例であった。発がんに関与する最も有意な因子は肝線維化進行度であった。高齢者では SVR 例でも発がんに留意する必要がある。

2) B 型肝炎の感染機構

肝がん培養細胞株 (HepG2) に発現していると考えられる HBV 付着因子の存在が示唆された。

3) 炎症と肝発がん

オステオアクチピンは炎症刺激によりマクロファージより産生され、そのサイトカイン産生能を調節していた。

4) 肝がんに対する免疫応答と免疫治療

肝がん患者では、 $CD14^+CD16^+TIE2^+$ $CD45^+VEGFR2^+AC133^+CD34^-$ の TEM が増加していた。肝がん患者における TEM は、診断・治療効果判定の新たなマーカーとなる可能性が示唆された。

インターフェロンと抗 PD-1 抗体の併用によりマウスモデルにおいて抗腫瘍効果が増強された。

肝がん患者において、CTL 陽性反応を高率に誘導するペプチドエピトープがスクリーニングされた。治療経過においてこれらに対する CTL が誘導されることを観察した。CTL の特徴として central memory タイプを示したことから、ペプチドワクチンなどを用いた追加刺激によって、抗腫瘍効果の高いエフェクター (effector memory / effector) に分化する可能性が示された。肝がんに対する免疫原性の高い抗原ペプチドが同定されるとともに、治療開発における有用性が示唆された。

5) 肝がんの造影超音波による悪性度診断

Micro Flow Imaging 1 秒後に肝細胞がん結節内に検出される連続した造影信号は、病理組織上で径 $100\mu\text{m}$ 以上の動脈性血管に一致した。体表に近い腫瘍では造影信号と動脈性血管の一致率は高く、深部の腫瘍では一致率が低かった。

6) 肝がんにおける分子標的薬剤耐性機構

ソラフェニブ投与により、肝がん細胞株 (Huh7, PLC/PRF/5) においてオートファジーの増強が認められた。Atg5 のノックダウンによりオートファジーを阻害すると肝

がん細胞のアポトーシスが増強された。

D. 考察と結論

Peg-IFN/RBV 併用療法後の C 型肝炎症例では、高齢、男性、血小板低値 ($<12 \times 10^4/\mu\text{l}$)、ALT 高値 ($>40\text{IU/l}$)、Peg-IFN/RBV 併用療法無効が、有意に肝発がんに関与していた。

肝発がんと炎症・免疫応答、肝がんの画像診断、肝がんに対する抗がん剤治療の分野で研究の進展がみられた。

II. 分担研究報告

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(病態班)）
研究分担報告書

肝炎の進展過程における炎症の調節因子オステオアクチビンの役割

研究分担者 坪内博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座
座 消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨:オステオアクチビンは傷害組織においてマクロファージなどの抗原提示細胞で発現し、炎症の調節、傷害組織の再生・修復に関与していることが推測されている。本研究では、四塩化炭素肝障害モデルを用いて、肝炎の進展過程におけるオステオアクチビンの役割を解析した。四塩化炭素を単回投与した急性肝障害モデルでは、オステオアクチビンの発現は肝障害のピークに遅れて亢進し、肝組織の壊死巣周囲に浸潤したマクロファージや多核巨細胞にオステオアクチビンの発現がみられた。これらのオステオアクチビン発現細胞の90%以上がCD68陽性/CD11b陰性であり、サイトカイン産生よりもむしろ貧食能優位のマクロファージでオステオアクチビンが発現していることが考えられた。一方、オステオアクチビン変異および野生型マウスに慢性肝障害を誘導したところ、肝障害の程度に差はみられなかったが、野生型マウスにおいてオステオアクチビンを発現する多数の多核巨細胞が出現し、より強い肝線維化が観察された。以上の結果から、オステオアクチビンは、傷害組織の修復過程でアポトーシス細胞などを貧食するマクロファージに発現し、炎症および障害組織の再生修復、さらにその過程における線維形成に何らかの役割を果たしていることが推測された。

共同研究者

井戸章雄 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患生活習慣病学
宇都浩文 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 講師
桶谷 真 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 講師
森内昭博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 助教
玉井 努 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学 特任助教
熊谷公太郎 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学
佐々木文郷 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学
呉 建 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
消化器疾患・生活習慣病学

A. 研究目的

オステオアクチビンは大理石骨症ラットから単離された遺伝子で骨芽細胞の分化に関与している。我々は、コリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラット肝臓において発現亢進している遺伝子群から同遺伝子を単離し、ヒト肝硬変および肝細胞癌組織においても発現していることを見出した。さらに、ヒト肝癌組織および非肝癌硬変肝組織においてもオステオアクチビンが発現増強し、肝癌細胞に強発現させたオステオアクチビンはその浸潤、転移を促進することを報告した。

オステオアクチビンはヒト乳癌細胞から単離された glycoprotein nmb (gpnm) および マウス樹状細胞から単離された DC-HIL のラットホモログであり、最近、急性肝障害モデルの肝マクロファージにおいて発現していることが報告され、さらにマクロファージなどの抗原提示細胞で発現されるオステオ

アクチピンは炎症のフィードバック調節因子として作用していること、また乳癌や多形性膠芽腫に発現するオステオアクチピンはその転移、進展に関与していることも報告されている。以上の結果から、オステオアクチピンは傷害組織に浸潤した抗原提示細胞に発現し、炎症の持続、傷害組織の再生・修復に関与するとともに、持続する炎症と繰り返される傷害組織の再生・修復を背景に発生する炎症性発癌に関与し、さらに癌細胞で発現するオステオアクチピンはその進展にも関与していることが推測される。

本研究の目的は、持続する肝炎から肝硬変、さらに肝発癌に到る過程において、障害肝のマクロファージに発現し、また肝硬変を背景に発生する肝癌で発現するオステオアクチピンの役割を明らかにすることである。

B. 研究方法

1. マクロファージのサイトカイン産生に及ぼすオステオアクチピンの影響

マウス・マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用いて下記の検討を行った。

(1) LPS を添加し、オステオアクチピンの発現を経時的に検討した。

(2) オステオアクチピンの siRNA を導入し、サイトカインの発現を検討した。

2. 急性肝障害モデルにおけるオステオアクチピンの発現

8週齢の C57BL/6 マウスに四塩化炭素 1 ml/kg を単回腹腔内投与し、下記の検討を行った。

(1) 血清 ALT および組織学的検討

(2) オステオアクチピンの発現: real-time RT-PCR、ウェスタン法、免疫組織化学染色、

(3) オステオアクチピン発現細胞の同定: 蛍光二重染色および肝臓より単離した単核球の FACS 解析

3. オステオアクチピンの肝障害および肝線維化に及ぼす影響

オステオアクチピン変異マウス (DBA/2J) および野生型マウス (DBA/2J-gpnmh+) に四塩化炭素 0.5 ml/kg を週 3 回、2 週間 腹腔内投与して肝障害

を誘導し、下記の検討を行った。

(1) 血清 ALT、組織学的検討

(2) オステオアクチピンおよび α smooth muscle actin (SMA) の発現: real-time RT-PCR、ウェスタン法、免疫組織化学染色

C. 研究結果

1. マクロファージのサイトカイン産生に及ぼすオステオアクチピンの影響

(1) マウス・マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞に LPS を 24 時間添加した。LPS 添加中、オステオアクチピンの発現は有意に低下したが、添加後の 48 時間および 72 時間後にオステオアクチピンは有意に発現亢進した。

(2) オステオアクチピンの siRNA を導入し、その発現を 80% 抑制すると、IL-1 β 、IL-6、TNF- α および MCP-1 の発現が有意に増強された。

2. 急性肝障害モデルにおけるオステオアクチピンの発現

(1) 四塩化炭素投与 48 時間後にみられた血清 ALT の上昇は 96 時間後には低下した。組織学的には投与 48 時間後にみられた炎症細胞浸潤、巣状壊死は 96 時間後には改善傾向を示した。

(2) オステオアクチピンは、投与 48 時間から 96 時間にかけて発現増強した。免疫組織化学染色では、組織学的に改善を認めた 96 時間後に、門脈域および壊死巣周囲に集族しているマクロファージおよび多核巨細胞にオステオアクチピンの発現が認められた。

(3) 蛍光二重染色および肝臓より単離した単核球の FACS 解析では、オステオアクチピン陽性細胞 90% 以上が CD68 陽性/CD11b 陰性であり、CD68 陽性細胞ではその約 50% にオステオアクチピンが発現していた。

3. オステオアクチピンの肝障害および肝線維化に及ぼす影響

(1) OA 変異および野生型マウスにおいて血清 ALT に差はみられなかったが、野生型マウスにおいて壊死巣周囲に多核巨細胞が有意に集族し、変異型

マウスに比して強い線維形成が認められた。

(2) 野生型マウスでは肝障害でオステオアクチビンの発現が亢進したが、変異型マウスでは肝障害誘導後もオステオアクチビン発現は誘導されなかった。一方、 α SMA の発現は野生型マウスに強く発現していた。

D. 考 察

炎症性サイトカインの産生を抑制するオステオアクチビンは、急性肝障害モデルにおいては肝障害の極期に遅れて、むしろその修復過程において肝マクロファージに発現亢進していることが明らかとなった。一方、オステオアクチビン発現細胞の90%以上がCD68陽性/CD11b陰性であり、またオステオアクチビン変異マウスでは肝障害の修復過程に壊死巣周囲に出現する多核巨細胞がみられないことから、オステオアクチビンは傷害組織の修復過程でアポトーシス細胞などを貪食するマクロファージに発現し、炎症および障害組織の再生と修復、さらにその過程で誘導される線維形成に重要な役割を果たしていることが推測された。興味深いことに、四塩化炭素単回投与（急性肝障害）では、オステオアクチビン野生型マウスよりも変異型マウスにおいて肝臓に強い α SMA発現がみられるのに対し、2週間投与（慢性肝障害）ではむしろ野生型マウスにおいて強い α SMA発現が誘導された（未発表データ）。線維化は傷害組織の再生・修復に必要な一つのステップと考えられるが、慢性炎症では傷害組織の再生・修復が破綻し、持続的な線維形成から、肝硬変などの病態を形成することが考えられた。以上のことから、オステオアクチビンという分子を通して炎症の調節および傷害組織の再生・修復の分子機構を解明することは、慢性肝炎から肝硬変への進展過程、さらには肝硬変を背景とした肝発癌の分子メカニズムの解明にとどまらず、肝硬変進展防止および肝発癌抑制を目的とした新たな治療法開発の分子基盤となることが考えられた。

E. 結 論

オステオアクチビンは組織傷害の極期に遅れて、CD68陽性の貪食能優位のマクロファージに発現していることから、炎症の調節（抗炎症）および傷害組織の再生・修復過程に何らかの役割を果たしていることが考えられた。さらに、急性の組織障害の修復過程における線維形成と、慢性持続性、かつ繰り返される組織傷害とその再生・修復によって誘導される線維化では、その分子機構が異なっていることが推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiramine K, Sata N, Ido A, Kamimura R, Setoyama K, Arai K, Nuruki N, Tanaka Y, Uto H, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor improves survival of rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via amelioration of pulmonary hemodynamics. (in press)
2. Hiramine Y, Imamura Y, Uto H, Koriyama C, Horiuchi M, Oketani M, Hosoyamada K, Kusano K, Ido A, Tsubouchi H. Alcohol drinking patterns and the risk of fatty liver in Japanese men. *J Gastroenterol.* 2010 (in press)
3. Tokunaga K, Uto H, Takami Y, Mera K, Nishida C, Yoshimine Y, Fukumoto M, Oku M, Sogabe A, Nosaki T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Insulin-like growth factor binding protein-1 levels are increased in patients with IgA nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 399: 144-9.
4. Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y, Ishida YI, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H. Identification of a novel

biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope labeling method. *Hepatol Res* 2010; 40: 438-45.

5. Takami Y, Uto H, Takeshita M, Kai H, Akamatsu E, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kataoka H, Tsubouchi H. Proanthocyanidin derived from the leaves of *Vaccinium virgatum* suppresses platelet-derived growth factor-induced proliferation of the human hepatic stellate cell line LI90. *Hepatol Res* 2010; 40: 337-45.
6. Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2010; 45: 459-67
7. Nishida C, Uto H, Oketani M, Tskunaga K, Nosaki T, Fukumoto M, Oku M, Sogabe A, Moriuchi A, Ido A, Tsubouchi H. Clinical significance of alanine aminotransferase levels and the effect of ursodeoxycholic acid in hemodialysis patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2010; 45: 326-34.

2.学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1.特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の抑制に関する研究
研究分担報告書

肝細胞癌の造影超音波像と病理像との比較

研究分担者 野村秀幸 国家公務員共済組合連合会 新小倉病院 診療部長

研究要旨：肝細胞癌は再発が多い。肝癌の再発を防ぐに当たって、肝癌の悪性度の評価が必要である。現在は病理組織像に頼っているが、治療前に画像診断で悪性度が予想できれば、治療効果の向上が見込まれる。悪性度の高い肝癌では太い血管が肝癌内にみられることが多医。今回はこの血管に注目し、造影超音波検査を用いて検討を行った。病理組織像で悪性度の高い症例には 100 μ m 以上の血管が多くみられた。これらは、腫瘍深度が体表面から 7cm 以下では高い一致率であったが、深くなると一致率が低下した。造影超音波検査で腫瘍内の動脈径を推定できれば肝癌の悪性度を評価する手段となり得る。

共同研究者

山下信行 新小倉病院 内科
相島慎一 九州大学形態機能病理学

A. 研究目的

肝細胞癌は再発が多く予後不良の癌である。その原因のひとつは、初発および再発の際に小結節でありながら組織型が中・低分化型肝細胞癌といった高悪性度の腫瘍が見られることである。予後を向上させるには初回診断時のみならず再発時にも癌の悪性度を評価し、それに基づいて効果が確実な治療を選択するべきである。しかし癌の悪性度を簡便に行える方法は未だ確立されておらず、腫瘍の大きさや個数のみにて治療が選択されているのが現状である。造影超音波検査では腫瘍内血管の同定が可能であり、造影所見により癌の悪性度を評価する試みもなされている。これまでの報告では腫瘍内に太い造影信号が観察されるもの、特に太く蛇行しているものは腫瘍の悪性度が高いことが知られるようになった。今回我々は造影超音波検査血管相の造影信号に着目し、組織標本上の血管（主に動脈）および組織構築との関連を検討する。これにより造影超音波検査で肝細胞癌の組織分化度あるいは悪性度を評価する理論的裏付けとしたい。

B. 研究方法

対象は 2009 年 11 月から 2010 年 10 月までに当院で肝切除術を受けた肝細胞癌症例 12 例である。男性 7 例、女性 5 例、平均年齢 68 歳、HBs 抗原陽性 1 例、HCV 抗体陽性 9 例であった。腫瘍径は 1.3cm から 4.0cm で平均 2.4cm であった。切除前 2 か月以内に肝動脈塞栓術あるいはケモリピオドリゼーションを行ったものが 3 例、初発あるいは

ラジオ波焼灼術後の再発が 9 例であった。造影超音波検査は東芝製 APLIO™ XG SSA-790A、プローブは PVT-375BT(3.5MHz) を使用した。腫瘍は体表より 25mm から 100mm、平均 62mm の深さに存在した。撮像モードは Pulse Subtraction Imaging monitor View、MI 値 0.25~0.3、FR 10~15Hz で観察した。造影剤はペルフルブタン注射用 0.0075ml/kg を静注した。投与後約 1 分後まで観察を行なった後、対象結節を捉えた断面の造影剤を高音圧照射で破壊し、Micro Flow Imaging を用い画像を作成した。画像は DICOM または AVI 形式で超音波装置内に保存し、検査終了後に腫瘍内に見られる造影信号を検討した。切除標本は超音波断面と一致するような割面で切片を作成し、HE 染色を行なった。血管は内膜、中膜、外膜を有する脈管の径を測定し、結節内での分布を調べた。

インフォームドコンセント

今研究開始前に、九州大学病院の倫理員会の承認を得た。患者へは、登録時に今研究について十分に説明し、承諾を得た。

C. 研究結果

造影超音波検査において造影信号が結節全体に広がっていく過程を観察したところ、MFI 開始約 1 秒後に比較的太く連続した造影信号が腫瘍辺縁から内部へ流入しているのが観察される結節があった。それらの結節の造影超音波画像断面と一致するように作成した組織標本において、HE 染色で 3 層構造を認める動脈性血管を調べたところ、MFI 開始約 1 秒後に認められる造影信号に一致した部位には短径 100 μ m 以上の比較的大きな血管が存在することが確認された。その血管の周囲には門脈や胆管などは見られなかった。この結果より MFI 開始約 1 秒

後での造影信号と組織標本での径100 μ m以上の動脈性血管の関連を検討した。14結節において切除標本では各結節1から15個、平均7.3個、計87個の径100 μ m以上の動脈性血管が同定された。一方MFI約1秒後では各結節0から13個、平均4.5個、計54個の造影信号が認められた。全体としては6割程度の一致率であったが、腫瘍が体表より5cm以内に存在すると70%以上が検出可能であり、8cmを超えると50%以下であった。

D. 考察

造影超音波検査は患者に大きな侵襲を加えることなく通常に近い状態で腫瘍を検索できる利点がある。今回の検討で用いた装置では体表から深部に位置する腫瘍の造影信号の検出率が低いという欠点が見られたが、機器の進歩により近い将来、汎用機種を用いても腫瘍内の造影信号が詳細に観察できるようになる可能性は高い。造影超音波検査において、肝細胞癌結節内に観察される造影信号により癌の分化度が推定されることがこれまでに報告され、太い血管が同定できる腫瘍は悪性度が高いことが明らかにされてきている。しかしながら現在まで動脈相で観察される信号が何に由来するかは明らかにされてなかった。今回のわれわれの検討では腫瘍内に線状に見られる造影信号は径100 μ m以上の筋性動脈の血流に由来すると考えられた。組織学的に門脈や胆管を伴っておらず、“Unpaired artery”と言われる腫瘍血管と思われる。径100 μ m以上の筋性血管は腫瘍に伴う新生血管としては大きすぎると考えられる。また腫瘍が膨張性に増殖する場合にはグリソン鞘は圧排されるか、もしくは消失し、太い動脈性血管が腫瘍内に存在することはないと思われる。したがって内部に太い血管が見られる腫瘍の増大過程としては、腫瘍がグリソン鞘を取り囲むように浸潤する場合や、ごく近距離の転移によりグリソン鞘を挟み込むように増殖していく場合が想定され、悪性度が高いことが示唆される。

E. 結論

体表から近い腫瘍においては造影超音波検査MFI像で高率に径100 μ m以上の動脈性血管が同定可能である。造影超音波検査により腫瘍内の動脈径を推定することが可能になれば、肝細胞癌の悪性度を評価する新たな手段として有用と思われる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kainuma M, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Shimono J, Shimoda S, Hayashi J. Pegylated interferon α -2b plus ribavirin for older patients with chronic hepatitis C. World J Gastroenterol. 16: 4400-9, 2010.

2. 学会発表

1) M. Nakamuta, R. Yada, A. Taketomi, M. Yada, T. Yoshimoto, N. Fukushima, K. Fukuizumi, Y. Maehara, H. Nomura, M. Enjoji ALTERATION IN LIPID AND GLUCOSE (INSULIN SIGNALING PATHWAY) METABOLISM-RELATED GENE EXPRESSION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA HAS IMPLICATIONS FOR TREATMENT USING LIPID MODULATORS. EASL (Vienna) 2010.
2) M. Nakamuta, T. Yoshimoto, S. Harada, T. Ohashi, N. Fukushima, K. Fukuizumi, T. Fujino, H. Nishi, T. Mizutani, N. Harada, H. Nomura, M. Enjoji. LIPID MODULATORS (STATINS AND EICOSAPENTAENOIC ACID) ACCELERATE THE DECLINE OF HCV VIRUS LOAD DURING TREATMENT WITH PEG-INTERFERON AND RIBAVIRIN. EASL (Vienna) 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

HBV 感染受容体同定に向けたアプローチに関する研究
研究分担者 上田 啓次 大阪大学大学院医学系研究科ウイルス学 教授

世界的に蔓延し日本にも約 150 万程度の感染患者が残存する HBV の生活環や病態発症機構の解明、治療法の開発開発のため、感染受容体を同定することによる感染系の確立を目指す。

A. 研究目的

HBV による病態発症機構は不明な点が多く、治療法自体 HBV の性質に基づく根本的治療が展開されているとは言い難い。ウイルス学上の最大の謎で HBV 学に残された最大の難問の一つである HBV 感染受容体を同定し、*vitro*、*vivo* 感染系を構築することで HBV による病態発症機構を解明し HBV の性質に立脚した治療法の開発をめざす。

B. 研究方法

感染受容体に対する HBV 側のリガンドが存在すると考えられる HBV 膜蛋白粒子外領域をプローブとした大腸菌発現ライブラリーのスクリーニング、培養がんがん細胞発現蛋白の pull-down-MS 解析による分離・同定を図る。

C. 研究結果

これまで別途進めてきた HBV pseudotype の作製と感染実験から培養肝がん細胞 HepG2 には HBV 付着因子の存在が示唆された。そこで HBV 膜蛋白の粒子外領域に相当する部分を大腸菌で大量発現・精製若しくは酵母による HBs 粒子の発現精製標品をプローブとして用い HBV 付着因子の分離を試みた。

D. 考察

現在、上記 pull-down 実験の条件検討を行っている。

HBV 膜蛋白の PreS1、PreS2、SS の N 端にそれぞれ特異的に結合する宿主因子の同定から感染受容体関連因子を含んだ種々の HBV 産生・分泌に関わる因子が同定可能と考えられる。

E. 結論

HBV 膜蛋白の PreS1、PreS2、SS の N 端にそれぞれ特異的に結合する宿主因子の同定から HBV 感染受容体の同定に迫ることが可

能であると思われた。またこのアプローチは HBV の産生・分泌に関わる種々の宿主因子の解明にも有用であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., Watanabe, S. "KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 394: 482-487, 2010.
- 2) 上田啓次. ヘルペスウイルス学のエッセンス 化学療法の領域 26:265-270, 2010.
- 3) 上田啓次. STEALTHING, PERSISTING ウイルスの謎「潜伏感染と再活性化」化学療法の領域. 上田啓次(企画) 26:1178-1179, 2010.
- 4) 上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) の潜伏感染、再活性化と病態. 化学療法の領域 26:1218-1226, 2010.
- 5) 上田啓次. B型肝炎ウイルスレセプターの謎. *Hepatoday* No. 23, 12, 2010.
- 6) 上田啓次. HHV-8 「病原細菌・ウイルス図鑑」新居志郎ら編、北海道大学出版会(印刷中)

2. 学会発表

1. Ueda, K., "Replication and gen regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus". (招待講演) International Symposium 'Infection and-associated Cancers', March 3-4, 2010, Sapporo.
2. 上田啓次. 「ヘルペスウイルスの潜伏と再活性化」熊本大学ウイルス感染症研究会(招待講演)平成 22 年 11 月 26 日、熊本.
3. 上田啓次、大崎恵理子、中野和司. 培養細胞における B 型肝炎ウイルスの感染能. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会.

2010年11月7～9日. あわぎんホール、徳島.

4. 大崎恵理子、中野和司、上田啓次. KSHV LANAの細胞内局在と複製・分配メカニズムとの関連動態解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7～9日. あわぎんホール、徳島.
5. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのvIRF-3/LANA2の発現制御機構の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会. 2010年11月7～9日. あわぎんホール、徳島.
6. 上田啓次、大崎恵理子、中野和司. カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) 潜伏感染における潜伏感染特異的遺伝子の発現機構の解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7～10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
7. 中野和司、大崎恵理子、上田啓次. HIF-2 α によるカポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) がコードするviral interferon regulatory factor 3 (vIRF-3) の発現制御機構の解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7～10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
8. 大崎恵理子、中野和司、上田啓次. KSHV ゲノムの複製・分配に関与するLANAの細胞内局在動態解析. 第33回日本分子生物学会年会. 2010年12月7～10日. 神戸ポートアイランド、神戸.
- 9.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

C型肝炎における PEGIFN/Ribavirin 併用療法後の発癌に関連する
臨床的背景因子の解析

研究分担者： 片野 義明 名古屋大学医学部附属病院消化器内科・講師

研究要旨：IFN 治療後においても発癌例はあり、発癌症例の特徴を解明することは、治療後のフォローアップの仕方を考えるうえで有用である。PegIFN α /Ribavirin 併用療法を行った C 型慢性肝炎患者のうち、本年度は発癌の有無につき追跡調査しえた 1198 例（男/女：630/568、1 型 69.8%、平均年齢 53.9 歳）を対象とし、発癌症例と非発癌症例との背景因子を比較検討した。PEGIFN α /RBV 併用療法後の全体での発癌率は、1 年 1.3%、3 年 4.4%、5 年 7.0% であり、49 例で発癌が認められた。発癌例は非発癌例に比し、有意に男性が多く、年齢が高く、肝組織進展例が多く、Alb 値が低く、非 SVR 例が多かった。発癌に関与する最も有意な因子は肝線維化進行度であったが、SVR が得られても、年齢の因子は大きく、高齢者においては発癌に十分注意する必要があることを明らかにした。

A. 研究目的

PegIFN/Ribavirin (RBV) 治療例における発癌症例と非発癌症例との背景因子を比較し、どのような症例で発癌しやすいかを検討する。またウイルスが駆除できた (Sustained virologic response : SVR) 症例と非 SVR 症例における発癌例の背景因子を比較し SVR となっても発癌した症例の特徴を解明し、PegIFN/REV 治療で SVR が得られた後のフォローアップの仕方の検討を行う。

B. 研究方法

2004 年 12 月から 2009 年 5 月の間に名古屋大学および関連施設において、PegIFN α /RBV 併用療法を行い、発癌の有無につき追跡調査しえた C 型慢性肝炎 1198 例（男/女：630/568、1 型 69.8%、平均年齢 53.9 歳）を対

象とし、発癌に関与する宿主因子およびウイルス因子を Cox 比例ハザードモデルおよび Kaplan-Meier を用いて解析した。

C. 研究結果

C 型慢性肝炎に対する PEGIFN α /RBV 併用療法の治療効果は、全体での SVR 率は 54.7% であり、1 型の SVR 率は 46.5%、2 型の SVR 率は 73.9% であった。

PEGIFN α /RBV 併用療法後の全体での発癌率は、1 年 1.3%、2 年 2.4%、3 年 4.4%、4 年 5.7%、5 年 7.0% であった。

49 例で発癌が認められた。発癌例は非発癌例に比し、有意に男性が多く、年齢が高く、肝組織進展例が多く、1 型が多く、血小板数が低く、

Alb 値が低く、ヒアルロン酸値が高く、非 SVR 例が多かった。また、1 型においては、有意に Core70 アミノ酸が変異している例が多かった。

SVR 例では 7 例に発癌が認められた。SVR 例における発癌例と非発癌例の比較では、発癌例は全例男性であり、有意に年齢が高く、線維化が進展しており、フェリチン値が高値であった。非 SVR 例における発癌例と非発癌例の比較でも発癌例は男性の割合が高く、年齢が高く、線維化進展例が多かったが、他に血小板数が低値で、Alb 値が低値であった。1 型における Core70 アミノ酸変異は SVR 例では症例数が少ないこともあり有意差はなかったが、非 SVR 例では発癌例で有意に変異例の比率が高かった。

発癌に関与する最も有意な因子は肝線維化進行度であり、その他有意な因子は、血小板数、ヒアルロン酸値、肝炎の活動性、PEGIFN/RBV 併用療法の治療効果、年齢、Core70 アミノ酸変異、AST 値、Alb 値、ウィルス型であった。

肝線維化別の 5 年発癌率は、F0-1 1.3%、F2 9.3%、F3-4 25.3%であり、肝線維化が進行するのにしたが有意に上昇した ($p < 0.0001$)。血小板数別 5 年発癌率は、16 万以上例が 1.8%であったのに対し、16 万未満例は 13.0%と有意に高かった ($p < 0.0001$)。PEGIFN/RBV 併用療法の治療効果別 5 年発癌率は、SVR 例で 2.0%であったが、再燃例 12.2%、無効例 13.6%であり、再燃例と無効例には有意差はみられなかった。年齢別 5 年発癌率は、60 歳未満

例が 1.8%であったのに対し、60 歳以上例では 14.6%と有意に高かった ($p < 0.0001$)。

D. 考察

今回 PEGIFN/RBV 併用療法後の発癌に関して解析できたのは、PEGIFN/RBV 併用療法を行った患者のうち約 44%であるが、患者背景の各因子はほぼ同等であり、母集団を反映しているものと考えられる。PEGIFN/RBV 併用療法後でも、IFN 治療歴のない患者と同様男性、高齢者、肝線維化進展例は発癌率が高い。F0-1 例では年齢による発癌率の差は見られないが、F2 以上では 60 歳未満に比し 60 歳以上は有意に発癌率が上昇した ($p = 0.0478$)。

治療効果別においては、SVR が得られると発癌率は有意に抑制されたが、今回の解析では、再燃例と無効例で差が見られなかった。今回は PEGIFN/RBV 治療終了後の ALT 値の経過については検討していないので、再燃例においては治療後の ALT 値が高値で経過していた症例が多かった可能性はある。SVR が得られても、年齢の因子は大きく、60 歳以上では 60 歳未満に比し有意に発癌率が高かった ($p = 0.0021$)。また、治療前の値ではあるがフェリチン値が高値であり、酸化ストレスの関与も示唆された。

SVR が得られやすいのは、年齢が低く、肝線維化が軽度で、血球数が多く、十分量の治療ができる患者であり、発癌抑制を考えると、早期に IFN 治療を考慮することが望ましい。

近年、1 型における SVR、あるいは

は NVR に関与する因子として、ウイルス側では core70 アミノ酸変異の有無、宿主側では IL28B 遺伝子多型の比重が大きい。今回症例数は少ないながら、非 SVR 例では core70 アミノ酸変異例が多く、自然経過例と同様これらの症例は治療後も発癌には注意を要すると思われた。

今後、さらに症例数を増やすとともに、PEGIFN/RBV 治療後の経過についても検討し、また遺伝子多型についても検討する必要がある。

E. 結論

高齢者、肝線維化進展例は SVR 例でも発癌に十分注意する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hayashi H, Pipemo A, Tomosugi N, Hayashi K, Kimura F, Wakusawa S, Yano M, Tatsumi Y, Hattori A, Pelucchi S, Katano Y, Goto H. Patients with chronic hepatitis C may be more sensitive to iron hepatotoxicity than patients with HFE-hemochromatosis. *Intern Med*(49) 2371-7, 2010.

Ishigami M, Hayashi K, Katano Y, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Impact of early elevation of serum bilirubin during treatment with pegylated interferon and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res*(40) 963-970, 2010.

Ishigami M, Kamei H, Nakamura T, Katano Y, Ando H, Kiuchi T, Goto H. Different effect of HBV vaccine after liver transplantation between chronic

HBV carriers and non-HBV patients who received HBcAb-positive grafts.

J Gastroenterol (In press)

Toyoda H, Kumada T, Tada T, Arakawa T, Hayashi K, Honda T, Katano Y, Goto H. Association between HCV amino acid substitutions and outcome of peginterferon and ribavirin combination therapy in HCV genotype 1b and high vireal load. *J Gastroenterol Hepatol*(25) 1072-8, 2010.

Hayashi K, Katano Y, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Yoshioka K, Yano M, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Prevalence and clinical characterization of patients with acute hepatitis B induced by lamivudine-resistant strains. *J Gastroenterol Hepatol*(25) 745-749, 2010.

Doisaki M, Katano Y, Nakano I, Hirooka Y, Ito A, Ishigami M, Hayashi K, Goto H, Fujita Y, Kadota Y, Kitaura Y, Bajoto G, Kazama S, Tamura T, Tamura N, Feng GG, Ishikawa N, Shimomura Y.

Regulation of hepatic branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase in a rat model for type 2 diabetes mellitus at different stages of the disease. *Biochem Biophys Res Commun* (393) 303-307, 2010.

Tachi Y, Katano Y, Honda T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Samejima Y, Goto H. Impact of amino acid substitutions in the hepatitis C virus genotype 1b core region on liver steatosis and hepatic oxidative stress. *Liver Int*(30) 554-559, 2010.