

201227004A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 紀夫

平成25（2013）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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 紀夫

平成25(2013)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
	江口 潤一	昭和大学大学院医学部 消化器内科学	助教
	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	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. 障害肝の修復過程における肝発癌の微小環境に関する研究・・・・・・・・・・ 5  
坪内 博仁
2. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN/RBV治療後の肝発がんについて・・・・・・・・ 8  
野村 秀幸
3. HBV感染受容体同定に向けたアプローチ・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 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・・・・・・・・ 14  
臨床的背景因子の解析  
片野 義明
5. 樹状細胞と抗TIM-3抗体を用いた肝癌に対する免疫療法の検討・・・・・・・・ 18  
江口 潤一
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. 持続性肝障害を基盤とした肝発癌機構・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23  
竹原 徹郎
8. 肝線維化進展C型肝炎に対するPeg-IFN/RBV併用療法の短期治療効果・・・・・・・・ 27  
および発癌抑制効果について  
平松 直樹
9. 原発性肝癌におけるTIE2陽性単球の意義・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 30  
考藤 達哉

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

### IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41

# 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と肝がんの分子・免疫病態を解明することを目的に研究を行う。Peg-IFN/RBV 併用療法後の C 型肝炎からの肝発がんに関与する因子について、大阪地区、名古屋地区、九州地区の 3 つの大規模コホートをを用いて解析を行った。肝発がんにおける持続的肝障害の意義、TEM による血管新生、腫瘍特異的な免疫応答等について基礎的な解析を行った。

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 型肝炎は早期に発見され、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 7 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説明を目指す。

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)、九州地区 (KULDS) 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ピ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) 肝障害を基盤とした肝発がん機構の解析：持続的肝障害を発現する遺伝子改変マウスを用いて、肝障害持続による発がん機構を解析する。

## 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)

肝線維化進展症例に対する Peg-IFN/RBV 併用療法では、中止率が高率で著効率が低率であったが、Late responder では延長投与にて著効率が向上した。肝線維化進展例においても、著効例や AFP が改善する症例では肝発がんが抑制されることが明らかとなった。

(名古屋地区)

Peg-IFN/RBV 併用療法後の発がん率は、1 年 0.6%、3 年 3.7%、5 年 5.9%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。高齢者でも SVR、Relapser は発がん率を低下させた。血小板数低値の高齢者において発がん率が高くなるが、SVR が得られた場合にはより強い発がん抑制効果が見られた。SVR が得られても高齢者、男性、線維化進展例は発がんに留意する必要がある。

(九州地区)

肝がん歴のない C 型慢性肝炎 1015 例に対する、PEG-IFN $\alpha$ 2b+RBV 治療後の肝がん発症に及ぼす影響を調査した。5 年肝がん発症率は 4.8% (49 例) で、多変量解析による肝がん発症予測因子は、男性、60 歳以上、血小板数 < 15 万、AFP > 10ng/dL、NVR であった。5 年累積発がん率は、SVR 3.4%、TR 5.4%、NVR 21.2%であり、SVR・TR 群は NVR 群に比べて有意に低率であったが、SVR 群と TR 群に差は認められなかった。高リスク群 (60 歳以上、血小板数 < 15 万、

Alb < 4.0g/dL) の 5 年累積発がん率は、NVR 群で 45.9%と高率であった。治療前の背景で、SVR 群と TR 群とでは、著明な差はみられなかった。

## 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 (PS1~SSN) の pull-down 法により幾つかの結合因子の存在が示唆された。

## 3) 炎症と肝発がん

OA は 障害肝の修復期に浸潤する CD68 陽性マクロファージに発現した。障害肝の修復期に浸潤するマクロファージを欠損させると肝障害が遷延化した。肝がんモデルにおいて VEGF 陽性マクロファージの浸潤がみられた。

## 4) 肝がんに対する免疫応答と免疫治療

HCC 患者では、末梢血とがん組織で TEM が増加していた。TEM の頻度は HCC 組織での micro-vessel density と相関しており、TEM の血管新生への関与が示唆された。In vitro において M-CSF、IL-1、TNF 刺激により CD16 陰性 TIE 陰性単球から TEM が誘導された。TEM は肝がんでの血管新生を反映する診断細胞 marker として有用である。

治療モデルでは樹状細胞と抗 PD-1 抗体併用療法で野生株腫瘍の増大が優位に抑制された。樹状細胞と抗 PD-1 併用療法では、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞および CD11c 陽性細胞が多く浸潤し、抗腫瘍効果への関与が示唆された。樹状細胞療法に抗 PD-1 療法を併用することで、腫瘍特異的 T 細胞反応が増強された。

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 (cyclophilin B, SART2, SART3, p53,

MRP3, AFP, hTERT) がスクリーニングされた。GMP グレードのペプチドワクチンを複製して肝がん患者に対する安全性臨床研究を施行した。臨床研究において、NCI-CTC グレード 3 以上の有害事象が出現しないことを確認した。また、病勢コントロール率 45%の治療効果や、標準治療による制御困難な症例における著効を認めた。

## 5) 肝がんにおける分子標的薬剤耐性機構

Bcl-xL もしくは Mcl-1 を欠損させ肝細胞アポトーシスを持続惹起させたマウスを用いて、肝細胞アポトーシスの持続が肝発がんに与える影響を検討した。いずれのマウスモデルでも、酸化ストレスの蓄積を伴って、1 年で高率に肝腫瘍の形成を認めた。Mcl-1 欠損マウスで認められた肝細胞アポトーシスは、アポトーシス促進蛋白質である Bak や Bid をさらに欠損させることで著明に抑制された。この Mcl-1/Bak、Mcl-1/Bid ダブル欠損マウスでは、酸化ストレスの蓄積だけでなく、腫瘍形成率も有意に低下した。また Mcl-1 欠損マウスに抗酸化剤である N-アセチルシステインを持続飲水させると、肝細胞アポトーシスは抑制されなかったが、酸化ストレスは減少し、腫瘍形成率も有意に低下した。以上より、肝細胞アポトーシスの持続は酸化ストレスの蓄積を介して肝発がんを誘導することが解明された。

## D. 考察と結論

Peg-IFN/RBV 併用療法後の C 型肝炎からの肝発がんに関与する因子について、3つの大規模コホートを用いて解析を継続し、最終的な結論をまとめた。肝発がんとは炎症・免疫応答、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））  
分担研究報告書

障害肝の修復過程における肝発癌の微小環境に関する研究

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:肝細胞癌は慢性肝炎、肝硬変を背景に発生し、慢性炎症と密接に関連（炎症性発癌）している。本研究では、肝障害とその再生・修復という一つの単位（急性肝障害）で、その修復期の微小環境、なかでも傷害組織の修復に重要な役割を果たしているマクロファージに着目して、肝発癌およびその進展に関わる微小環境を解析した。四塩化炭素で誘導した急性肝障害のピークに遅れて syngeneic な肝癌細胞を脾臓に接種したところ、肝障害のない対照群に比して著明に肝癌結節が発生した。さらに肝癌結節の周囲および内部に VEGF 陽性のマクロファージが集簇し、さらに VEGF 陽性マクロファージが内部に浸潤していた肝癌結節では肝癌細胞自体が VEGF を発現していた。これらの結果から傷害肝の修復のためにマクロファージから産生される VEGF が血管新生を介して肝癌結節の生着、進展に関与していることが示唆された。

傷害組織の再生・修復過程では抗炎症サイトカインのみならず、増殖因子などの血管新生や線維形成に重要な種々の液性因子が作用している。修復期マクロファージは障害肝の再生・修復に重要な役割を果たしているが、傷害組織の修復に重要な VEGF が肝癌結節の生着や進展にも関与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  
梶 一晃 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  
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  
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

A. 研究目的

肝細胞癌は慢性肝炎、肝硬変を背景に発生し、慢性炎症と密接に関連（炎症性発癌）している。しかし、持続あるいは繰り返す組織傷害とその再生・修復といった炎症と抗炎症が混在した複雑な微小環境において炎症性発癌や肝細胞癌の進展に関与している因子を明らかにすることは困難であった。

我々は肝障害のピークに遅れて浸潤するマクロファージを欠損させると障害肝の修復が遅延化することを見出した。一方、マクロファージには LPS や IFN- $\gamma$  による古典的活性化で炎症を促進する M1 マクロファージと IL-4 や IL-13 によって活性化される抗炎症の M2 マクロファージの二つの画分が存在することが報告されてきた。最近、傷害組織の修復過程では M2 系あるいは M1 系と M2 系の間間的な活性化状態である組織修復マクロファージが重要な役

割を果たしていることが報告されている。

本研究では、肝障害とその再生・修復という一つの単位（急性肝障害）で、その修復期の微小環境、なかでも傷害組織の修復に重要な役割を果たしているマクロファージに着目して、肝発癌およびその進展に関わる微小環境について解析した。

## B. 研究方法

### 1. 急性肝障害の修復過程における肝マクロファージの解析

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) F4/80 免疫組織化学染色によるマクロファージの浸潤とその分布

(2) 肝障害誘導 4 日目に単離した肝マクロファージの FACS 解析

### 2. 肝癌モデルにおけるマクロファージの解析

8週齢の C57BL/6 マウスに syngeneic なマウス肝癌細胞 Hepa1-6 株  $2 \times 10^6$  cells を脾注し、肝内に発生した肝癌結節について下記の検討を行った。

(1) CD68 免疫組織化学染色によるマクロファージの局在

### 3. 障害肝における肝癌結節の検討

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、その 2 日後に Hepa1-6 株  $5 \times 10^5$  cells を脾注し、下記の検討を行った。

(1) 肝癌結節の生着率、発生数

(2) CD68 および VEGF の免疫組織化学染色

## C. 研究結果

### 1. 急性肝障害モデルにおける肝マクロファージの解析

(1) F4/80 陽性マクロファージは肝障害の修復期に壊死巣周囲に集簇した。

(2) F4/80 陽性マクロファージの 94% が CD68 陽性マクロファージで、CD11b 陽性マクロファージは 12% にすぎなかった。

### 2. 肝癌モデルにおけるマクロファージの解析

(1) CD68 陽性マクロファージは肝内に発生した肝癌結節周囲に局在していた。

### 3. 障害肝における肝癌結節の検討

(1) 肝障害のない対象群 (n=10) では 1 匹 (生着率 10%) に 1 個の肝癌結節がみられたのみであったが、肝障害群 (n=8) では 5 匹 (生着率 63%) に計 223 個の肝癌結節がみられた ( $p=0.129$ )。

(2) 肝癌結節周囲あるいは肝癌結節内に CD68 陽性マクロファージが浸潤していた。VEGF 発現は CD68 マクロファージに認められたが、内部に CD69 陽性マクロファージが浸潤していた肝癌結節では肝癌細胞にも VEGF 発現が認められた。

## D. 考 察

障害肝の修復期には M1 系と M2 系の中間に位置する修復期のマクロファージが重要な役割を果たしていることが報告されている。さらに、傷害組織の再生・修復過程では抗炎症サイトカインのみならず、増殖因子などの血管新生や線維形成に重要な種々の液性因子が作用している。このような微小環境が肝発癌とその進展に及ぼす影響を検討するために、本研究では肝障害とその修復という過程、すなわち急性肝障害とそれに引き続く障害肝の修復において、肝癌細胞の生着と結節形成に関わる微小環境の要因を、特に組織修復マクロファージに着目して解析した。その結果、急性肝障害にピークに遅れて肝癌細胞を接種したところ、肝障害のない対照群に比して著明に肝癌結節が発生し、その周囲および内部に VEGF 陽性のマクロファージが集簇していることが明らかになった。さらに VEGF 陽性マクロファージが内部に浸潤していた肝癌結節では肝癌細胞自体が VEGF を発現していた。これらの結果から傷害肝の修復のためにマクロファージから産生される VEGF が血管新生を介して肝癌結節（固形腫瘍）の発生、進展に関与していることが示唆された。一方、肝癌結節には肝癌細胞自体が VEGF を発現しているものと、VEGF 発現を認めないものが認められた。

VEGF発現を獲得した肝癌結節はその後さらに増大、進展していくことが推測された。

本研究で行った急性肝障害/肝癌細胞接種モデルの解析から、人体における肝硬変、慢性肝炎を背景とした肝発癌のメカニズムとして肝癌周囲の非癌部肝組織（背景肝）の微小環境が極めて重要な役割を果たしていることが示唆された。またウイルス肝炎において抗ウイルス治療によってウイルスが排除され、持続する炎症が消失すると肝発癌が抑制されるという臨床成績を裏付ける基礎的研究成果と考えられた。

#### E. 結 論

障害肝の再生・修復期に肝癌細胞を接種すると、肝臓に生着、増大する肝癌結節数が有意に増加し、肝癌結節周囲あるいはその内部に浸潤したマクロファージには VEGF の発現が認められたことから、マクロファージから産生される、傷害組織の修復に重要な VEGF が癌化した肝細胞が固形腫瘍を形成し、

増大進展する過程にも強く関与していることが推測された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 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

C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/RBV 治療後の肝発がんについて

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：2004 年 12 月から 2009 年 8 月までに PEG-IFN/RBV 治療を行った 2871 例の C 型慢性肝炎の内、治療後長期間の観察が可能であった 1015 例について、肝発がん状況について多施設間で検討した。男性 500 例、女性 515 例、1 型 712 例、2 型 303 例、平均年齢 58.4 歳であった。肝発がん患者は 49 例（4.8%）であった。多変量解析による肝発がん因子は、性（男性）、年齢（60 歳以上）、血小板値（15 万/ $\mu$ L 未満）、AFP（10ng/dl）、PEG-IFN/RBV 治療効果（NVR）であった。PEG-IFN/RBV 治療効果別の累積肝発がん率による 5 年間の発がん率は、SVR：3.4%、TR：5.4%、NVR：21.2% で、NVR の発がん率は、SVR、TR に比べ有意に高かった。PEG-IFN/RBV 治療で SVR だけでなく、治療中に HCV RNA が陰性化した終了後再燃した TR 群でも肝発がんを抑制しうるということが認められた。

共同研究者

林純 九州大学病院総合診療科

A. 研究目的

C 型肝炎からの肝発がん患者は多く、肝発がんを抑制するためには、C 型肝炎患者の HCV を駆除することが重要である。2004 年より高ウイルスの C 型慢性肝炎患者に対して、PEG-IFN/RBV 治療が開始され、その治療効果および治療後の肝発がん状況などが検討されてきた。今回我々は、九州大学関連肝疾患研究会（KULDS）で集積されたデータを基に PEG-IFN/RBV 併用療法で肝発がんが抑制できたかどうか、また、著効者（sustained virological response: SVR）からの肝発がん患者には、どのような因子が関与しているかについて検討したので報告する

B. 研究方法

1) 対象：対象は、2004 年 12 月から 2009 年 8 月までに KULDS に登録された患者の内、今回の検討に賛同が得られた施設で、PEG-IFN/RBV 治療前に肝がん歴がなく、治療経過が観察可能であった 1015 例とした。男性 500 例、女性 515 例で、治療開始時期の平均年齢は 58.4 歳であった。治療前の検査データは、Hb 値 13.6 g/dl、血小板数 15.8 万/ $\mu$ l、Alb 値 4.1 g/dl、ALT 値 55.0IU/l、AFP 値 5.1ng/dl、HCV-RNA 量 6.4logIU/ml、1 型 712 例、2 型 303 例であった。患者へは治療前、KULDS への登録前に十分説明し、承諾を得た。

2) 治療方法

PEG-IFN/RBV は、PEG-IFN として PegIntron（80 $\mu$ g から 100 $\mu$ g）を用いて週

1 回皮下注を行い、Rebetol（400mg から 800mg）を毎日経口投与した。1 型へは 48 週から 72 週間、2 型へは 24 週間の治療を行い、治療後 24 週間に 1 回以上の腹部超音波検査を行い、1 年に 1 回以上の MRI または CT 検査を行った。

インフォームドコンセント

今研究開始前に、各病院の研究審査委員会の承認を得た。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

1) 肝がん歴のない患者に対する PEG-IFN/RBV 治療と肝発がん抑制効果について：PEG-IFN/RBV 治療後の肝発がん患者は 49 例（4.8%）であった。肝発がん患者と非発がん患者の背景因子は、肝発がん患者群では男性が有意に多く（ $p=0.0049$ ）、治療開始時の平均年齢は有意に高かった（ $p<0.0001$ ）。治療前のデータでは、肝発がん患者の血小板数は有意に低く（ $p<0.0001$ ）、Alb 値も有意に低値で（ $p=0.0018$ ）、ALT 値、AFP 値は有意に高値であった（ $p=0.0081$ ,  $p<0.0001$ ）。Hb 値と HCV RNA 量には差がみられなかった。

PEG-IFN/RBV 治療効果（SVR、Transient response: TR、再燃例、Non virological response: NVR、無効例）別の肝発がん率は、SVR は NVR に比べ有意に低く、TR も NVR に比べ有意に低かったが、SVR と TR 間での差はみられなかった。

多変量解析では、肝発がん予測因子としては、性（男性:  $p=0.0032$ ）、年齢（60 歳以上:  $p=0.0029$ ）、血小板数（15 万/ $\mu$ l 未満:  $p=0.0001$ ）、AFP（10ng/dl 以上:  $p=0.0003$ ）、と PEG-IFN/RBV 治療効果（NVR:

p=0.0006) が有意な予測因子であった。PEG-IFN/RBV 治療効果別の累積肝発がん率では、5 年目の SVR、TR、NVR の肝発がん率は 3.4%、5.4%、21.2%であった。NVR は SVR、TR に比べ有意に高かった (p=<0.0001, p=<0.0001)。今回の検討では、SVR のみならず、TR でも NVR に比べ、有意に肝発がんが抑制されていた。そこで、NVR に高齢者、Alb 低値者、血小板数減少者が多く含まれていることも考えられるので、60 歳以上、かつ血小板数 15 万/μl 未満、かつ Alb 値 4.0g/dl 未満の患者について、同様の検討を行った。累積肝発がん率では、5 年の肝発がん率は、SVR で 10.4%、TR 6.7%、NVR 45.9% であり、SVR でも 10% と高かったが、NVR では 45% とより有意に高かった。このことより、PEG-IFN/RBV 治療で SVR だけでなく、治療中に HCV RNA が陰性化した後終了後再燃した TR 群でも肝発がんを抑制しうるということが認められた。

2) SVR 後の肝発がん患者の検討：558 例の SVR 中 14 例に肝発がんがみられた。肝発がん患者と非発がん患者との背景因子では、性差、genotype 差はみられなかったが、開始時平均年齢は肝発がん患者が有意に高かった (p=0.0009)。治療前の検査では、肝発がん患者の血小板数が有意に低く (p=0.0020)、AFP 値は有意に高かった (p=0.0016)。Hb 値、ALT 値、Alb 値は差がみられなかった。多変量解析では、肝発がんの予測因子は、年齢 (65 以上 : p=0.00442)、血小板数 (15 万/μl 未満 : p=0.0051) であった。PEG-IFN/RBV 治療を高齢で開始した患者や開始時に血小板数が 15 万/μl 未満の患者では、SVR 後にも肝発がんがみられるので、厳重な観察が必要である。

#### D. 考察

今回の検討では、肝発がんの抑制に対して PEG-IFN/RBV 治療の有用性は認められた。SVR のみならず、TR においても NVR に比べ有意に肝発がんを抑制していた。TR 例では、治療後 HCV が再陽性化しても肝機能が持続正常化する患者がみられる。しかし、今回の検討では、治療後の ALT については検討できていないので、TR 群の肝発がん抑制が NVR に比べ低いのは不明である。PEG-IFN/RBV 治療では約 30% が治療後再燃する。今後は PEG-IFN/RBV/TVR による 3 剤併用治療ではほとんどの患者の HCV RNA が陰性化する。この 3 剤併用療法後の肝発がんが今回と同様に抑制できるか今後の課題である。

#### E. 結論

肝発がんの抑制に対して PEG-IFN/RBV 治療の有用性は認められ、SVR のみならず、TR においても NVR に比べ有意に肝発がんを抑制していた。

#### 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) Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Yamashita N, Oohashi S, Nishiura S. Occurrence of clinical depression during combination therapy with pegylated interferon alpha or natural human interferon beta plus ribavirin. *Hepatology Research* 2012; 42: 241-247.
- 2) Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Yamashita N, Ito K, Masaki N, Mizokami M. Increase in platelet count based on inosine triphosphatase genotype during interferon beta plus ribavirin combination therapy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 27: 1461-1466.
- 3) Miyagi Y, Nomura H, Yamashita N, Tanimoto H, Ito K, Masaki N, Mizokami M, Shibuya T. Estimation of two real-time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA during PEG-IFN plus ribavirin therapy by HCV genotypes and IL28B genotype. *J Infect Chemother*. 2013 (in press).
- 4) Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Maruyama T, Tanabe Y, Satoh T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi J. Efficacy of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment on the risk of hepatocellular carcinoma of patients with chronic hepatitis C: A prospective, multicenter study. *J Hepatol* 2013 (in pres).
- 5) Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi J; The Kyushu University Liver Disease Study Group. An inadequate dose of ribavirin is related to virological relapse by chronic hepatitis C patients treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. *J Infect Chemother* 2012; 18: 689-697.
- 6) Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to

peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. Hepatol Res. 2012; 42: 958-965.

7) Kainuma M, Furusyo N, Azuma K, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Shimoda S, Hayashi J; the Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) Group. Pegylated interferon  $\alpha$ -2b plus ribavirin for Japanese chronic hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase. Hepatol Res. 2012; 42: 33-41.

## 2. 学会発表

1) Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi J : Impact of pegylated interferon  $\alpha$ 2b plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C patients with history of hepatocellular carcinoma: Results from the Kyushu University Liver Disease Study . EASL (Barcelona) , 2012.

2) Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi J : IComplete hepatitis C virus elimination during pegylated interferon  $\alpha$ 2b and ribavirin treatment reduces the risk of progression to hepatocellular carcinoma: Results from the Kyushu University Liver Disease Study (KULDS) . EASL (Barcelona) , 2012.

3) Ogawa E, Furusyo N, Kajiwara E, Takahashi K, Nomura H, Tanabe Y, Satoh T, Maruyama T, Nakamuta M, Kotoh K, Azuma K, Dohmen K, Shimoda S, Hayashi J : Age is the most important risk of hepatocellular carcinoma of sustained virological responders to treatment for chronic hepatitis C: Results from the Kyushu University Liver Disease Study . EASL (Barcelona) , 2012.

4) Nakamuta M, Kohjima M, Ohishi Y, Fukushima N, Yoshimoto T, Fukuizumi K, Nakamura M, Ishibashi H, Honda A, Matsuzaki Y, Nozaki Y, Nakajima A, Nomura H , Enjoji M : Roles of a choline uptake transporter, the organic cation transporter 1 (OCT1), in pathogenesis of primary biliary cirrhosis: OCT1 expression and its single-nucleotide polymorphism. EASL (Barcelona) , 2012.

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。

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

HBV 感染受容体同定に向けたアプローチ  
研究分担者 上田 啓次 大阪大学・院・医ウイルス学 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の感染・増殖機構や治療法など HBV 問題の根本的解決策を見出すためには、ウイルス学的な知見を集積するとともに病態発症機構の解明や、治療法の開発に結びつける必要がある。しかしながら、HBV の *in vitro* 感染系は存在せず、HBV の生活環の詳細は不明な点が多く残されている。

本問題を解決するには、HBV 感染受容体を分離・同定し、簡便かつ有用な *in vitro* 感染系を樹立することが不可欠である。これまでの HBV pseudotype による感染性を指標にした HBV 感染受容体の分離・同定を試みた研究過程において、肝癌由来細胞株には少なくとも付着因子として機能する因子が存在することが示唆された。この仮説をもとに存在する付着因子の分離・同定を試み、幾つかの preS1（HBV 側リガンド）結合因子を分離した。

A. 研究目的

HBV による肝実質細胞への感染メカニズムと HBV 関連疾患の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。このような問題を解決するために、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、*in vitro*、*vivo* 感染系を構築することにより、HBV の詳細な生活環を明らかにし、HBV による病態発症機構を解明することで HBV の性質に立脚した治療法の開発をめざす。

B. 研究方法

HBV 感染受容体に対する HBV 側のリガンドがであると考えられる HBV 膜蛋白 large S 蛋白の N 末に存在する PreS1 領域を発現する大腸菌発現ベクター、GST-preS1-His<sub>6</sub> を構築した。本発現ベク

ターでは preS1 のコドン利用を大腸菌型に修正した配列にした。コントロールプローブは同じく大腸菌で発現・精製した GST-His<sub>6</sub> を用いた。

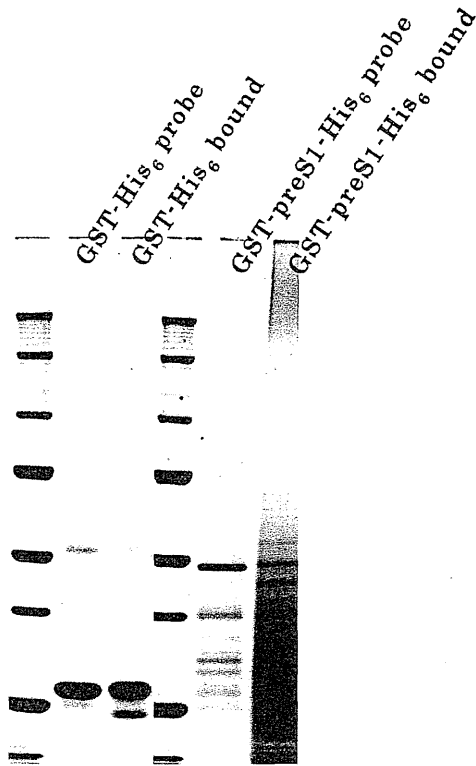
肝癌由来培養細胞株 HepG2  $5 \times 10^6$  から、低浸透圧緩衝液（10mM HEPES pH7.9, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 0.5mM DTT, 0.05% NP40, protease inhibitor [Sigma]）により、細胞膜～細胞質分画を得た（HepG2 lysate）。グルタチオンセファロースに結合した GST-preS1-His<sub>6</sub> 蛋白と GST-His<sub>6</sub> 蛋白各 2  $\mu$ g を HepG2 lysate（約 5mg）に加え、30 分室温にてインキュベーション後、低浸透圧緩衝液 2ml で 3 回洗浄した。

結合蛋白をサンプルバッファーで溶出し、SDS-PAGE にて分離、sypro-Ruby にて染色した。

C. 研究結果

preS1 に特異的に結合する因子を幾つか分離した（図）。





#### D. 考察

preS1結合因子を分離できたことは、培養肝癌細胞にはHBV付着因子自体は存在するが、何らかの理由で感染促進活性を欠如していると考えられた。

今後、分離した結合因子をMSにて同定し、HBV受容体としての活性を検討する。

#### E. 結論

HBV膜蛋白のPreS1に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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Ueda, K., Ito, E., Karayama, M., Ohsaki, E., Nakano, K., and Watanabe, S. "Kaposi's sarcoma-associated Virus governs gene expression profiles toward B cell transformation." In "Herpesviruses", Magel, D. G. and Tyring, S., ed., In-Tech ISBN 978-953-51-0186-4. pp93-104, 2012.

(2) Ueda, K., Ohsaki, E., Nakano, K., and Zheng, X. "Characterization of Kaposi's sarcoma-associated virus-associated lymphomas by DNA array analysis." In "Leukemia Research and Diagnosis in the Era of High-throughput Genome Analysis (LRD). Leukemia Research and Treatment. doi:10.4061/2011/726964

(3) Ohsaki, E. and Ueda, K. "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partition and Maintenance in the Latency." *Frontiers in Virology*. 3:7-19, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00007

(3) Nakano, K., Katano, H., Tadagaki, K., Sato, Y., Ohsaki, E., Mori, Y., Yamanishi, K., and Ueda, K. "Novel Monoclonal Antibodies for Identification of Multicentric Castleman's Disease; Kaposi's Sarcoma-Associated

Herpesvirus-Encoded vMIP-I and vMIP-II." *Virology* 425:95-102, 2012. doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.008

(4) Noma, S., Ohya-Shimada, W., Kanai, M., Ueda, K., Nakamura, T., Funakoshi, H. "Overexpression of HGF attenuates the degeneration of Purkinje cells and Bergmann glia in a knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 7." *Neuroscience Res.* 73(2):115-21. 10.1016/j.neures.2012.03.001.

(5) Ueda, K. "For the future studies of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus". *An Editorial*.

*Frontiers in Virology* 3: 1-2, 2012. doi: 10.3389/fmicb.2012.00237.

(6) Ueda, K. "Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic insults are Evaded." *J.Blood and Lymph2*:3, 2012. doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109.

(7) Ueda, K., Ohsaki, E., and Omori, H. "Successful Generation of Hepatitis B virus (HBV) Pseudotype; a versatile tool for Identification of the HBV Receptor and Investigation of HBV infectivity." *Biophys. Res. Comm.* under revision.

- (8) 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 (編集中)
- (9) 上田啓次. B型肝炎のウイルス学. 化学療法の領域 48:125-133, 2012.
- (10) 上田啓次. 遺伝子挿入HBVを用いた感染リセプターの探索. 肝胆膵 65:601-609, 2012.

厚生労働省科学研究費(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
分担研究報告書

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  $\alpha$ /Ribavirin 併用療法を行った C 型慢性肝炎患者のうち、本年度は治療効果および発癌の有無につき追跡調査しえた 1395 例(男/女:733/662、1 型/2 型:888/507、平均年齢 53.6 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  $\alpha$ /RBV 併用療法後の全体での発癌率は、1 年 0.6%、3 年 3.8%、5 年 5.4%であり、62 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 例が多く、治療終了 24 週後の ALT 値が低かった。発癌に関与する最も有意な因子は年齢であった。高齢者であっても SVR が得られると発癌率は低下した。高齢者における PEGIFN/Ribavirin 併用療法の有用性を明らかにした。

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。

また、65 歳以上を高齢者として、高齢者においても同様の検討を行い、高齢者で SVR が得られることのメリットがどの程度あるのかを検討する。

B.研究方法

2004 年 12 月から 2011 年 5 月の間に名古屋大学および関連施設において、PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法を施行し、治療効果および発癌の有無につき追跡調査しえた C 型慢性肝炎 1395 例(男/女:733/662、1 型/2 型:888/507、平均年齢 53.6 歳、観察期間中央値 47.7 ヶ月)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。高齢者は男性 133 例、女性 132 例であった。(倫理面の配慮)

検体は匿名化し、個人情報の守秘については十分注意を払った。

C.研究結果

C 型慢性肝炎に対する PEGIFN  $\alpha$ /RBV

併用療法の治療効果は、全体での SVR 率は 58.1%であり、1 型、2 型の SVR 率はそれぞれ 47.2%、77.1%であった。

PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法後の全体での発癌率は、1 年 0.6%、2 年 1.4%、3 年 3.7%、4 年 4.8%、5 年 5.9%であった。

62 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 例が多く、治療終了 24 週後の ALT 値が低かった。PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法の治療効果に大きく関与する IL28B 遺伝子多型は有意差を認めなかった。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。多変量解析では年齢が最も有意な因子であり、その他治療終了後 ALT 値、Alb 値、血小板数が有意な因子であった。

65 歳以上の高齢者における PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法の SVR 率は、1 型で 32.6%、2 型で 61.9%であり、非高齢者の 50.9%、80.1%に比し有意に低かった。非高齢者における治療効果別 5 年発癌率は SVR 例 2.1%、再燃例 4.9%、無効例 5.2%であり、再燃例と無効例に有意差はなかったが、高齢者においては、SVR 例で 4.7%であったが、再燃例 18.2%、無効例 27.7%であり、再燃例と無効例にも有意差がみられた。高齢者において、病態が進行していると考えられる血小板数 15 万未満例の 5 年発癌率は、SVR 例 6.2%、再燃例 22.9%、無効例 38.8%で治療効果により有意に発癌が抑制された ( $p=0.0038$ )。また、治療終了後 ALT 値 30 未満例の発癌率は 8.7%であったが 30 以上例は 45.5%で有意に発癌が抑制された ( $p<0.001$ )。

SVR 後 15 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、発癌例は有意に男性が多く、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 例では 47 例に発癌が認められ、やはり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。その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 アミノ酸変異は解析症例が少ないが、SVR 例では有意差はなかったが、非 SVR 例では発癌例で変異型の比率が高かった。

#### D. 考察

今回 PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法後の発癌に関して解析できたのは、PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法を行った患者のうち半数に満たないが、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。

単変量解析では 2 型に比し 1 型で有意に発癌率が高かったが、PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法の治療効果別に検討すると SVR 例、非 SVR 例とも genotype 間に差はなく、治療効果の影響によるところが大きいと考えられた。一方、1 型における Core70 アミノ酸変異に関しては、変異型は野生型に比し PEGIFN  $\alpha$ /RBV 併用療法の治療効果は有意に低い非 SVR 例における発癌例では 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より発癌には注意を要すると思われた。

高齢者は非高齢者に比し、SVR 率は低値であり、また有意に累積発癌率が高かった。しかし、高齢者であっても SVR が得ら