

201227004B

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22～24年度 総合研究報告書

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22～24年度 総合研究報告書

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・・・9  
野村 秀幸
3. HBV感染受容体同定に向けたアプローチ・・・12  
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・・・15  
臨床的背景因子の解析  
片野 義明
5. 樹状細胞、サイトカイン、抗体を用いた肝癌・消化器癌に対する免疫治療の検討・・・23  
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・・・28  
中本 安成
7. 肝細胞癌のオートファジー誘導と抗がん癌耐性に関する検討・・・32  
竹原 徹郎
8. Hepatitis C Treatment by Peg-IFN plus Ribavirin in Special Populations ・37  
(aged patients, patients with severe fibrosis and patients with normal ALT)  
平松 直樹
9. 原発性肝癌におけるTIE2陽性単球(TEM)の意義・・・43  
考藤 達哉

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・49

### IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・63

# 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）  
平成 22～24 年度 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発症・進展の分子・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、TIE2 陽性単球による血管新生、腫瘍特異的な免疫応答とワクチン治療、肝障害からの肝がん発症機構、肝がんの分子標的薬剤に対する耐性獲得機構等について基礎的な研究を行った。

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 の併用投与が標準となったが、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 8 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)、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。持続的肝障害を発症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。

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) 肝がんの分子標的薬剤耐性機構の解析：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 治療を行った 2,600 例の C 型肝炎患者について発がん率を検討し、以下の知見を得た。1)肝発がんに関与する独立因子は高齢、男性、血小板低値、AFP 高値、PEG-IFN/RBV 無効であった。2)SVR 例、再燃例では治療効果判定時の AFP 値が治療前より有意に低下した。3)SVR 例における発がんに関与する因子として治療効果判定時の AFP 高値が抽出された。4)非著効例からの発がんに関与する独立因子は高齢、男性、血小板低値、治療効果判定時の AFP 高値、治療効果判定以降の平均血清 ALT 高値であった。以上より、PEG-IFN/RBV 併用治療においてウイルス排除群では発がん率が有意に抑制されており、また非著効群では ALT を低下させることが発がんを抑制する上で重要であることが示された。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)

名古屋地区の PEG-IFN/RBV 治療コホート 1,395 例を対象に発がんに関する解析を行った。肝発がんに関与する独立因子は年齢、血小板、治療終了 24 週後 ALT 値であっ

た。

#### (九州地区)

九州地区 (KULDS) PEG-IFN/RBV 治療コホート 1,051 例を対象に発がんに関する解析を行った。肝発がんに関与する独立因子は男性、60 歳以上、血小板 15 万/ $\mu$ l 未満、AFP 10 ng/dl 以上、PEG-IFN/RBV 治療 NVR であった。

#### 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。B 型肝炎ウイルス感染受容体候補として preS1 と相互作用する因子を 4 種類同定した。

#### 3) 炎症と肝発がん

マウスの四塩化炭素肝障害モデルにおいて、CD68 陽性マクロファージにオステオアクチピン発現が誘導され、このことが組織修復、がん結節の生着と発育に関与することを明らかにした。

肝細胞アポトーシスを自然発症する遺伝子改変マウス (肝細胞特異的 Mcl-1 KO マウス) は生後早期より ALT 上昇が持続するが、1 年以上の飼育により高率に多発性の肝がんを発症することを明らかにした。肝細胞障害の持続が発がんの十分条件であることが実験医学的に証明された。

#### 4) 肝がんに対する免疫応答と免疫治療

慢性肝疾患からの肝がんの発生に伴い末梢血中の TIE2 陽性単球 (TEM) が増加することを見出し、TEM が腫瘍の血管新生に関与することを示した。

マウス腫瘍モデルにおいて IFN $\alpha$  遺伝子治療と抗 PD-1 抗体治療、樹状細胞治療と抗 PD-1 抗体あるいは抗 TIM-3 抗体治療の併用

が有効であることを明らかにした。

肝がん患者に対する内科的局所治療により CypB、SART2、SART3、p53、MRP3、AFP、hTERT に対する T 細胞応答が増強することを明らかにした。GMP グレードのペプチドワクチンを作成し、進行肝がん患者 20 例 (Stage III/IVA/IVB: 11/2/7, Child-Pugh A/B: 8/12) に対する安全性臨床研究を施行した。安全性に関して、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。また治療効果について、CR1 例; SD8 例; PD11 例 (病勢コントロール率: 45%) を認め、進行肝がんに対するペプチドワクチンの有効性が示唆された。

#### 5) 肝がんの分子標的薬剤耐性機構

肝がん細胞ではソラフェニブ治療によりオートファジーが誘導され、これにより治療抵抗性が付与されることを示し、オートファジーを抑制するクロロキンの投与によりソラフェニブの抗腫瘍効果が増強することを前臨床モデルで明らかにした。

### 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行った。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。今後の課題として、1) PEG-IFN/RBV 治療コホートをより長期に観察し、肝発がんおよび肝疾患関連死の発生について詳細に解析する、2) ペプチドワクチン治療の安全性と発がん抑制効果について検討していく、3) 肝障害を基盤とした発がんメカニズムについて基礎的に解明する、4) 肝臓の炎症発がんの分子機序を解明する、5) 慢性肝障害にお



ける AFP 上昇のメカニズムとその影響についてモデル動物を開発し解明する、7)肝底護療法によるアポトーシス抑制と発がん抑止効果について臨床的に明らかにする、8)AFPの改善による発がん抑止効果について臨床的に明らかにする、等の検討が重要である。

## 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、マクロファージに発現するオステオアクチビンの役割と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修復期に浸潤するマクロファージにオステオアクチビンは強く発現しており、障害肝の再生・修復に重要な役割を果たしていた。一方、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・修復過程では組織修復マクロファージが必要な役割を果たしており、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。これらの組織修復マクロファージから産生される液性因子が癌化した肝細胞の発育、進展に関与していることが示唆された。

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。

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。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 (gpnmb) 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。

本研究では、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し、さらに肝障害とその再生・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解析: 蛍光二重染色および肝臓より単離した単核細胞の FACS 解析

### 2. 浸潤マクロファージの肝障害およびその修復に及ぼす影響

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48時間後に Clodronate 200  $\mu$ L を腹腔内投与して下記の検討を行った。

- (1) 血清 ALT、組織学的検討
- (2) 免疫組織化学染色によるオステオアクチピンおよび CD68 の発現

### 3. 肝硬変モデルにおけるオステオアクチピン発現

## マクロファージの検討

8週齢の C57BL/6 マウスに Thioacetamide (TAA) 100 mg/kg を週 2 回、8 週間腹腔内投与し、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、

### 4. 肝癌モデルにおけるマクロファージの検討

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、肝内に多発肝癌結節を作製、下記の検討を行った。

- (1) 免疫組織化学染色による CD68 およびオステオアクチピンの発現

### 5. 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 時間にかけて発現が増強した。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簇しているマクロファージにオステオアクチピンの発現を認め、オステオアクチピン陽性マクロファージには貪食像が認められた。

- (3) 蛍光二重染色および肝臓より単離した単核細胞の FACS 解析では、浸潤したマクロファージ (F4/80 陽性) のほぼ全てが CD68 または CD11b

陽性であり、オステオアクチビン陽性細胞 90%以上が CD68 陽性/CD11b 陰性であり、CD68 陽性細胞ではその約 50%にオステオアクチビンが発現していた。

## 2. 浸潤マクロファージの肝障害およびその修復におよぼす影響

(1) 四塩化炭素投与 48時間後に Clodronate にて浸潤マクロファージを欠損させると、四塩化炭素投与 96 時間後も ALT が優位に上昇しており、組織学的にも広範な壊死巣が残存しており、肝障害が遷延化していることが考えられた。

(2) 免疫組織化学染色では、CD68 およびオステオアクチビン、いずれの発現細胞も欠損していた。

## 3. 肝硬変モデルにおけるオステオアクチビン発現マクロファージの検討

(1) 8 週間の TAA 反復投与において、血清 ALT 値は漸増し、組織学的にも線維化が誘導された

(2) オステオアクチビンの発現は血清 ALT 値に平行して漸増し、TAA 投与終了 2 週間後まで発現が増強していた。免疫組織化学染色および蛍光二重染色では、オステオアクチビンは線維形成部位周囲に浸潤した CD68 陽性マクロファージに発現していた。

## 4. 肝癌モデルにおけるマクロファージの解析

(1) Hepa 1-6 を接種すると多数の肝癌結節が肝内に発生した。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、その一部のマクロファージにはオステオアクチビンの発現が認められた。

## 5 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。

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陽性マクロファージの約 90%が CD68 陽性であり、また肝障害の修復期に浸潤するマクロファージの大部分が CD68 陽性であることから、マクロファージを欠損させたところ、肝障害が遷延化し、その修復が顕著に抑制された。以上の結果から、オステオアクチビンは修復期のマクロファージに発現し、むしろ抗炎症に作用することが考えられる。一方、肝内に接種した肝癌結節周囲にもオステオアクチビン発現マクロファージが集簇していたことから、抗炎症および障害組織の再生・修復誘導作用が、肝癌が発生あるいは発育・進展する微小環境に深く関与していることが推測された。そこで、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、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

1. Tamai T, Uto H, Takami Y, Oda K, Saishoji A, Hashiguchi M, Kumagai K, Kure T, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential markers for hepatitis C

virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17:4890-4898

2. Oda K, Ido A, Tamai T, Matsushita M, Kumagai K, Mawatari S, Saishoji A, Kure T, Ohno K, Toyokura E, Imanaka D, Moriuchi A, Uto H, Oketani M, Hashiguchi T, Tsubouchi H. Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Oncol Rep* 2011; 26: 1227-1233
3. 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.

## 2. 学会発表

1. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉建, 高見陽一郎, 佐々木文郷, 小田耕平, 最勝寺晶子, 橋口正史, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 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 第 47 回日本肝臓学会総会. 2011 年 6 月. 東京
2. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉建, 梶一晃, 大野香織, 小田耕平, 最勝寺晶子, 今中大, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 肝炎進展に伴い発現するオステオアクチビンは肝マクロファージの食食に関与する 第 15 回 JDDW2011. 2011 年 10 月. 福岡
3. 熊谷公太郎, 井戸章雄, 呉建, 梶一晃, 大野香織, 小田耕平, 最勝寺晶子, 今中大, 馬渡誠一, 玉井努, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷眞, 坪内博仁. 障害肝において発現するオステオアクチビンは肝マクロファージの食食に関与する 第 48 回日本消化器免疫学会総会. 2011 年 7 月. 金沢

## 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 が陰性化したが発がん再燃した TR 群でも肝発がんを抑制しうることが認められた。

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/ $\mu$ l 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/ $\mu$ l 未満 : p=0.0051) であった。PEG-IFN/RBV 治療を高年齢で開始した患者や開始時に血小板数が 15 万/ $\mu$ l 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 histology 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。

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、病態発症機構、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ことが必要である。しかしながら、HBVの有効かつ簡便なin vitro、vivo感染系は存在せず、これらの問題は多くが未解決のままである。

そこで、これまでに試みられていない方法でHBV感染受容体を分離・同定を試み、簡便なin vitro、in vivo感染系を樹立することを考案した。当初は、大腸菌発現・精製したHBV側リガンドであるpreS1をプローブにヒト肝臓cDNAファージ発現イブラリーをスクリーニングし、幾つかの候補因子を得たが、HBV受容体としての活性は検出できなかった。そこで、HBV pseudotypeの作製を試み、感染性を指標にしたHBV感染受容体の分離・同定を試み、その研究過程において、元来HBVの感染が認められない肝癌由来細胞株に、少なくとも付着因子として機能する因子が存在し、その活性化過程に問題があることが示唆された。preS1をプローブにした肝癌由来培養細胞株HepG2抽出液から幾つかの特異的な結合因子を分離した。今後、MSなどで同定に迫るとともにHBV受容体としての活性の検討を行う。

#### 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。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、in vivo感染系を構築することにより、HBVの感染メカニズムを明らかにし、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

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（PreS1領域）プローブとした大腸菌発現ファージライブラリーのスクリーニング、培養肝癌細胞株発現蛋白のpull-down法-MS解析による分離・同定を試みた。

#### （倫理面への配慮）

現段階では特に該当する実験・研究は無いものと思われた。

#### C. 研究結果

大腸菌発現ファージライブラリーのスクリーニングでは#1-3-2、#4-2-1、#9-6-1、#9-6-2、#12-4-3、#15-4-1（都合により詳細は省略）が候補因子として分離された。全長cDNAをクローニングし、PreS1との相互作用やHBV受容体としての活性は証明できなかった。

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癌細胞HepG2にはHBV付着因子の存在と、この付着因子はある処理（この場合は哺乳類細胞発現cDNAライブラリーの導入処理）により、活性化するのではないかという示唆が得られたため、PreS1をプローブとして用い、付着因子の分離を試み、幾つかの特異的な

因子の存在を確認した。

#### D. 考察

HBV 受容体の分離・同定は、ウイルス学のみならず、生命科学に残された難問の一つと認識している。これまで多くの研究者が挑んできたが、そのかけらも明らかになっておらず、熟考された画期的なアイデアに基づく手法が必要かと思われた。そこで、HBV pseudotype の作製を試み、感染性を指標にした HBV 感染受容体の分離・同定を試みたが、感染性スクリーニングの途上、本来、HBV に感受性はないと思われていたヒト肝癌由来培養細胞株にある処理を加えると HBV に感染性を示すことを見出した。この現象は、元来 HBV の感染が認められない肝癌由来細胞株に、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を示すもので、今回、HBV 膜蛋白 large S の N 端にある preS1 領域をプローブにして、幾つかの結合因子を分離した。これらの因子の同定と HBV 受容体としての活性検討が今後の課題となる。

#### E. 結論

HBV 膜蛋白の PreS1 に特異的に結合する宿主因子が現存肝癌由来培養細胞株に存在し、その分離・同定から HBV 感染受容体の本体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., Watanabe, S. “KSHV-infected PEL cell lines exhibit a distinct gene expression profile.” *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 394: 482-487, 2010.
- 2) Suzuki, T., Isobe, T., Kitagawa, M., and Ueda, K. “Kaposi’ s sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA positively affects on ubiquitylation of p53.” *Biochem. Biophys. Res. Comm.*

403: 194-197, 2010.

- 3) 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 Tying, S., ed., In-Tech ISBN 978-953-51-0186-4. pp93-104, 2012.
- 4) 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:10.4061/2011/7269642.
- 5) 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.
- 6) 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
- 7) 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.
- 8) 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.

該当無し

3. その他

- 9) Ueda, K. “Kaposi’ s Sarcoma-associated Herpesviru Induced Tumorigenesis; how viral oncogenic Insults are Evaded.” J.Blood and Lymph 2:3, 2012.  
doi.org/10.4172/2165-7831.1000e109.
- 10) 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
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 上田啓次. B型肝炎ウイルスレセプターの謎. Hepatoday No.23, 12, 2010.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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)

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録