

20. Klein HG, Anderson D, Bernardi MJ, Cable R, Carey W, Hoch JS, Robitaille N, Sivilotti ML, Smaill F. Pathogen inactivation: making decisions about new technologies. Report of a consensus conference. *Transfusion* 2007;47:2338-47.
21. McCullough J. Pathogen inactivation: a new paradigm for preventing transfusion-transmitted infections. *Am J Clin Pathol* 2007;128:945-55.
22. Allain JP, Hewitt PE, Tedder RS, Williamson LM. Evidence that anti-HBc but not HBV DNA testing may prevent some HBV transmission by transfusion. *Br J Haematol* 1999;107:186-95.
23. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Günther S, Hess G, Hüdig H, Kitchen A, Margolis H, Michel G, Trepo C, Will H, Zanetti A, Mushahwar I. Serological pattern "anti-HBc alone": report on a workshop. *J Med Virol* 2000;62:450-5.
24. Gerlich WH, Wagner FF, Chudy M, Harritshoj LH, Lattermann A, Wienzek S, Glebe D, Saniewski M, Schüttler CG, Wend UC, Willems WR, Bauerfeind U, Jork C, Bein G, Platz P, Ullum H, Dickmeiss E. HBsAg non-reactive HBV infection in blood donors: transmission and pathogenicity. *J Med Virol* 2007;79:S32-S36.
25. Dreier J, Kröger M, Diekmann J, Götting C, Kleesiek K. Intermittent HBV viremia in an anti-HBc and anti-HBs-positive blood donor. *Transfus Med* 2005;15:65-6.
26. Stramer SL, Zou S, Notari EP, Foster GA, Krysztof DE, Musavi F, Dodd RY. Blood donation screening for hepatitis B virus markers in the era of nucleic acid testing: are all tests of value? *Transfusion* 2012;52:440-6.
27. Kino S, Tomoda Y, Itoh Y, Karasaki H, Kasai S. Implementation of pre- and post-transfusion viral marker tests at Asahikawa medical college hospital. *Jpn J Transfus Cell Ther* 2009;55:21-8.
28. Hollinger FB, Dodd RY. Hepatitis B virus traceback and lookback: factors to consider. *Transfusion* 2009;49:176-84.
29. Yang MH, Li L, Hung YS, Hung CS, Allain JP, Lin KS, Tsai SJ. The efficacy of individual-donation and minipool testing to detect low-level hepatitis B virus DNA in Taiwan. *Transfusion* 2010;50:65-74.
30. Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, Rabenau H. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. *J Med Virol* 2001;64:312-9.
31. Bréchet C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Bréchet P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely "occult"? *Hepatology* 2001;34:194-203.
32. Alhababi F, Sallam TA, Tong CY. The significance of "anti-HBc only" in the clinical virology laboratory. *J Clin Virol* 2003;27:162-9.
33. Levicnik-Stezinar S, Rahne-Potokar U, Candotti D, Lelie N, Allain JP. Anti-HBs positive occult hepatitis B virus carrier blood infectious in two transfusion recipients. *J Hepatol* 2008;48:1022-5.
34. Inaba S, Ito A, Miyata Y, Ishii H, Kajimoto S, Tanaka M, Maruta A, Saito S, Yugi H, Hino M, Tadokoro K. Individual nucleic amplification technology does not prevent all hepatitis B virus transmission by blood transfusion. *Transfusion* 2006;46:2028-9.
35. Candotti D, Allain JP. Transfusion-transmitted hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2009;51:798-809.
36. Liu CJ, Lo SC, Kao JH, Tseng PT, Lai MY, Ni YH, Yeh SH, Chen PJ, Chen DS. Transmission of occult hepatitis B virus by transfusion to adult and pediatric recipients in Taiwan. *J Hepatol* 2006;44:39-46. ☒

医学のあゆみ

第1土曜特集

2012

8/4

第242巻・第5号 (通巻2913)
2012年8月4日発行 (毎週土曜日発行)
昭和21年7月27日第3種郵便物認可
[ISSN 0039-2359 CODEN:IGAYAY]

B型肝炎 —最新治療コンセンサス2012

企画 溝上雅史 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター

疫学

B型肝炎に関する疫学調査の最新情報

対策をめぐる最新情報

小児B型肝炎の感染予防と最近の治療法

Genotype AによるB型肝炎の拡大とその特徴

HBVウイルスマーカーとその臨床応用

HBV無症候性キャリアの自然経過と診療——定期診療の必要性

治療の最新情報

B型肝炎に対する抗ウイルス治療

わが国におけるB型肝炎の実態と治療

B型肝炎に対する核酸アナログ製剤治療の最新情報

核酸アナログ製剤の長期投与成績——ラミブジン、アデフォビル、エンテカピルの長期成績

PegIFNとHBs抗原量

癌化学療法によるB型肝炎ウイルス再活性化の対策と問題点

HIV/HBV共感染者の現状とその治療

肝細胞癌局所療法: ラジオ波焼灼術 (RFA)

HBVに対する最新の肝移植事情——肝移植後のHBV再感染と*de novo*肝炎に対する対応

B型肝炎に対する新薬開発の最新情報

基礎研究の最新情報

B型肝炎病態研究の最新情報——B型肝炎動物モデル

ゲノム解析技術のHBVへの臨床応用

ゲノミクスによるB型肝炎の特徴

感染予防の最新情報

ユニバーサルワクチネーション導入に向けて——克服すべき問題点

献血者におけるHBV感染状況

医歯薬出版株式会社

<http://www.ishiyaku.co.jp/>

333	HBV に対する最新の肝移植事情 ——肝移植後の HBV 再感染と <i>de novo</i> 肝炎に対する対応……………市田隆文・玄田拓哉
350	B 型肝炎に対する新薬開発の最新情報……………大石和佳・茶山一彰
	基礎研究の最新情報
407	B 型肝炎病態研究の最新情報——B 型肝炎動物モデル……………杉山真也・溝上雅史
473	ゲノム解析技術の HBV への臨床応用……………西田奈央
481	ゲノミクスによる B 型肝炎の特徴……………本多政夫・金子周一
	感染予防の最新情報
489	ユニバーサルワクチネーション導入に向けて ——克服すべき問題点……………山田典栄・四柳 宏
494	献血者における HBV 感染状況……………内田茂治

■サイドメモ目次

397	HBV-cccDNA
399	遺伝子型
411	核酸アナログ治療の際の注意点
414	急性肝不全 vs. 劇症肝不全
444	HBV 予防ワクチン
474	連鎖分析と関連分析
493	次号の特集予告

献血者におけるHBV感染状況

Prevalence of HBV in volunteer blood donors in Japan



内田 茂治

Shigeharu UCHIDA

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所感染症解析部

◎献血者におけるHBs抗原陽性率は、陽性通知の効果もあって年々低下してきている。年代別では50歳代をピークとして高齢者側で陽性率が高く、若年者側での陽性率は低い。とくに1985年6月から開始された、公費による“B型肝炎の母子感染防止対策事業”開始以降の出生者で陽性率の低下は顕著である。地域別では従来から報告されている北海道・九州の陽性率が高く、ついで中四国、近畿、東北、関東甲信越・東海北陸の順である。HBs抗原陽性者の約9割はB型肝炎ウイルス(HBV)キャリアと考えられ、残りの約1割は新規感染者と考えられた。HBVキャリアでは日本で多いといわれている遺伝子型Cと遺伝子型Bで大半を占めるが、新規感染者では遺伝子型Aが約2割を占め、外国型HBVが性感染症として国内で広がっている。さらなる感染の拡大も危惧されており、HBワクチン接種などの水平感染防止対策の検討が必要であると思われる。



Key word: 献血者, HBs抗原陽性率, HBVキャリア, HBV新規感染, HBV遺伝子型

B型肝炎はかつて日本の国民病といわれていたが、1985年6月から全国の医療機関で開始された公費負担による“B型肝炎母子感染防止対策事業”の成果により、それ以降の出生児にはB型肝炎ウイルス(HBV)キャリアが激減した^{1,2)}。また、成人におけるB型急性肝炎は一過性の経過で治癒すると考えられてきたため、HBVによる慢性肝疾患は将来きわめてまれになると考えられてきた。しかし近年、欧米型のB型急性肝炎が性感染症として国内で急速に拡大し、しかも感染者の約10%が慢性化するといわれているため、universal vaccinationなどのあらたな対策の必要性が議論されてきている³⁾。

本稿では献血者におけるHBV感染の現状を概説したい。

献血者における HBs抗原・HBc抗体陽性率

1965年にBlumbergらによって、オーストラリア原住民の血清から血清蛋白の亜型とは異なる性質をもった抗原が発見された⁴⁾。1968年にこの抗

原が血清肝炎と密接な関係にあることが報告され⁵⁾、1970年にはHBV粒子(Dane粒子)が発見された⁶⁾。日本では献血者のHBs抗原検査が1972年1月から全国の血液センターで導入された。

明確なデータが存在する1985年以降のHBs抗原陽性率を図1に示す。HBs抗原陽性献血者には当初から陽性通知を行っていたため、その陽性率は1987年の1.30%から連続的に低下し、2007年には0.04%(献血者494万人、HBs抗原陽性者2,036人)にまで減少している。2008年に検査法が従来の逆受身赤血球凝集試験(reversed passive hemagglutination test: RPHA法)から化学発光酵素免疫測定法(chemiluminescent enzyme immunoassay: CLEIA法)へと変更になり、2008年の陽性率は0.12%(献血者508万人、HBs抗原陽性者6,172人)と急増した。当初は検出感度が数百倍上がったためと考えられたが、吸収試験陰性、HBc抗体陰性、およびHBV-DNA陰性の擬陽性が多数含まれていることが判明した。また、HBc抗体検査は1989年に導入され、2度の合否基準変更により1998年には陽性率が2.20%にまで

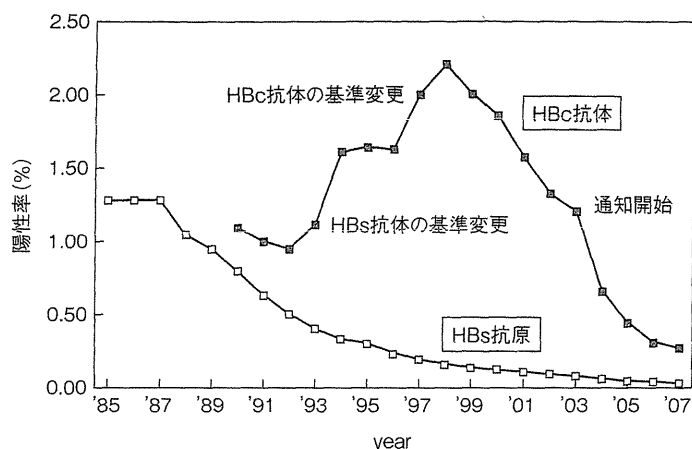


図1 献血者におけるHBs抗原・HBe抗体陽性率

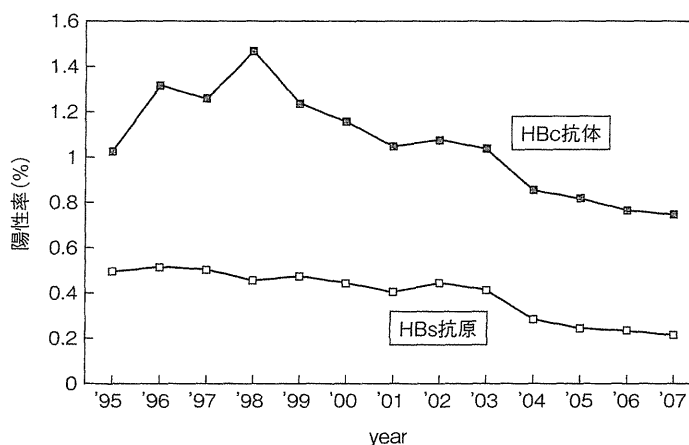


図2 初回献血者におけるHBs抗原・HBe抗体陽性率

上昇したが、その後徐々に低下し、2003年の陽性通知開始以降急激に減少した。

一方、陽性通知による制約を受けない初回献血者のHBs抗原陽性率は、調査を開始した1995年から0.45~0.50%と横ばいであったが、2003年以降低下して2007年には0.21%まで減少している(図2)。この初回献血者のHBs抗原陽性率が、わが国の献血者年代層(16~64歳)の陽性率を反映していると考えられる。

献血者における年代別・地域別HBs抗原陽性率

HBVは乳幼児期に感染すると高い確率でキャリア化するといわれており、わが国では母子感染

を含めた家族内感染が原因の主であったと考えられている⁷⁾。また、使い捨て注射器が普及する前に乳幼児期をすごした人たちにもHBVキャリアが多いといわれている。2006年と2010年(擬陽性と考慮されるものを除く)の献血者における年代別HBs抗原陽性率を調べると(図3)、両年とも50歳代をピークとして若年者ほど陽性率は低くなっていた。2010年は2006年に比べすべての年代で陽性率の低下が認められ、とくに20歳代での低下率が大きかった。2010年は20歳代の約半数が母子感染防止対策事業開始後の出生者となり、HBVキャリアの減少が大きな要因となっていると考えられる。

2006年の都道府県別HBs抗原陽性率を図4に

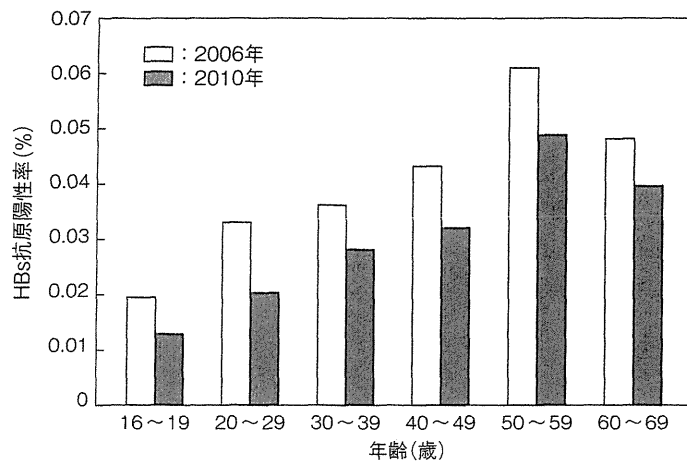


図 3 年代別HBs抗原陽性率(2006年と2010年)

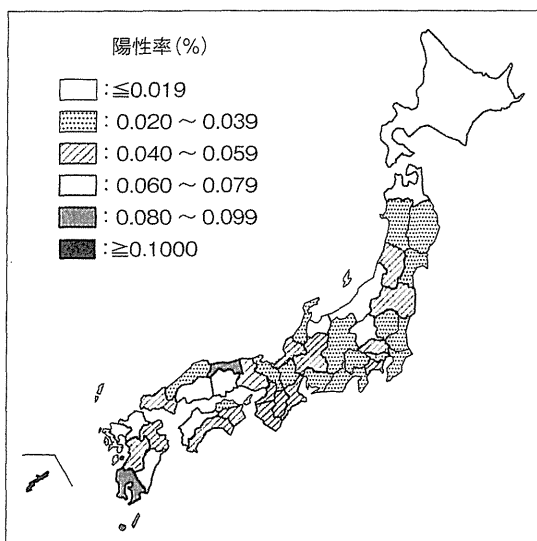


図 4 都道府県別HBs抗原陽性率(2006年)

示す。地域別では北海道・九州の陽性率が約0.070%ともっとも高く、ついで中四国が0.059%と高かった。以下、近畿0.047%、東北0.046%、関東甲信越・東海北陸0.036%の順であった。1976・1977年の献血者での調査でも北海道、九州での陽性率が高いと報告されているが³⁾、当時の北海道の陽性率は約3%であり、30年の間に著しい低下を示している。都道府県別では沖縄県の陽性率が0.139%ともっとも高く、ついで鳥取県の0.088%、鹿児島県の0.081%の順である。一方、陽性率が低い県は群馬県、新潟県、富山県、佐賀県などで、同一地方の隣接する県であっても陽性

率に差が認められる場合がある。前述のようにHBs抗原の陽性率は年齢が高くなるにつれ高値となるため、その自治体の献血者の年代構成比なども関係していると考えられる。

上記のHBs抗原陽性献血者にはHBVキャリアと新規感染者が混在している。献血者検体は1ポイントの検体しか得られないことが多く、HBVキャリアであるのか新規の感染であるのかの鑑別が困難な場合がある。そこで、①HBc抗体陰性例、②IgM-HBc抗体陽性例、③前回献血時の検査結果がHBs抗原陰性、および④ALT 150 IU/L以上の検体を新規感染例とし、HBc抗体陽性かつIgM-HBc抗体陰性例をHBVキャリア例として解析を行った。

HBVキャリアは2006年1,812人、2010年1,488人と18%の減少、新規感染者は2006年194人、2010年168人と13%減少していた。地域別では全国的に陽性者数が減少しているなかで、九州・沖縄地域で陽性者数が増加していた。HBVキャリア数は九州・沖縄地域のみで増加しており、その他の地域では減少していた。九州・沖縄地域では新規感染者数も増加しており、関東・中国地域での新規感染者は2006年とほぼ同数であったが、その他の地域ではすべて減少していた。九州・沖縄地域で増加していたHBVを解析したが、沖縄の新規感染者で2006年にはみられなかった genotype Cが若干認められただけで、海外由来の新しいHBVの感染が増えているといったような兆候

はなかった。

新規感染者の年代は2006年では10歳代4%、20歳代34%、30歳代32%、40歳代18%、50歳代10%、60歳代2%で、2010年では10歳代4%、20歳代28%、30歳代29%、40歳代23%、50歳代14%、60歳代3%で、両年とも20歳代・30歳代が約6割を占めるが、2010年では2006年に比べ40歳代以降で微増が認められた。

献血者から見出されるHBVの遺伝子型

HBVは不完全二本鎖DNAウイルスで、ヘパドナウイルスに属する。一般的にDNAウイルスはRNAウイルスに比べて遺伝子変異が少ないといわれているが、HBVはゲノムDNAの複製に逆転写過程をもつため、変異を起こしやすいウイルスである。HBVは現在A～Hの8つ(最近ではA～Jの10種と報告されている)の遺伝子型に分類されており、遺伝子型には世界的な地域特異性が存在する。遺伝子型Aは北アメリカ・西ヨーロッパ・アフリカ南東部・フィリピンで多く認められ、Bは東南アジア・中国南部・ベトナムで、Cは日本・韓国・中国中北部・ミャンマー・ベトナム・インドネシアで、Dはロシア・南中央アジア・中東・エジプトで、Eは西アフリカ、Fは南米で多く認められる。また、遺伝子型Gはフランスとアメリカで、Hはアメリカインディアンから認められた。わが国のHBVキャリアは、遺伝子型Cが84.7%を占め、ついで遺伝子型B:12.2%、遺伝子型A:1.7%、遺伝子型D:0.4%で、その他の遺伝子型は検出されなかったと報告されている⁹⁾。

他方、献血者から見出されるHBVの遺伝子型については、2006年のHBs抗原陽性調査で2,006例(0.04%、献血者数4,959,541人)の陽性例が検出され、遺伝子型が解析できた1,887例(男性1,372人、女性515人)の集計を行った。その結果は、遺伝子型C:1,181例(62.6%)、遺伝子型B:581例(30.8%)、遺伝子型A:106例(5.6%)、遺伝子型D:15例(0.8%)、遺伝子型E:2例(0.1%)、遺伝子型F:2例(0.1%)、であった¹⁰⁾。前述のHBVキャリア例の報告に比べ遺伝子型Aと遺伝子型Bの比率が高くなっており、その他、国内では非常にまれな遺伝子型Eや遺伝子型Fも見出されている。

2010年にも同様の調査を行い、1,656例(0.03%、献血者数5,329,676人)の陽性例が検出され、遺伝子型が解析できた1,614例(男性1,196人、女性418人)の集計を行ったところ、遺伝子型C:995例(60.1%)、遺伝子型B:485例(29.3%)、遺伝子型A:111例(6.7%)、遺伝子型D:19例(1.2%)、遺伝子型E:3例(0.2%)、遺伝子型F:1例(0.1%)との結果が得られた。両調査で遺伝子型比率に大きな差は認められないが、遺伝子型A比率の漸増が危惧される。実際に近年の首都圏における急性B型肝炎は遺伝子型Aが73%を占めていると報告されており¹¹⁾、HBVの伝播を防止するための対策が急がれる。

また、1999年7月～2010年末に輸血用血液に対するスクリーニング核酸増幅検査(nucleic acid amplification testing: NAT)でHBV-DNA陽性となった1,095例のうち、HBc抗体が陰性で感染初期と考えられる778例では遺伝子型C:529例(68.0%)、遺伝子型A:152例(19.5%)、遺伝子型B:83例(10.7%)、遺伝子型D:7例(0.9%)、遺伝子型H:4例(0.5%)、遺伝子型E:2例(0.3%)、不明:1例(0.1%)であった。急性B型肝炎例で認められるのと同様に、感染初期例では遺伝子型Aの検出頻度が高くなっており、逆に遺伝子型Bはキャリア報告例と同程度の頻度となっていた。感染初期例の遺伝子型Aをさらに詳しく調べると大多数は欧米型の遺伝子型Aeであり、外国型HBVがわが国で蔓延している様子がうかがえる。一方、HBc抗体陽性の317例では遺伝子型C:163例(51.4%)、遺伝子型B:114例(36.0%)、遺伝子型A:2例(0.6%)、遺伝子型D:2例(0.6%)、遺伝子型E:1例(0.3%)、不明:35例(11.0%)であった(図5)。

おわりに

HBVキャリア例の多くは母子感染・家族内感染や乳幼児期の注射器の使い回しなどによって感染したと考えられ、現在の感染初期例のほとんどは性感染と考えられている。HBVは免疫機能が未発達な乳幼児期に感染するとキャリア化する確率が高く、成人に達してからの感染では前述のように一過性の経過で治癒すると考えられてきた。

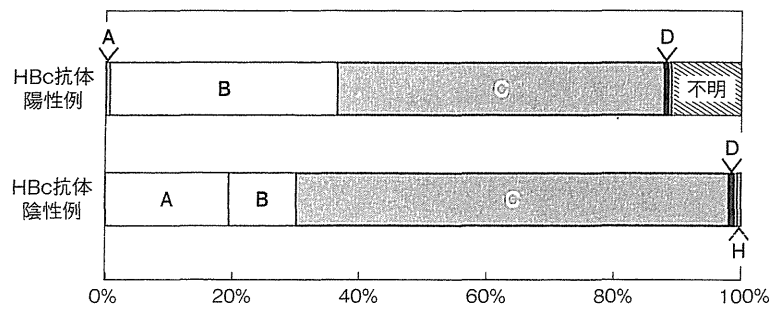


図 5 スクリーニング核酸増幅検査 (NAT) で検出されたHBVの遺伝子型

しかし、遺伝子型 A 感染は成人でも約 10% がキャリア化するといわれている¹²⁾。また、キャリア化しないで一過性の経過をたどる場合も、HBs 抗原陽性の期間が遺伝子型 C や B と比べて有意に長い (遷延化) といわれており¹³⁾、キャリア化した人や HBs 抗原陽性時期の人からの二次感染により感染が拡大していると考えられる。遺伝子型 A は感染してからの増殖速度が他の遺伝子型に比べて遅く¹⁴⁾、宿主の免疫反応も弱くなるためと考えられている。遺伝子型 A 感染は若年男性を主として広がっているが、最近では女性の感染も散見されようになり、さらなる感染拡大が危惧される。

文献

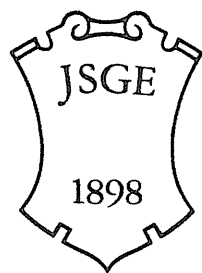
- 1) 白木和夫：B 型肝炎母子感染防止対策の追跡調査及び効果判定に関する研究報告書，1996。
- 2) Uchida, S. and Tadokoro, K.: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **61**: 94, 2008.
- 3) 田中靖人・他：肝臓，**50**：598-604，2009。
- 4) Blumberg, B. S. et al.: *JAMA*, **191**：541-546, 1965.
- 5) Okochi, K. et al.: *Vox Sang.*, **15**：374-385, 1968.
- 6) Dane, D. S. et al.: *Lancet*, **1**：695-698, 1970.
- 7) Sodeyama, T. et al.: *Am. J. Gastroenterol.*, **81**：239-245, 1986.
- 8) 吉沢浩司：ウイルス肝炎。中外医学社，1984，p.40.
- 9) Orito, E. et al.: *Hepatology*, **34**：590-594, 2001.
- 10) 田中昌子・他：肝臓，**50**：320-323，2009。
- 11) 山田典栄・他：肝臓，**49**：553-559，2008。
- 12) Sherlock, S. D. J.: *Disease of the Liver and biliary system*, 10th ed., Blackwell Scientific Publ., London, 1997, pp.265-392.
- 13) 松浦健太郎・他：肝臓，**49**：549-552，2008。
- 14) Sugiyama, M. et al.: *Gastroenterology*, **136**：652-662, 2009.

* * *

肝発癌と鉄代謝異常

仁科惣治 日野啓輔

日本消化器病学会雑誌
第109巻 第4号



The Japanese Society of Gastroenterology
Tokyo Japan

今月のテーマ 肝発癌と代謝異常

肝発癌と鉄代謝異常

仁科 惣治 日野 啓輔¹⁾

要旨：鉄は Fenton 反応により活性酸素種を産生し酸化ストレスを惹起する。そのため肝臓の鉄沈着は酸化ストレスを介した肝発癌促進因子とされている。臨床的にも肝内鉄過剰と肝発癌との関連性が指摘されている。典型例としては古くからヘモクロマトーシスと肝発癌の関係が知られているが、より日常的に遭遇する疾患として C 型肝炎、アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝炎においても鉄代謝異常が存在することが報告されている。鉄代謝異常の分子機構として鉄吸収の negative regulator である hepcidin の関与なども明らかにされているが、いまだ不明の点も多く、また肝発癌に対するインパクトも今後の研究課題である。

索引用語：鉄、酸化ストレス、HCV タンパク、hepcidin、肝発癌

はじめに

肝細胞癌は依然本邦における悪性腫瘍の死因の上位を占める疾患である。従来から肝炎ウイルスによる肝発癌が注目されてきたが、肝発癌機序が少しずつ明らかにされるにつれて、また非 B 非 C 型肝炎の増加に従い肝発癌における代謝異常の重要性がクローズアップされてきた。肝発癌と関連する代謝異常として糖代謝異常、脂質代謝異常、鉄代謝異常などが挙げられるが、本稿においては慢性肝疾患における鉄代謝異常と肝発癌との関係について解説する。

肝臓は体内における主要な鉄貯蔵臓器であり、この点からも慢性肝疾患と鉄代謝異常の関連が容易に推測される。特に C 型慢性肝炎・肝硬変、アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis ; NASH) ではその病態の特徴のひとつとして鉄代謝異常がよく知られている。そこで各疾患における鉄代謝異常の分

子機構がどこまで明らかにされているのかを考察し、加えて肝発癌との関係について解説する。

Ⅰ 肝内鉄過剰と肝発癌

鉄は生体内で重要な働きを持つ一方で、Fenton 反応により活性酸素種 (Reactive Oxygen Species ; ROS) のひとつであるヒドロキシラジカルを産生する。ヒドロキシラジカルは ROS の中でも特に強い組織傷害性を持つことが明らかにされており、この点からも鉄は肝発癌関連因子であることは広く知られている。高度の肝内鉄沈着が特徴的な疾患である遺伝性ヘモクロマトーシス患者における肝細胞癌発症リスクは健常人の 200 倍とも報告され、肝硬変に至らない背景肝からの肝発癌も確認されている¹⁾。肝発癌の重要な危険因子である肝硬変を合併していない肝細胞癌症例の case-control study によると、コントロールに比べて有意に非腫瘍部への鉄沈着を認めており^{2,3)}、これらの成績は肝内鉄沈着が肝発癌危険因子であ

1) 川崎医科大学肝胆膵内科学

Hepatocarcinogenesis and iron metabolic disorder
Sohji NISHINA and Keisuke HINO¹⁾

1) Department of Hepatology and Pancreatology, Kawasaki Medical University

Corresponding author : 仁科 惣治 (f018ep@med.kawasaki-m.ac.jp)

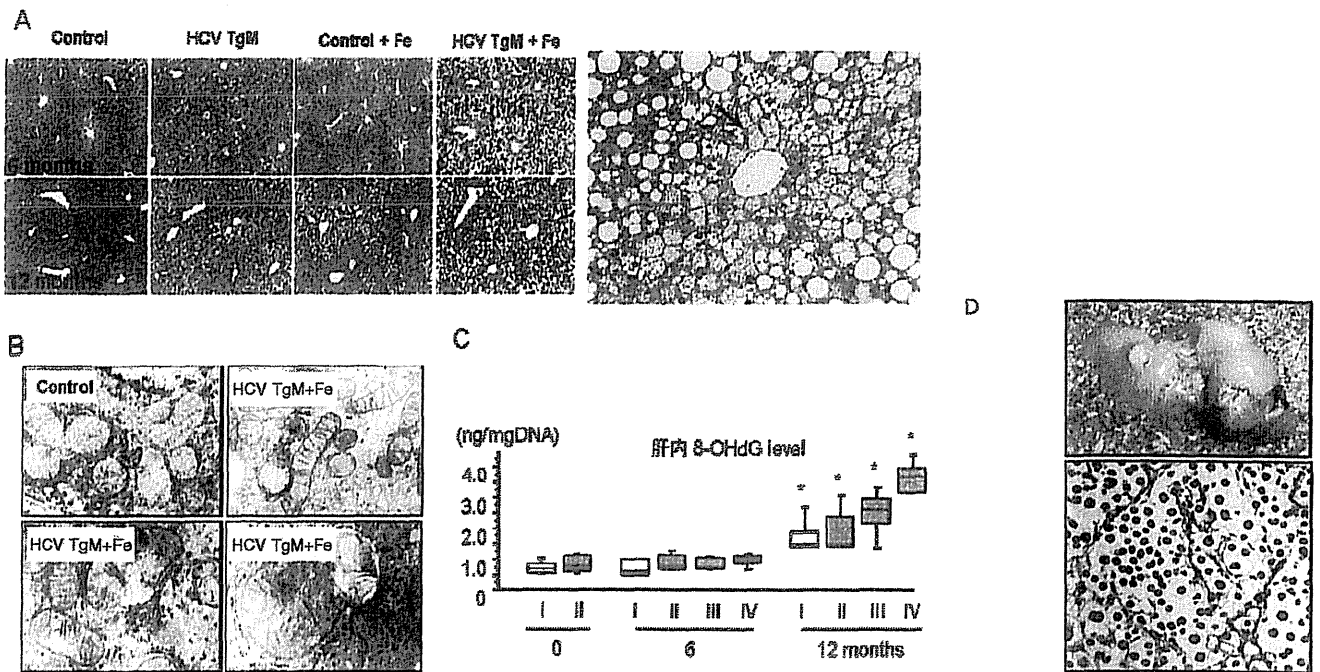


Figure 1. 飼育6カ月目、12カ月目のHE染色による肝組織脂肪化の比較 (A)、肝ミトコンドリア電子顕微鏡像 (B)、鉄負荷12カ月目の肝組織内8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)量の比較 (C)、鉄負荷HCV TgMにおける肝発癌写真 (D) (文献10より引用)：鉄負荷HCV TgMの肝組織において中心静脈周囲のmicrovesicular steatosis (矢印)をともなった脂肪沈着が顕著である(A)。鉄負荷HCV TgMの肝ミトコンドリアはコントロールに比べて大小不同や膜の膨化、クリステの乱れなどの形態異常が認められる (B)。12カ月目において鉄負荷HCV TgMは他の3群に比べて8-OHdG量が多く、また他の3群もそれぞれ飼育開始時、6カ月目と比べて8-OHdG量は多かった (C)。鉄負荷HCV TgM群のみに12カ月目に11匹中5匹(45%)に肝腫瘍の発生を認め、うち3匹に肝細胞癌が確認された (D)。Control：通常餌飼育コントロールマウス、HCV TgM：通常餌飼育トランスジェニックマウス、Control+Fe：鉄過剰餌飼育コントロールマウス、HCV TgM+Fe：鉄過剰餌飼育トランスジェニックマウス。

ることを示唆するものである。アルコール性肝硬変の肝発癌にはヘモクロマトーシス遺伝子であるHFEの変異(C282Y)が関与しているとの報告がある⁴⁾。また、鉄過剰状態はNASH患者における肝発癌の危険因子であることも指摘されている。NASH関連肝硬変患者において、肝細胞癌を合併しないコントロール群102例と比べ肝細胞癌を合併した51例では、肝生検組織において鉄沈着が高頻度であることが報告されている⁵⁾。さらに、肝細胞癌合併56例と非合併48例のC型肝硬変症例について肝内鉄沈着を検討した報告では、肝内鉄沈着は年齢、性差、肝線維化とは独立した肝発癌関連因子であることを明らかにしている⁶⁾。一方、アルコール性あるいはC型肝硬変患者における肝内鉄蓄積と肝発癌との関連性を検討した大規模前向き研究では、肝内鉄蓄積とHFE遺伝子変異はアルコール性肝硬変における肝発癌

の危険因子であるが、C型肝硬変ではこれらの因子と肝発癌には関連を認めなかったと報告されている⁷⁾。このようにアルコール性肝疾患やNASHに比べてC型慢性肝疾患における肝内鉄蓄積と肝発癌との関係については依然 controversialな部分があるが、残念なことにこれらの報告はCaucasianを対象にしたものがほとんどで、HFE遺伝子変異が少ないわが国での報告は認められない。しかし、Katoらにより長期の瀉血と鉄制限食によりC型慢性肝炎からの肝発癌が抑制されることが報告されており⁸⁾⁹⁾、日本人におけるC型肝炎からの肝発癌に鉄過剰が関連することが示唆されている。

C型肝炎の肝発癌における鉄過剰の意義を明らかにするためには日本人を対象とした大規模な前向き研究が必要であるが、既に瀉血がC型慢性肝炎に対する治療として認可されている今日にお

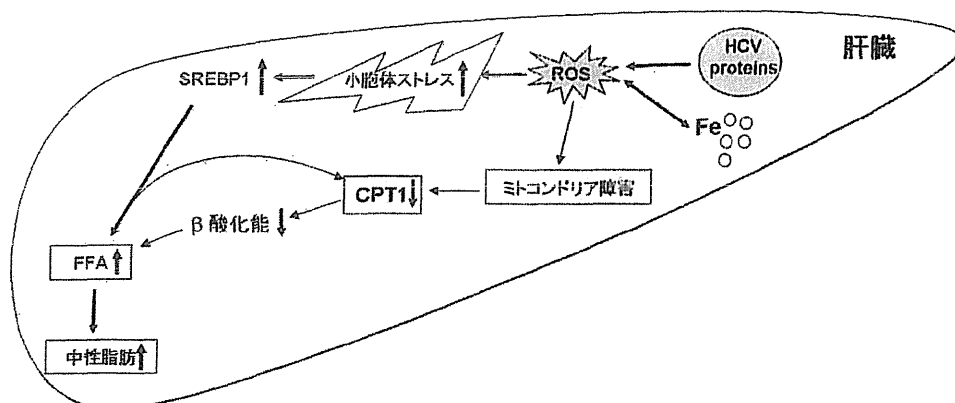


Figure 2. 鉄負荷 HCV TgM における鉄代謝異常と脂質代謝異常のクロストーク (文献 11 をもとに改変引用) : HCV 存在下に鉄負荷による酸化ストレス亢進が, ①小胞体ストレス増強による脂質合成経路の促進, ②脂肪酸分解系 (CPT1) の抑制を介して, 肝脂肪化を促進させる.

いてはこのような研究を行うことも困難である。そこでわれわれは実験的に C 型肝炎ウイルスタンパクの存在下に鉄過剰が真に肝発癌を引き起こすか否かについて検討を行ったのでその成績を紹介する。C 型肝炎ウイルス (HCV) の全遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (HCV transgenic mouse ; HCV TgM) に軽度の鉄過剰餌 (通常餌に含有される鉄の 5 倍に相当する濃度) を与え C 型慢性肝炎患者と同等の肝内鉄濃度にするにより肝発癌をきたすか否かについて検討した¹⁰⁾。鉄過剰餌負荷 6 カ月目の HCV TgM は肝内の脂肪沈着が亢進し, 中心静脈周囲には小滴性脂肪沈着も目立った。さらにミトコンドリアの超微形態異常を認め, 脂肪酸分解能 (β 酸化能) も低下した。鉄負荷 12 カ月目になると肝内脂質過酸化物質とともに 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の蓄積が亢進し, 最終的には鉄負荷 HCV TgM のみに肝細胞癌を含む肝腫瘍を 45% (5/11) 認めた (Figure 1)。このように HCV TgM は肝内鉄濃度が C 型慢性肝炎のそれに匹敵してくるとミトコンドリア障害とともに肝内の脂肪沈着が亢進し, 酸化ストレスが亢進するとともに酸化的 DNA 障害が進行し肝発癌をきたすことが明らかになった。このように肝内鉄蓄積によるミトコンドリア障害, 酸化ストレスの増強は肝発癌における重要な病態のひとつと考えられる。

また, 先に述べた鉄負荷 HCV TgM の肝発癌過程において著明な肝脂肪化を認めた点や肝内鉄濃度は肝内中性脂肪濃度と有意な正の相関を示すことに注目し, 肝内鉄蓄積と肝脂肪化との関係について検討した¹¹⁾ (Figure 2)。sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c の転写後活性化機序のひとつとして小胞体ストレスが報告されているが, HCV による酸化ストレスが小胞体ストレスを亢進させ, その結果として SREBP-1c が活性化されるとともに, 酸化ストレスによるミトコンドリア障害がミトコンドリア外膜に存在する β 酸化律速酵素である carnitine palmitoyl-transferase I (CPT I) の発現を抑制して β 酸化を抑制して肝脂肪化を引き起こすことを明らかにした。このように肝脂肪化は HCV による直接的あるいは酸化ストレス増強を介した間接的機序により引き起こされるが, 肝内鉄蓄積と同様に HCV 関連肝発癌過程における重要な病態と考えられる。

II 慢性肝疾患における鉄代謝異常の発現機序

1. C 型慢性肝疾患と鉄代謝異常

脊椎動物において鉄を特異的に排出する機構は明らかにされておらず, 生体の鉄恒常性維持は十二指腸粘膜上皮からの鉄吸収ならびに網内系からの鉄放出により厳密に調節されている。この点に

において肝臓で生成、分泌されるペプチドホルモン hepcidin は十二指腸上皮細胞血管側および網内系マクロファージに存在する ferroportin という鉄輸送体の発現を抑制し、十二指腸からの鉄吸収ならびに網内系からの鉄放出を抑制することで体内の鉄含有量を調節することが明らかにされている。C型慢性肝疾患における肝内鉄蓄積機序についてはいまだ不明の点が多いが、鉄吸収の negative regulator である hepcidin がC型慢性肝炎患者で低下しているという報告がある¹²⁾。同論文で興味深いのは、C型肝炎ではB型肝炎や非B非C型肝炎疾患と比べて絶対的な hepcidin の発現量が低下するというより、hepcidin/ferritin 比、すなわち鉄蓄積に対する相対的な hepcidin の発現量が低下しているという点である。これはC型慢性肝疾患に観察される肝内鉄蓄積が遺伝性ヘモクロマトーシスに見られるような高度なものではないという臨床的事実と合致する。では、なぜC型肝炎では鉄蓄積に対する hepcidin の発現が抑制されているのであろうか。この点について先に述べた HCV TgM を用いて解析を行ったので紹介する¹³⁾。

HCV TgM ではC型慢性肝炎患者と同様に8カ月齢頃より肝内の鉄濃度がコントロールマウスに比べて有意に上昇し、これに一致して肝内の hepcidin mRNA の発現が低下した。HCV TgM の初代培養肝細胞を用いた解析では hepcidin のプロモーター活性が低下し、その原因として hepcidin の転写因子のひとつである CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α のプロモーター領域への結合が低下していた。さらに、C/EBP α の inhibitor である C/EBP homology protein (CHOP) の発現が ROS 産生と連動して亢進し、これにより C/EBP α のプロモーター領域への結合が阻害される可能性が明らかとなった。HCV コアタンパクによるミトコンドリア障害、ROS 産生機構については紙面の都合上割愛する。

Miura らも HCV 全遺伝子が挿入されたレプリコン細胞を用いて同様に ROS の亢進により hepcidin の転写が抑制されることを報告している¹⁴⁾。しかし、hepcidin の転写抑制機構はわれわ

れの成績と若干異なっている。ROS により histone deacetylase の活性が亢進して histone の脱アセチル化が促進され、転写因子である C/EBP α や signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の hepcidin プロモーター領域への結合力が低下すると報告している。さらに、histone deacetylase の活性亢進はマウス肝での hepcidin の発現を抑制する hypoxia inducible factor (HIF) を安定化させることが示されている。このように HCV に起因する活性酸素が hepcidin の転写を抑制するというシナリオは共通しているが、hepcidin の転写抑制機構に若干違いが認められるのは実験モデルの違いによるのかもしれない (Figure 3)。しかし、これらの実験モデルでは炎症という因子が欠落しているが、炎症は interleukin-6 (IL-6)/STAT3 系シグナルを介して hepcidin の転写を促進することが明らかにされている¹⁵⁾。C型慢性肝炎患者では炎症による hepcidin の転写亢進が酸化ストレスによる hepcidin の転写抑制を相殺する可能性もあり、ヒトではより複雑な hepcidin の発現調節が行われている可能性が考えられる。

2. アルコール性肝障害と鉄代謝異常

アルコール性肝障害においてしばしば肝内鉄沈着が認められる。軽度から中等度のアルコール負荷により肝内鉄沈着が生じることも確認されている¹⁶⁾。ではいったいなぜアルコール負荷により肝内鉄沈着が生じるのであろうか。

肝細胞内への鉄取り込みは、主に transferrin receptor (TfR) を介したトランスフェリン鉄の取り込みが主体である。TfR にはさまざまな細胞に存在する TfR1 と肝細胞特異的に発現している TfR2 の2種類がある。Suzuki らの報告によると、アルコール性肝障害患者の肝生検組織において高頻度に TfR1 の発現亢進を認めたが、健常者では認められなかった¹⁷⁾。またラット初代培養肝細胞を用いた実験においても、アルコール負荷によって TfR1 の発現亢進と細胞内へのトランスフェリン鉄取り込み増加を認めた。アルコールによる TfR1 発現亢進の機序に関しては、アルコール代謝産物であるアセトアルデヒドによる ROS

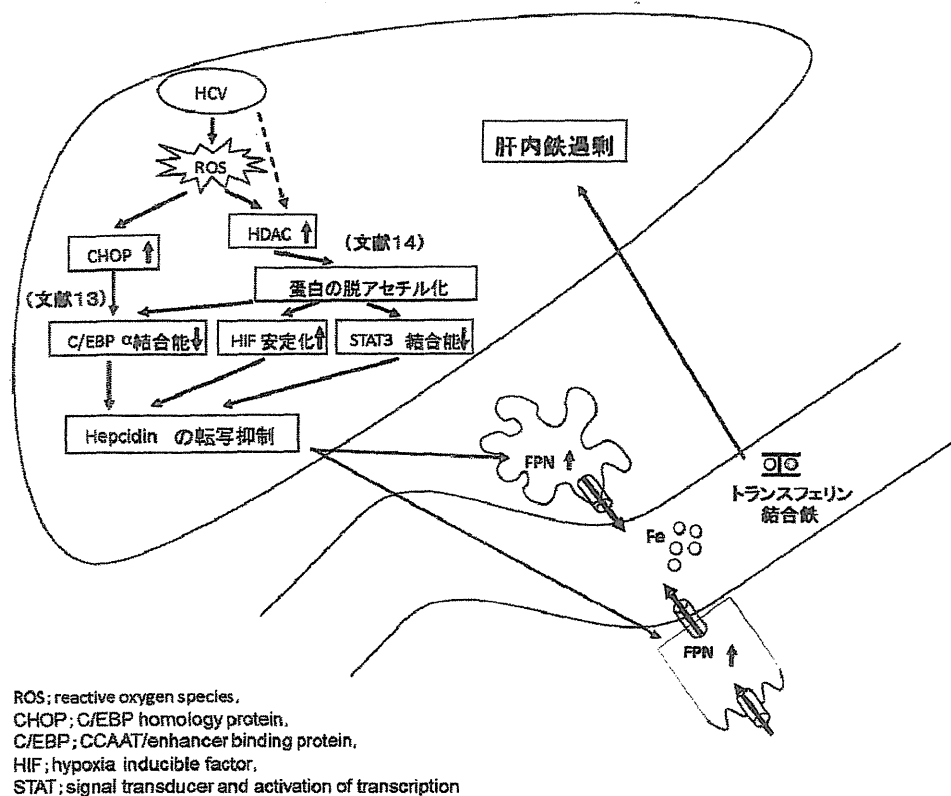


Figure 3. HCV タンパク存在下における肝内鉄代謝異常の模式図(文献13, 14より抜粋).

産生が iron regulatory protein (IRP)/iron responsive element (IRE) の結合活性を増強して TfR1 の発現を亢進させることが考えられている¹⁸⁾. また, C型肝炎と同様に, アルコール負荷マウスや肝癌細胞株へのエタノール負荷実験において hepcidin の発現低下を介した肝内鉄蓄積機構についても報告されている¹⁹⁾²⁰⁾. アルコールによる hepcidin 発現抑制機構として, アルコールによる ROS 産生が, HCV TgM の場合と同様に C/EBP α の hepcidin プロモーター領域への結合低下を引きおこし, hepcidin の転写を抑制することが報告されている¹⁹⁾.

3. NASH と鉄代謝異常

NASH では鉄過剰であることが臨床的にも数多く報告されており²¹⁾²²⁾, NASH の病態進展に鉄過剰状態が関与していることは, C型慢性肝炎の場合と同様瀉血により肝機能検査値が改善することからも明らかとなった²³⁾. しかし, なぜ NASH で肝内鉄蓄積がおこるかについては C型肝炎ほど明らかにされていないのが現状である. この点

について Otagawa らはウサギの NASH モデルを用いて肝内鉄蓄積機構について検討している²⁴⁾. この動物モデルの赤血球膜には phosphatidylserine が表出されて赤血球の脆弱性が増し, 一方 Kupffer 細胞ではアポトーシス細胞の貪食を亢進する MFG-E8 の産生が亢進しており, そのため赤血球が Kupffer 細胞に貪食されやすくなることが肝内鉄蓄積の一因と報告している. また Aigner らによると, NASH 患者における肝内鉄蓄積機構として, tumor necrosis factor (TNF) α の増加が肝細胞や Kupffer 細胞における鉄排出輸送体である ferroportin の down-regulation を引きおこすことで肝外への鉄放出を抑制して, 肝内鉄蓄積を引きおこす可能性を報告している²⁵⁾. また Yanagitani らはレチノイン酸受容体 α dominant negative 型のトランスジェニックマウスでは脂肪性肝炎をおこしその後肝発癌をきたすことを報告しているが²⁶⁾, 同様のマウスモデルにおいてレチノイドシグナルが hemojuverin の転写調節に関与していることを報告した²⁷⁾. すなわちレチノ

イドは hemojuverin の転写を抑制することでその下流のシグナルである Tfr2 や hepcidin の発現を抑制し、結果としてトランスフェリン鉄の取り込み低下と ferroportin の発現亢進による肝細胞からの鉄放出によって肝細胞内の鉄を低下させると指摘している。以上の成績は脂肪性肝炎におけるレチノイドシグナルの障害が肝内鉄過剰を引き起こす可能性を示しており、NASH における肝内鉄蓄積機序を考えるうえで興味深い。このように NASH の鉄代謝異常についてはいくつかの機序が報告されているが、C 型肝炎やアルコール性肝障害で認められる hepcidin の発現低下については明らかになっておらず、異なる鉄蓄積機序の可能性が想定される。

III 肝内鉄蓄積を軽減するための新たな治療の可能性について

鉄代謝障害をともなう慢性肝疾患である C 型慢性肝炎・肝硬変、アルコール性肝疾患、NASH はいずれもその肝発癌機序に酸化ストレスが深く関与している疾患である。したがって、鉄代謝異常を改善し、酸化ストレスを抑制することは肝発癌抑制という観点からも重要な治療戦略である。C 型慢性肝炎に対する瀉血療法は本邦から初めて報告された治療であり²⁸⁾、その安全性ならびに肝発癌抑制を含めた病態進展抑制効果は長期の瀉血療法により立証されている²⁵⁾²⁹⁾。瀉血は保険診療として認可されていることから明らかなように、ウイルス排除が困難な C 型慢性肝炎に対する治療として一定の評価を受けていることは事実である。また、最近では NASH の病態進展抑制のための治療法として瀉血療法が試みられている³⁰⁾³¹⁾。本邦においても Sumida らは、NASH に対して瀉血を行うことにより血清トランスアミナーゼが有意に低下することを報告している²⁹⁾。また Valenti らによると、高 ferritin 血症をともなう NASH 患者に対して瀉血を行った場合、栄養指導のみを受けた群と比べて BMI、HOMA-IR、あるいは他のメタボリック症候群の存在の有無とは関係なくインスリン抵抗性が改善されることを報告している³²⁾。さらに瀉血療法は NASH だけではなく、高 ferritin 血症を有する糖尿病患

者³³⁾および健常者に対しても³⁴⁾、インスリン抵抗性を改善することが報告されている。これら一連の成績は瀉血によりインスリン抵抗性が改善することを示唆するが、臨床的に瀉血が NASH における肝発癌抑制を含めた病態改善効果を発揮するか否かは今後の重要な研究課題と考えられる。

また、瀉血以外に今後期待される鉄蓄積軽減のためのアプローチを簡単に紹介する。Yamasaki らの報告によると、肝動注化学療法で効果を認めなかった進行肝癌患者に対して、デフェロキサミン動注による有効性を証明している。このことから、従来の抗癌剤治療抵抗性の進行肝癌に対して鉄キレート剤が有効な肝癌治療法となる可能性が示唆された³⁵⁾。しかし、デフェロキサミン（デスフェラル[®]）は血中半減期が短いため持続点滴か持続皮下注でないとう有効性が低く、間質性肺炎などの副作用の問題点もある。これに対し最近認可されたデフェラシロクス（エクジエイド[®]）は経口の鉄キレート剤であり、連日服用することにより十分な鉄キレート作用が期待され、副作用も比較的少ないため今後の肝癌治療の選択肢となりうるか否か期待される場所である。

HCV 増殖細胞における hepcidin の発現を抑制する histone deacetylase に注目すると¹³⁾、その阻害剤は肝星細胞が筋線維芽細胞に分化することを抑制することが *in vitro* で明らかにされている³⁶⁾。また histone deacetylase により安定化し、hepcidin の発現を抑制する HIF の標的遺伝子が癌組織に多く発現することから、histone deacetylase 阻害剤は抗癌剤として期待されている³⁷⁾。したがって histone deacetylase 阻害剤は C 型肝炎における肝線維化抑制ならびに hepcidin の発現を亢進させて鉄吸収を抑制するという観点からも肝発癌を抑制しうる可能性がある。

また NASH での鉄蓄積にレチノイドシグナルの障害が関与している可能性について言及したが、すでに非環式レチノイドが肝癌再発を有意に抑制することが10年以上も前に報告されており³⁸⁾、この肝癌再発抑制機構に肝内鉄蓄積の軽減が寄与したか否かは非常に興味深いところである。経口鉄キレート剤、histone deacetylase 阻害

剤, レチノイドは, いずれも異なった切り口からの鉄過剰状態を改善する可能性を持った薬剤であり今後の臨床試験が期待される。

本論文内容に関連する著者の利益相反

: なし

文 献

- 1) Elmberg M, Hultcrantz R, Ekbom A, et al: Cancer risk in patients with hereditary hemochromatosis and in their first-degree relatives. *Gastroenterology* 125; 1733-1741: 2003
- 2) Bralet MP, Régimbeau JM, Pineau P, et al: Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. *Hepatology* 32; 200-204: 2000
- 3) Turlin B, Juguët F, Moirand R, et al: Increased liver iron stores in patients with hepatocellular carcinoma developed on a noncirrhotic liver. *Hepatology* 22; 446-450: 1995
- 4) Lauret E, Rodríguez M, González S, et al: HFE gene mutations in alcoholic and virus-related cirrhotic patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 97; 1016-1021: 2002
- 5) Sorrentino P, D'Angelo S, Ferbo U, et al: Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on non-alcoholic steato-hepatitis. *J Hepatol* 50; 351-357: 2009
- 6) Chapoutot C, Esslimani M, Joomaye Z, et al: Liver iron excess in patients with hepatocellular carcinoma developed on viral C cirrhosis. *Gut* 46; 711-714: 2000
- 7) Nahon P, Sutton A, Rufat P, et al: Liver iron, HFE gene mutations, and hepatocellular carcinoma occurrence in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 134; 102-110: 2008
- 8) Kato J, Kobune M, Nakamura T, et al: Normalization of elevated hepatic 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in chronic hepatitis C patients by phlebotomy and low iron diet. *Cancer Res* 61; 8697-8702: 2001
- 9) Kato J, Miyanishi K, Kobune M, et al: Long-term phlebotomy with low-iron diet therapy lowers risk of development of hepatocellular carcinoma from chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 42; 830-836: 2007
- 10) Furutani T, Hino K, Okuda M, et al: Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* 130; 2087-2098: 2006
- 11) Nishina S, Korenaga M, Hidaka I, et al: Hepatitis C virus protein and iron overload induce hepatic steatosis through the unfolded protein response in mice. *Liver Int* 30; 683-692: 2010
- 12) Fujita N, Sugimoto R, Takeo M, et al: Hepsidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. *Mol Med* 13; 97-104: 2007
- 13) Nishina S, Hino K, Korenaga M, et al: Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepsidin transcription. *Gastroenterology* 134; 226-238: 2008
- 14) Miura K, Taura K, Kodama Y, et al: Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepsidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology* 48; 1420-1429: 2008
- 15) Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, et al: STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepsidin in vivo. *Gastroenterology* 132; 294-300: 2007
- 16) Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, et al: The effect of alcohol consumption on the prevalence of iron overload, iron deficiency, and iron deficiency anemia. *Gastroenterology* 126; 1293-1301: 2004
- 17) Suzuki Y, Saito H, Suzuki M, et al: Up-regulation of transferrin receptor expression in hepatocytes by habitual alcohol drinking is implicated in hepatic iron overload in alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 26 (suppl); 26S-31S: 2002
- 18) Suzuki M, Fujimoto Y, Suzuki Y, et al: Induction of transferrin receptor by ethanol in rat primary hepatocyte culture. *Alcohol Clin Exp Res* 28 (suppl Proceedings); 98S-105S: 2004
- 19) Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, et al: Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepsidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem* 281; 22974-22982: 2006
- 20) Bridle K, Cheung TK, Murphy T, et al: Hepsidin is down-regulated in alcoholic liver injury: implications for the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 30; 106-112: 2006
- 21) Fargion S, Mattioli M, Fracanzani AL, et al: Hyperferritinemia, iron overload, and multiple metabolic alterations identify patients at risk for nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 96; 2448-2455: 2001
- 22) Sumida Y, Nakashima T, Yoh T, et al: Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in

- patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 38 ; 32-38 : 2003
- 23) Sumida Y, Kanemasa K, Fukumoto K, et al : Effect of iron reduction by phlebotomy in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis : A pilot study. *Hepatol Res* 36 ; 315-321 : 2006
- 24) Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, et al : Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis : implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 170 ; 967-980 : 2007
- 25) Aigner E, Theurl I, Theurl M, et al : Pathways underlying iron accumulation in human nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* 87 ; 1374-1383 : 2008
- 26) Yanagitani A, Yamada S, Yasui S, et al : Retinoic acid receptor alpha dominant negative form causes steatohepatitis and liver tumors in transgenic mice. *Hepatology* 40 ; 366-375 : 2004
- 27) Tsuchiya H, Akechi Y, Ikeda R, et al : Suppressive effects of retinoids on iron-induced oxidative stress in the liver. *Gastroenterology* 136 ; 341-350.e8 : 2009
- 28) Hayashi H, Takikawa T, Nishimura N, et al : Improvement of serum aminotransferase levels after phlebotomy in patients with chronic active hepatitis C and excess hepatic iron. *Am J Gastroenterol* 89 ; 986-988 : 1994
- 29) Yano M, Hayashi H, Wakusawa S, et al : Long term effects of phlebotomy on biochemical and histological parameters of chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 97 ; 133-137 : 2002
- 30) Riquelme A, Soza A, Nazal L, et al : Histological resolution of steatohepatitis after iron depletion. *Dig Dis Sci* 49 ; 1012-1015 : 2004
- 31) Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA : Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 122 ; 931-939 : 2002
- 32) Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al : Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia : evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 102 ; 1251-1258 : 2007
- 33) Fernández-Real JM, Peñarroja G, Castro A, et al : Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes : effects on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes* 51 ; 1000-1004 : 2002
- 34) Facchini FS : Effects of phlebotomy on plasma glucose and insulin concentrations. *Diabetes Care* 21 ; 2190 : 1998
- 35) Yamasaki T, Terai S, Sakaida I : Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 365 ; 576-578 : 2011
- 36) Niki T, Rombouts K, De Bleser P, et al : A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology* 29 ; 858-867 : 1999
- 37) Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA : Histone deacetylase inhibitors : molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26 ; 5541-5552 : 2007
- 38) Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, et al : Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* 334 ; 1561-1567 : 1996

(論文受領, 2012年2月13日)
受理, 2012年2月14日)

RESEARCH ARTICLE

Open Access

No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations

Hiromi Sawai^{1*}, Nao Nishida^{1,2}, Hamdi Mbarek³, Koichi Matsuda³, Yoriko Mawatari², Megumi Yamaoka¹, Shuhei Hige⁴, Jong-Hon Kang⁵, Koichi Abe⁶, Satoshi Mochida⁷, Masaaki Watanabe⁸, Masayuki Kurosaki⁹, Yasuhiro Asahina⁹, Namiki Izumi⁹, Masao Honda¹⁰, Shuichi Kaneko¹⁰, Eiji Tanaka¹¹, Kentaro Matsuura¹², Yoshito Itoh¹³, Eiji Mita¹⁴, Masaaki Korenaga¹⁵, Keisuke Hino¹⁵, Yoshikazu Murawaki¹⁶, Yoichi Hiasa¹⁷, Tatsuya Ide¹⁸, Kiyooki Ito², Masaya Sugiyama², Sang Hoon Ahn¹⁹, Kwang-Hyub Han¹⁹, Jun Yong Park¹⁹, Man-Fung Yuen²⁰, Yusuke Nakamura³, Yasuhiro Tanaka¹², Masashi Mizokami² and Katsushi Tokunaga¹

Abstract

Background: A recent genome-wide association study (GWAS) using chronic HBV (hepatitis B virus) carriers with and without hepatocellular carcinoma (HCC) in five independent Chinese populations found that one SNP (rs17401966) in *KIF1B* was associated with susceptibility to HCC. In the present study, a total of 580 HBV-derived HCC cases and 1351 individuals with chronic hepatitis B (CHB) or asymptomatic carrier (ASC) were used for replication studies in order to evaluate the reported association with HBV-derived HCC in other East Asian populations.

Results: We did not detect any associations between rs17401966 and HCC in the Japanese cohorts (replication 1: OR = 1.09, 95 % CI = 0.82-1.43; replication 2: OR = 0.79, 95 % CI = 0.54-1.15), in the Korean cohort (replication 3: OR = 0.95, 95 % CI = 0.66-1.36), or in the Hong Kong Chinese cohort (replication 4: OR = 1.17, 95 % CI = 0.79-1.75). Meta-analysis using these cohorts also did not show any associations with $P = 0.97$.

Conclusions: None of the replication cohorts showed associations between rs17401966 and HBV-derived HCC. This may be due to differences in the genetic diversity among the Japanese, Korean and Chinese populations. Other reasons could be the high complexity of multivariate interactions between the genomic information and the phenotype that is manifesting. A much wider range of investigations is needed in order to elucidate the differences in HCC susceptibility among these Asian populations.

Keywords: Hepatitis B, hepatocellular carcinoma, candidate SNP, replication study, genome-wide association study

Background

Hepatitis B (HB) is a potentially life-threatening liver infection caused by the hepatitis B virus (HBV), and approximately 360 million people worldwide are thought to be chronically infected with HBV. The clinical course of HBV infection is variable, including acute self-limiting infection, fulminant hepatic failure, inactive carrier state and chronic hepatitis with progression to cirrhosis and

hepatocellular carcinoma (HCC). Although some HBV carriers spontaneously eliminate the virus, 2-10 % of individuals with chronic HB (CHB) develop liver cirrhosis every year, and a subset of these individuals suffer from liver failure or HCC. Around 600,000 new HCC cases are diagnosed annually worldwide, with HCC being relatively common in Asia-Pacific countries and sub-Saharan Africa; more than 70 % of HCC patients are diagnosed in Asia (with 55 % in China) [1]. However, HCC is relatively uncommon in the USA, Europe and Australia [1,2]. The majority of HCC develops in patients with cirrhosis, which is most often attributable

* Correspondence: sawai@m.u-tokyo.ac.jp

¹Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan
 Full list of author information is available at the end of the article

to chronic HBV infection followed by chronic HCV in the Asia-Pacific region [3].

A recent genome-wide association study (GWAS) using Japanese CHB cases and controls confirmed that 11 SNPs in a region including *HLA-DPA1* and *-DPB1* were associated with CHB [4]. Moreover, a GWAS using chronic HBV carriers with and without HCC in five independent Chinese populations reported that one SNP (rs17401966) in *KIF1B* was associated with HCC susceptibility [5]. In the present study, we performed replication studies using Japanese, Korean and Hong Kong Chinese cases and controls in order to evaluate the reported association with HBV-derived HCC in other East Asian populations.

Results

We performed SNP genotyping of rs17401966 located in the *KIF1B* gene for the purpose of replication analysis of the previous GWAS report [5]. Four distinct cohorts were used for these replication analyses (Table 1). We first examined two independent Japanese case-control samples including 179 cases and 769 controls from Biobank Japan (replication 1), and 142 cases and 251 controls from various hospitals (replication 2). We did not detect any associations between rs17401966 and HCC in the Japanese cohorts (replication 1: OR = 1.09; 95 % CI = 0.82-1.43, replication 2: OR = 0.79; 95 % CI = 0.54-1.15). We further examined Korean case-control samples comprising 164 cases and 144 controls (replication 3) and Hongkongese 94 HCC cases and 187 CHB controls (replication 4), but again did not detect any association (replication 3: OR = 0.95; 95 % CI = 0.66-1.36, replication 4: OR = 1.17; 95 % CI = 0.79-1.75). Logistic regression analysis adjusted for age and gender also did not show any association ($P_{\log} = 0.65, 0.27, 0.11, 0.56$ for each replication

panel). Moreover, we conducted meta-analysis to combine these studies, also not detect any association ($P_{\text{meta}} = 0.97$).

Discussion and conclusions

Zhang et al. [5] reported that SNP rs17401966 was significantly associated with HBV-related HCC (joint OR = 0.61). They conducted a GWAS using 348 cases and 359 controls in a population in Guangxi in southern China, and selected 45 SNPs for the replication study based on the results ($P < 10^{-4}$). In the first replication study, they used 276 cases and 266 controls from Beijing in northern China, and 5 SNPs showed the same direction of association as in the GWAS ($P < 0.05$). They performed a further replication study (of 507 cases and 215 controls) in Jiangsu in eastern China and only one SNP showed the same trend ($P = 3.9 \times 10^{-5}$). Guangdong and Shanghai samples from southern and eastern China were used for further replication studies. The association yielded a p-value of 1.7×10^{-18} on meta-analysis.

We performed four replication analyses using Japanese, Korean and Hong Kong Chinese samples (Table 1). Although sample size of each cohort is smaller than that of the previous GWAS, we conducted meta-analysis of all our study. The result did not show any association between rs17401966 and HBV-derived HCC ($P_{\text{meta}} = 0.97$).

This may be due to differences in genetic diversity among Japanese, Korean and Chinese populations. A maximum-likelihood tree of 126 populations based on 19,934 SNPs showed that Japanese and Korean populations form a monophyletic clade with a 100 % bootstrap value [6]. However, Chinese populations form a paraphyletic clade with two other populations. This indicates that Japanese and Korean populations are genetically closer to one another than the Chinese population.

Table 1 Association between rs17401966 and HBV-derived HCC

cohort	sample size (cases/controls)	cases			controls			HWE p	OR (95 % CI)	P^a	P_{het}^b
		GG	AG	AA	GG	AG	AA				
replication 1 (Japan 1)	179/769	13 (7.2)	61 (34.1)	105 (58.7)	45 (5.9)	261 (33.9)	463 (60.2)	0.599	1.09 (0.82-1.43)	0.578	
replication 2 (Japan 2)	142/251	5 (3.5)	46 (32.4)	91 (64.1)	14 (5.6)	91 (36.2)	146 (58.2)	1	0.79 (0.54-1.15)	0.212	
replication 3 (Korea)	164/144	17 (10.4)	59 (36.0)	88 (53.6)	15 (10.4)	55 (38.2)	74 (51.4)	0.616	0.95 (0.66-1.36)	0.790	
replication 4 (Hong Kong)	94/187	10 (10.6)	39 (41.5)	44 (46.8)	13 (6.9)	80 (42.8)	94 (50.3)	0.767	1.17 (0.79-1.75)	0.432	
Meta-analysis ^c									0.996 (0.84-1.18)	0.965	0.423

^aP value of fisher's exact test for allele model.

^bResult of Breslow-Day test.

^cResults of meta-analysis were calculated by the Mantel-Haenzel method.

We did not find any association with Hong Kong Chinese cohort ($P = 0.43$). Moreover, a study using 357 HCC cases and 354 HBV-positive non-HCC controls in Hong Kong Chinese did not show any significant difference ($P = 0.91$) [7]. Previous population studies have revealed that various Han Chinese populations show varying degrees of admixture between a northern Altaic cluster and a southern cluster of Sino-Tibetan/Tai-Kadai populations in southern China and northern Thailand [6]. Although Hong Kong is located closed to the Guangdong (cohort 3 of Zhang et al study), there is great heterogeneity for rs17401966 between Hong Kong cohorts (our study and Chan's study [7]) and Guangdong cohort (our study versus Zhang's study: $P_{\text{het}} = 0.0066$; Chan's study versus Zhang's study: $P_{\text{het}} = 0.035$). This result suggests the existence of other confounding factors, which can differentiate the previous study in China and this study.

One of the possible reasons could be the high complexity of multivariate interactions between the genomic information and the phenotype that is manifesting. HCC development is a multiple process which links to causative factors such as age, gender, environmental toxins, alcohol and drug abuse, higher HBV DNA levels, and HBV genotype variations [8]. The eight HBV genotypes display distinct geographical and ethnic distributions. Genotypes B and C are prevalent in Asia. Specific variations in HBV have been associated with cirrhosis and HCC. These variations include in particular mutations in pre-core region (Pre-C), in basal core promoter (BCP) and in ORF encoding Pre-S1/Pre-S2/S and Pre-C/C. Because there is an overlap between Pre-C or BCP mutations and genotypes, these mutations appear to be more common in genotype C as compared to other genotypes [9].

Aflatoxins are a group of 20 related metabolites and Aflatoxin B1 is the most potent naturally occurring chemical liver carcinogen known. Aflatoxin exposures multiplicatively increase the risk of HCC in people chronically infected with HBV, which illustrates the deleterious impact that even low toxin levels in the diet can have on human health [10–12]. Liu and Wu estimated population risk for aflatoxin-induced HCC around the world [13]. Most cases occur in sub-Saharan Africa, Southeast Asia and China, where populations suffer from both high HBV prevalence and largely uncontrolled exposure to aflatoxin in food. But we could not obtain the information of these confounding factors from both of the previous GWAS study and this study. A much wider range of investigations is thus needed in order to elucidate the differences in HCC susceptibility among these Asian populations.

Methods

Samples

Case and control samples used in this study were collected from Japan, Korea and Hong Kong listed in supplementary

Additional file 1: Table S1. A total of 179 cases and 769 control subjects were analyzed in the first replication study. DNA samples from both CHB controls and HBV-related HCC cases used in this study were obtained from the BioBank Japan at the Institute of Medical Science, the University of Tokyo [14]. Among the BioBank Japan samples, we selected HBsAg-seropositive CHB patients with elevated serum aminotransferase levels for more than six months, according to the guidelines for diagnosis and treatment of chronic hepatitis from The Japan Society of Hepatology (<http://www.jsh.or.jp/medical/guidelines/index.html>). The mean (and standard deviation; SD) age was 62.0 (9.4) years for the cases and 54.7 (13.5) years for the controls. The second Japanese replication sample sets for the cases ($n = 142$) and controls ($n = 251$) study were obtained from 16 hospitals. The case samples for the second replication included 142 HCC patients and the controls included 135 CHB patients and 116 asymptomatic carriers (ASC). The mean (SD) age was 61.3 (10.2) years for the cases and 56.2 (10.9) years for the controls. The Korean replication samples were collected from Yonsei University College of Medicine. The third replication set was composed of 165 HCC patients and 144 CHB patients. The mean (SD) age was 52.2 (8.9) and 37.3 (11.3) years for the cases and controls, respectively. The samples in Hong Kong were collected from the University of Hong Kong, Queen Mary Hospital. The fourth replication set was composed of 94 HCC patients and 187 CHB patients. The mean (SD) age was 58.0 (10.5) and 56.9 (8.3) years for the cases and controls, respectively. All participants provided written informed consent. This research project was approved by the Research Ethics Committees at the Institute of Medical Science and the Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, Yonsei University College of Medicine, the University of Hong Kong, National Center for Global Health and Medicine, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Teine Keijinkai Hospital, Iwate Medical University, Saitama Medical University, Kitasato University School of Medicine, Musashino Red Cross Hospital, Kanazawa University Graduate School of Medicine, Shinshu University School of Medicine, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Kyoto Prefectural University of Medicine, National Hospital Organization Osaka National Hospital, Kawasaki Medical College, Tottori University, Ehime University Graduate School of Medicine, and Kurume University School of Medicine.

SNP Genotyping

For the first replication samples, we genotyped rs17401966 using PCR-based Invader assay (Third Wave Technologies, Madison, WI) [15], and for the second, third and fourth replication samples, we used TaqMan genotyping assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). In the TaqMan SNP