

E. 結論

来年度以降は、取得したデータを用いたネットワーク解析で意義ある結果を出すことを目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

Anai, Y., Ochi, H., Watanabe, S., Nakagawa, S., Kawamura, M., Gojobori, T., and Nishigaki, K. (2012) Infectious Endogenous Retroviruses in Cats and Emergence of Recombinant Viruses J. of Virology 86 (16): 8634-44.

2. 学会発表

T. Gojobori (2012) “Genome Research with Big Data – How can we make “data driven

scientific discovery” possible?-” (Keynote speech)、国際シンポジウム「Genome Research」(東京農業大学ゲノム解析センターご開催)、品川コクヨホール (東京) 1 月 21 日

G. 知的所得権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：脇田 隆字 国立感染症研究所 ウイルス第二部 部長

分担研究課題：ウイルス因子の解析

研究要旨：本研究の目的は、B型肝炎ウイルス感染に起因する各種の病態形成に関わる宿主（ヒト）因子を網羅的ゲノム解析により同定し、新たな診断法や治療法の開発に寄与することにある。そのためにウイルス側因子も解析する。宿主ゲノム解析をおこなった検体についてウイルスゲノムについて塩基配列および機能解析をおこなう。

A. 研究目的

研究班の目的は、B型肝炎ウイルス感染に起因する各種の病態形成に関わる宿主因子を網羅的ゲノム解析により同定し、新たな診断法や治療法の開発に寄与することにある。そのために患者毎にウイルスゲノムの解析も実施することにより、各種病態形成に関わる宿主遺伝要因間や宿主遺伝要因とウイルス因子間の相互作用も明らかにする。研究班では、1) HBV 持続感染、2) HBV 関連肝癌、3) HBV 再活性化、4) HBV 重症化（劇症化）、5) インターフェロン(IFN)などの薬剤への応答性、のそれぞれに関与する遺伝要因を同定する予定である。そこで、本分担研究ではB型肝炎患者群のウイルスを解析する。

B. 研究方法

1. HBV が持続感染している HBe 抗原陽性無症候性キャリア 9 名の血清から、HBV DNA をクローニングしてその配列を決定する。データベース上の既報の HBV ゲノム配列との相同性を確認する。さらに 1.3 倍長のゲノムを再構築してウイルス増殖性を検討する。
2. 徳永班および田中班で収集されたサンプルの HBV DNA 解析をおこなう。

（倫理面への配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成 13 年 3 月 29 日付 12 文科振第 266 号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

C. 研究結果

1. 収集した患者サンプルの HBV 遺伝子型は A が 3 名、B が 1 名、C が 5 名であった。すべての症例で HBV DNA は 8.8 log copies/mL 以上と高値であった。またすべて HBe 抗原は陽性、HBe 抗体は陰性であった。血清サンプルから total DNA を抽出して、HBV 特異的プライマーにより HBV DNA を増幅した。さらにすべての PCR 産物を 4 クローン以上クローニングしてそのコンセンサス配列を決定した。データベース上の各遺伝子型ウイルス遺伝子との相同性は、ほとんどのサンプルで 95% 以上であった。現在発現プラスミドの構築が終了して、その

複製増殖能を検討中である。

2. 徳永班、田中班で収集された検体について 45 サンプルを受領した。ウイルスゲノム解析を順次実施する予定である。

D. 考察

HBe 抗原陽性 HBV キャリアのウイルスゲノムは比較的単一であり、その複製増殖活性も旺盛であると予測される。複製増殖に関わるウイルス因子の解析を進める必要がある。そのために様々なコホートの HBV ゲノム解析を実施する。

E. 結論

HBe 抗原陽性 HBV キャリアの HBV ゲノムを解析した。現在機能解析を実施している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. Gastroenterology. 2013 144(1):56-58.e7.
- 2) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel cell

culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. J Virol. 2012 86(19):10805-20.

- 3) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. PLoS Pathog. 2012;8(3):e1002561.
- 4) Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. Microbiol Immunol. 2012 56(5):308-17.

2. 学会発表

渡士幸一、内田奈々、大東卓史、史与原知子、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆宇、IL1 および TNF-alpha の B 型肝炎ウイルス感染阻害活性、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、グランキューブ大阪、(2012, 11.13-15)

G. 知的所得権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター
臨床研究センター長
研究協力者：裏 成寛 国立病院機構長崎医療センター 肝臓内科
長岡 進矢 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター
肝炎治療研究室長
阿比留正剛 国立病院機構長崎医療センター 肝臓内科医長

分担研究課題：HBe 抗原セロコンバージョン時点からの肝発癌因子の解析

研究要旨：過去 15 年間の当院における HBe 抗原陽性 B 型慢性肝炎（HBeAg 陽性 CHB）患者のデータを後ろ向き解析し、HBeAg 陽性時からフォローして HBeAgSC 時点を確認し得た 100 症例において、その後の肝発癌因子に関して検討した。9 例（9%）で HBeAgSC 後発癌を認め、単変量解析では、HBeAgSC 時の年齢・血小板・LC において有意差を認め、多変量解析では HBeAgSC 時の血小板 ≤ 130 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) が独立因子として抽出された。観察開始時・HBeAgSC 時・最終観察時の血小板中央値は、非 HCC 群と比べて HCC 群で低下する傾向にあった。

A. 研究目的

HBeAgSC 時点を確認し得た 100 症例において、その後の発癌因子に関して検討する。

者の個人情報の扱いについては連結可能匿名化をおこなうなど十分な配慮のもとで解析をおこなった。

B. 研究方法

1991 年から 2005 年までの当院初診 HBeAg 陽性 231 症例のうち、その後 HBeAgSC を来し自然経過でフォローされた 100 症例を対象とし、後ろ向き解析を行った。Genotype は全て C。HBeAgSC 後に核酸アナログを投与された例に関しては、投与開始時点で観察打ち切りとした。観察期間中に肝発癌を来した群（HCC 群）と、それ以外（非 HCC 群）に関して、年齢・性別・ALT・血小板・AFP・肝硬変（LC）有無・HBVDNA・プレコア変異・コアプロモーター変異・HBeAg 陽転化有無・HBeAg 陰性肝炎有無の各項目で比較検討した。

C. 研究結果

観察期間（中央値 8.2 年）において、9 例（9%）で肝発癌を認めた。単変量解析では、HBeAgSC 時の年齢（ $p=0.008$ ）、血小板（ $p=0.003$ ）、LC（ $p=0.001$ ）において有意差を認めた。Cox 比例ハザード解析では、そのうち HBeAgSC 時の血小板 ≤ 130 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) が発癌の独立因子として抽出された（オッズ比 8.450 [95%信頼区間 1.424-50.138]、 $p=0.019$ ）。全 100 症例における HBeAgSC 後累積発癌率は、5、10、15 年で各 4.3、9.8、18.9%であった。血小板 ≤ 130 ($\times 10^3/\text{mm}^3$)（ $n=25$ ）における HBeAgSC 後累積発癌率は、各 16.3、37.2、49.8%であり、血小板 >130 ($\times 10^3/\text{mm}^3$)（ $n=75$ ）の各 0、0、8.3%と比べて有意に高かった（ $p<0.001$ ）。また観察開始時・HBeAgSC 時・最終観察時

（倫理面への配慮）

本研究は、後ろ向き観察研究であり、患

の血小板推移(中央値)は、非 HCC 群 (n=91) では各 187、171、178 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) であるのに対し、HCC 群 (n=9) では各 176、103、103 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) と低下傾向にあった。

D. 考察

HBeAgSC は CHB 自然経過において重要なイベントであるが、特に Genotype C では HBeAgSC が遅れるため難治であるとされている。過去に Liaw らが 40 歳以上での HBeAgSC にて HBeAg 陰性肝炎・肝硬変・発癌のリスクがより高いと報告しているが、今回我々の解析でも 40 歳以上での HBeAgSC において発癌率が有意に高かった。多変量解析では血小板 ≤ 130 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) が独立因子として残ったが、HCV と比べ、HBV と血小板の相関の報告は少ない。一般的に HBeAgSC までは肝炎を伴うため、肝線維化が進行し、血小板は低下する。HBeAgSC までの血小板推移に注目することは、B 型慢性肝炎の予後予測に有用であると考えられる。

E. 結論

HBeAgSC 症例であっても、HBeAgSC 時点の血小板 ≤ 130 ($\times 10^3/\text{mm}^3$) である症例は、その後の発癌に関して慎重なフォローアップが必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bae SK, Yatsuhashi H, Hashimoto S, Motoyoshi Y, Ozawa E, Nagaoka S, Abiru S, Komori A, Migita K, Nakamura M, Ito M, Miyakawa Y, Ishibashi H. Prediction of early HBeAg seroconversion by decreased titers of HBeAg in the serum combined with increased grades of lobular inflammation in the liver. Medical Science Monitor. 2012 18(12): CR698-705

- 2) Toyama T, Ishida H, Ishibashi H, Yatsuhashi H, Nakamuta M, Shimada M, Ohta H, Satoh T, Kato M, Hijioka T, Takano H, Komeda T, Yagura M, Mano H, Watanabe Y, Kobayashi M, Mita E. Long-term outcomes of add-on adefovir dipivoxil therapy to ongoing lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. Hepatol Res. 2012. 42(12): 1168-74
- 3) Migita K, Abiru S, Ohtani M, Jiuchi Y, Maeda Y, Bae SK, Bekki S, Hashimoto S, Yesmembetov K, Nagaoka S, Nakamura M, Komori A, Ichikawa T, Nakao K, Yatsuhashi H, Ishibashi H, Yasunami M. HLA-DP gene polymorphisms and hepatitis B infection in the Japanese population. Transl Res. 2012 Dec. 160(6): 443-4
- 4) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Res. 2012 Feb;42(2):139-149

2. 学会発表

2013 年 6 月肝臓学会総会 (予定)

「HBe 抗原セロコンバージョン時点からの発癌因子解析」

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：松本 晶博 信州大学医学部消化器内科 特任研究員

研究協力者：田中 榮司 信州大学医学部消化器内科 教授

分担研究課題：経口抗ウイルス剤耐性に関与する宿主因子の探索

研究要旨：B型慢性肝炎の核酸アナログ治療における問題点として、長期投与による耐性株の出現があげられる。今回我々は核酸アナログ耐性例22例について将来的な耐性株出現に関与する宿主側の要因を検討するために、まずウイルス側の因子を検討した。8年以上経過観察が可能であったラミブジン（LAM）継続治療13例とLAM耐性株にアデホビル（ADV）を併用した9例について、治療開始前のHBVの全遺伝子解析を行った。それらを、新たに開発した、「連続変数型遺伝子関連検査法」により耐性株出現に関連する遺伝子変異を抽出した。耐性株出現に関連する遺伝子変異の集簇するnt2100-2300の配列を用いて分子系統樹解析を行うことで、効率的に遺伝子変異が出現しにくい症例を抽出することが可能であった。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療における問題点の一つである耐性株の出現を予測する宿主およびウイルス因子を同定する。

B. 研究方法

B 型慢性肝炎に対する LAM 長期投与例 13 例および LAM 耐性株出現 9 例について治療前の HBV 遺伝子の全塩基配列を決定し、新たに開発した、「連続変数型遺伝子関連検査法」を用いて、耐性株出現に関連する遺伝子変異を同定し、分子系統樹解析を用いて耐性株出現群と非出現群を予測する。

（倫理面への配慮）

患者さんより文書にて研究の同意を取得し、連結可能匿名化した検体を用いて結果の判定を行った。

C. 研究結果

核酸アナログ投与開始前の全塩基配列より「連続変数型遺伝子関連検査法」を用いて、耐性株出現に関連する遺伝子変異を検

討したところ、nt 2100-nt 2300 に関連する遺伝子が集簇していることが判明した。分子系統樹解析を行うと、症例は 2 群に別れ、第 1 の群では耐性株出現率が 2/11(18%)であり、他群では 7/11(63%)であり、耐性株出現率が異なる傾向にあった。(p=0.080)

D. 考察

症例を増やすことにより、有意差が得られ右可能性がある。この方法によ LAM 投与前に耐性株が出現しやすい症例を抽出することができる。

E. 結論

ウイルス全塩基配列決定と、新規の解析法により、治療開始前に効率的に耐性株の出現しやすい症例を抽出できる可能性がある。今後宿主側の因子を解析する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumoto A, Tanaka E, Morita S, Yoshizawa K, Umemura T, Joshita S. Changes in the serum level of hepatitis B

virus (HBV) surface antigen over the natural course of HBV infection. J Gastroenterol. 2012;47:1006-1013.

- 2) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Res. 2012;42:139-149.

2. 学会発表

- 1) 松本晶博、森田 進、田中榮司. B 型肝炎の自然経過例における HBsAg 消失予測と、この予測を用いた核酸アナログ治療例での評価. 第 48 回日本肝臓学会総会 ST1-3

- 2) 松本晶博、吉澤 要、田中榮司. B 型肝炎に対する核酸アナログ薬中止をめざしたシーケンシャル療法の検討. 第 48 回日本肝臓学会総会 WS22-9
- 3) 森田 進, 松本晶博, 上條のぞみ、柴田壮一郎, 市川 雪、木村岳史、城下智, 小松通治, 梅村武司, 田中榮司. HBe 抗原セロコンバージョン前後での HBV マーカーの推移と HBe 抗原陰性 B 型肝炎の発症. 第 48 回日本肝臓学会総会

G. 知的所得権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院 消化器・腎臓内科学 教授
研究協力者：神田 達郎 千葉大学大学院医学研究院 消化器・腎臓内科学 講師
今関 文夫 千葉大学総合安全衛生管理機構 機構長・教授
中本 晋吾 千葉大学大学院医学研究院 分子ウイルス学 助教

分担研究課題：血中 HBV DNA レベルに及ぼす宿主規定因子の検討
（慢性肝炎、自然経過・肝癌）

研究要旨：血中 HBV DNA レベルに及ぼす宿主規定因子の検討を明らかにするため B 型肝炎無症候性キャリア、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌患者の血液を採取、収集を開始した。今後可能であれば本研究班により集められた血液サンプルで **Genome-wide association study (GWAS)**等を行なうていただきその宿主規定因子を探索検討する。昨年度千葉大学生命倫理委員会に申請承認が得られた研究プロトコールに基づき千葉大学医学部附属病院消化器内科にて血液採取、収集を開始した。今後もこの研究プロトコールに基づき血液採取、収集を行なう予定である。

A. 研究目的

これまでに HBe 抗原の存在や HBV DNA 高値は肝硬変や肝細胞癌発生の独立した危険因子であることが報告されている。しかしこれまでに血中 HBV DNA レベルに及ぼす宿主規定因子は不明であり、特に慢性肝炎で、その宿主因子を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

本研究班により集められた血液サンプルを用いて **Genome-wide association study (GWAS)**等を行なうていただきその宿主規定因子を探索検討する。本年度は平成 23 年 9 月 12 日千葉大学生命倫理委員会で承認が得られた研究プロトコール[研究課題名「B 型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主遺伝子因子の探索研究」（受付番号 308）に基づき血液採取、収集血液採取、収集を開始する。

（倫理面への配慮）

千葉大学では少数民族を含む人権に十分配慮を行なっている。臨床検体は千葉大学医学部倫理委員会の承諾を得た上で取り扱う。

C. 研究結果

平成 23 年 9 月 12 日千葉大学生命倫理委員会で承認が得られた研究プロトコール[研究課題名「B 型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主遺伝子因子の探索研究」（受付番号 308）に基づき平成 24 年 4 月 4 日以降 B 型肝炎患者 34 名（無症候性キャリア 14 名、慢性肝炎 15 名、肝硬変 2 名、肝細胞癌 3 名）の同意承諾を得た後に血液採取、収集を行なった。

D. 考察

上記研究プロトコールに基づき次年度以降も血液採取、収集を行なう。
また、得られた GWAS の結果を解析し、B 型肝炎の病態に及ぼす宿主因子を検討する予定である。

E. 結論

B型肝炎患者 34 名（無症候性キャリア 14 名、慢性肝炎 15 名、肝硬変 2 名、肝細胞癌 3 名）の遺伝子解析用血液採取、収集を行なった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Imazeki F, Yokosuka O. Knockdown of receptor-interacting serine/threonine protein kinase-2 (RIPK2) affects EMT-associated gene expression in human hepatoma cells. *Anticancer Res.* 2012 Sep;32(9):3775-83.
- 2) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Roger T, Shirasawa H, Nomura F, Yokosuka O. Hepatitis B virus e antigen physically associates with receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 and regulates IL-6 gene expression. *J Infect Dis.* 2012 Aug 1;206(3):415-20.
- 3) Suzuki E, Chiba T, Zen Y, Miyagi S, Tada M, Kanai F, Imazeki F, Miyazaki M, Iwama A, Yokosuka O. Aldehyde dehydrogenase 1 is associated with recurrence-free survival but not stem cell-like properties in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2012 Nov;42(11):1100-11.
- 4) Yan J, Kanda T, Wu S, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatitis A, B, C and E virus markers in Chinese residing in Tokyo, Japan. *Hepatol Res.* 2012 Oct;42(10):974-81.

- 5) Arai M, Togo S, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Quantification of hepatitis B surface antigen can help predict spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Apr;24(4):414-8.

2. 学会発表

- 1) T. Kanda, J. Yan, S. Wu, F. Imazeki, O. Yokosuka. Chinese residing in Tokyo, Japan, have more immunity against HAV and HBV. 14th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON VIRAL HEPATITIS AND LIVER DISEASE. Shanghai, China, 2012.6.22-25.
- 2) T. Kanda, S. Nakamoto, X. Jiang, T. Miyamura, S. Wu, M. Arai, K. Fujiwara, F. Imazeki, O. Yokosuka. Different effects of IL28A, IL28B and IL29 on Toll-like receptor related gene expression in human hepatocytes. The Liver Meeting 2012. The 63rd Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Diseases, HYNES CONVENTION CENTER, Boston, Massachusetts, USA, 2012.11.9-13.

G. 知的所得権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：持田 智 埼玉医科大学 消化器内科・肝臓内科 教授
研究協力者：中山 伸朗 埼玉医科大学 消・肝内科 准教授
菅原 通子 埼玉医科大学 消・肝内科 助教
吉野 廉子 埼玉医科大学 消・肝内科 助教
内田 義人 埼玉医科大学 消・肝内科 助教

分担研究課題：B型肝炎ウイルスの生体内における増殖速度を規定するウイルス側要因

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の再活性化に関与する要因を明らかにするために、その増殖能を規定する生体側の要因とともに、ウイルス学的背景を明らかにする必要がある。そこで、核酸アナログ製剤投与後にHBe抗体陽性、HBV-DNA量2.1 Log copy/mL未滿が1年以上持続し、コア関連抗原が3.0 Log IU/mL未滿になった症例を対象として、同製剤の投与を中止し、その後のHBV-DNA量の増加速度と、ウイルス遺伝子の塩基配列の関連を解析した。HBV-DNA量はpre-core変異を伴うgenotype Bjおよびpre-coreとcore promoter変異をともに伴ったgenotype Cの場合に早期に増加した。また、これら症例を増加速度によって3群に分類し、全塩基配列を群間で比較すると、増殖速度の比較的遅い症例ではcore 150-154とpolymerase 14-19の領域に変異を伴った症例が高率に認められた。これらHBVの遺伝子変異は再活性化にも関与している可能性があり、今後、検討する価値があると考えられた。

A. 研究目的

HBV は東アジアに蔓延しており、我が国では約 150 万人のキャリア、約 1,000 万人の既往感染例が存在する。キャリアでは、ウイルスに対する免疫応答が生じた際に、血清 HBV-DNA 量が高値の場合に肝炎が成立し、これが長期間に及ぶと慢性肝炎から肝硬変へと進展し、この過程で肝癌を併発する場合がある。また、キャリアのみならず既往感染例は、免疫抑制・化学療法実施時に HBV の再活性化を生じ、重症肝炎を発症するリスクがある。従って、HBV 感染者における肝病態を規定する要因としては、生体内におけるウイルスの増殖能を規定する要因を明らかにする必要がある。

一方、HBV に対する抗ウイルス療法は核酸アナログの導入によって多大なる進展を遂げた。2000 年に lamivudine、2004 年に

adefovir、更に 2006 年には entecavir が保険認可され、現在では 3 種類の核酸アナログが使用可能となっている。これら薬物を使い分けることで、キャリアの大部分で慢性肝疾患の進展を防止することが可能となった。また、キャリアおよび既往感染例における免疫抑制・化学療法実施時の HBV 再活性化は、核酸アナログの投与によって重症肝炎の発症を予防できるようになっている。しかし、医療経済的な観点では、これら症例で核酸アナログを中止することが求められる。厚労省研究班は血清 HBs 抗原量およびコア関連抗原量を指標とした核酸アナログの中止基準を発表したが、この基準を満たす症例は一部であり、大部分の症例では投薬を継続せざるを得ないのが現状である。

そこで、我々は血清 HBV-DNA 量、コア関連抗原量が 1 年以上にわたって検出感度未

満を持続する症例で、核酸アナログを中止した後のウイルス動態を検討することで、その増殖速度を規定するウイルス側の要因を検討した。更に、これら症例の遺伝子解析を行うことで、ウイルス側と宿主側の要因の関連を明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

B 型慢性肝炎ないし肝硬変で、血清 HBV-DNA 量が 4.0 Log copy/mL 以上で核酸アナログ製剤の投与を開始した 202 例 (entecavir 140 例, entecavir と adefovir 3 例, lamivudine 24 例, lamivudine と adefovir 併用 30 例, adefovir 4 例, tenofovir と adefovir 併用 1 例)。HBe 抗体陽性で血清 HBV-DNA 量 2.1 Log IU/mL 未満が 1 年以上持続した症例でコア関連抗原を 8 週間隔で測定し、2 回連続で検出感度 (3.0 Log IU/mL) 未満を示した症例で中止した。血清 HBV-DNA 量は中止後 16 周までは 2 週ごとに、その後は 4 週ごとに測定し、4.0 Log copy/mL 以上になった症例では、ウイルスの塩基配列を解析し、再燃例として核酸アナログ製剤を再開した。

C. 研究結果

202 例のうち中止基準を満たしたのは計 34 例 (16.8 %) で、うち entecavir 投与例は 26 例であった。中止後に再燃の見られなかった症例は 8 例 (23.5 %) で、全例が entecavir 投与例であった。再燃した 26 例のうち 1 例は中止時にインターフェロンを用いた sequential 療法を実施しており、これを除いた 25 例で生体内における血清 HBV-DNA の上昇速度とウイルス遺伝子の塩基配列との関連を検討した。

これら 25 例のうち 24 症例でウイルス遺伝子の全塩基配列を検討し、うち 17 例 (70.8%) は genotype B (Bj : 16 例, Ba : 1 例) で、これらには pre-core 変異を伴うウイルス株が多かった。一方、7 例 (29.2%) は genotype C で、これらには pre-core と basic core promoter 変異をともに伴ったウイルス株が多かった。

一方、これら症例で血清 HBV-DNA の増加速度を評価すると、genotype, pre-core 変異, basic core promoter 変異との間には明らかに関連が認められなかった。しかし、genotype B, C の何れのウイルス株の場合でも、生体内における増殖速度の遅い症例では、nt2,349 から nt2,357 にかけての変異が高率に認められた。

D. 考察

核酸アナログ中止後における血清 HBV-DNA 量の増加速度を評価することで、生体内におけるウイルスの増殖速度を評価することが可能であった。ウイルス遺伝子の全塩基配列を解析して、血清 HBV-DNA 量の増加速度との関連を見ることで、nt2,349 から nt2,357 の変異がウイルス増殖に関与する可能性を見出した。同部位はコア領域の ORF では aa151 から aa153 に、ポリメラーゼ領域の ORF では aa15 から aa17 に相当し、前者では R151Q/G, R152Q or G153C, 後者では D15/E, D16N or E17D/G/N の変異が観察された。これらのうち、ポリメラーゼ領域の変異は terminal protein domain に相当し、アミノ酸の極性が変化することから、その primer 機能に影響する可能性がある。

E. 結論

核酸アナログの効果が良好な症例で、その投与を中止した後の HBV-DNA 量の推移を評価することで、ウイルス増殖速度を生体内で評価することが可能であった。その結果、ポリメラーゼ領域 aa15 から aa17 のアミノ酸変異はウイルスの増殖速度を規定している可能性がある。より多数例で検討するとともに、その機能を in vitro でも検証し、これら変異の意義を明確にする必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshino K, Uchida Y, Sugawara K, Kouyama J, Naiki K, Inao M, Nakayama N, Mochida S. The aa15-17 amino acid sequence in the terminal protein domain of

the hepatitis B virus polymerase as a possible viral factor affecting the in vivo replication activity of the virus. (submitted)

2. 学会発表

- 1) 吉野廉子, 菅原通子, 持田 智. B 型慢性肝炎における核酸アナログの中止基準: 再燃例におけるウイルス増殖速度からの解析. ワークショップ「B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の継続と終了をめぐって」. 第 48 回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012 年 6 月.
- 2) 内田義人, 神山淳一, 内木佳代子, 吉野廉子, 菅原通子, 持田 智. B 型肝炎ウ

イルスの増殖速度を規定するウイルス側要因の解析. シンポジウム「B 型肝炎診療: ウイルス増殖と免疫反応から」. 第 39 回日本肝臓学会東部会, 東京, 2012 年 12 月.

G. 知的所得権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者： 小池 和彦 東京大学 教授
研究協力者： 近藤 祐嗣 東京大学医学部附属病院 助教

分担研究課題：肝癌感受性遺伝子の同定

研究要旨：東京大学消化器内科における、最近 10 年間（平成 15 年 1 月～平成 24 年 12 月）の HBV 関連肝細胞癌の入院治療患者数は 233 例であった。当科では HBV 関連肝細胞癌入院患者の臨床情報の詳細につき前向きにデータベース化するとともに、書面による同意を得て血液検体を収集し、本学ならびに共同研究施設における遺伝子多型解析に用いるシステムを構築してきた。今後の本研究班の研究に資する予定である。
また HBV 関連肝癌の病態、特に宿主因子の解明のため、過去 5 年間の HBV 肝癌例の家族歴を調査したところ、HBV 関連肝細胞癌 121 例のうち、母親の HBV 感染や発癌が把握されていた例はそれぞれ 39 例、6 例、また同胞の HBV 感染や発癌が確認された例は 30 例、9 例であった。複数の同胞が発癌している高度発癌集積家系が 4 例認められた。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス（HBV）感染症は世界で最も蔓延しているウイルス肝炎であり、我が国でも 100 万人を超える持続感染者が存在する。HBV を感染宿主から完全に排除することは出来ず、持続感染者の一部は肝硬変や肝細胞癌の発症に至り、致死的経過をたどるため、HBV 関連肝疾患は今後も医学的ならびに医療経済的に大きな問題であり続けると推測される。HBV 感染症と、それに引き続く肝硬変、肝細胞癌を的確に治療するためには、ウイルス因子のみならず、宿主（患者）因子を考慮することが必要である。本研究は、HBV 関連肝細胞癌の発生や再発、および線維化の進行に影響を与える感受性遺伝子の同定を目的とする。

B. 研究方法

東京大学消化器内科における HBV 関連肝細胞癌症例の発癌時期、部位、治療効果、再発の様式等の臨床情報を、前向きにデータベースに登録する。本学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た研究計

画に基づき、患者の同意を得て血球の採取、保存を行い、本学および共同研究施設にて網羅的遺伝子多型解析を実施する。

（倫理面への配慮）

新 GCP を遵守し、臨床試験の目的・方法、検査の副作用、患者に関する個人情報、守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した。

C. 研究結果

東京大学消化器内科における、最近 10 年間（平成 15 年 1 月～平成 24 年 12 月）の HBV 関連肝細胞癌の入院治療患者数は 233 例であった。このうち同意を得られた症例の検体採取を行なった。

また過去 5 年間（平成 19 年 1 月～23 年 12 月）の当科 HBV 関連肝細胞癌 121 例（男性 97 例、女性 24 例、平均年齢 60.5 歳）の家族歴を、主に外来受診または入院時の問診記録により調査したところ、母親の HBV 感染、

発癌が把握されていた例はそれぞれ 39 例、6 例、また同胞の HBV 感染や発癌が確認された例は 30 例、9 例であった。複数の同胞が発癌している高度発癌集積家系が 4 例（男性 2 例、女性 2 例、平均発癌年齢 62.8 歳）認められ、それぞれの家系の本人を含めた発癌人数は 14 人きょうだい中 5 人、5 人中 4 人、3 人中 3 人、3 人中 2 人であった。

D. 考察

本邦における新規肝細胞癌の発生は漸減傾向にあり、特に C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の減少が目立つが、HBV 関連肝細胞癌は依然減少しておらず、今後も数十年にわたり、一定数の発癌例が認められると推測される。近年の核酸アナログ製剤の登場により、HBV の増殖を直接抑制できるようになった結果、多くの症例で肝炎の沈静化や線維化の抑制が得られるようになり、発癌率の低下や生命予後の改善が得られると期待されるが、肝炎症や線維化が軽微であっても発癌に至る例は存在する。発癌リスクの的確な把握のためには、ウイルス因子や通常の臨床情報に加え、宿主遺伝的因子の解析が不可欠であると考えられる。

また、家族歴の情報は、宿主因子の一端を解明する手がかりとなる可能性があるが、そのためには基本的な問診の重要性を再認識する必要がある。

E. 結論

HBV 関連肝細胞癌患者の臨床データを蓄積し、血球検体の採取を行ってきた。今後の研究班における網羅的多型解析に用いていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 Jan 31.

doi:pii: S0006-291X(13)00183-6.

10.1016/j.bbrc.2013.01.093. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23376718.

- 2) Hikita H, Enooku K, Satoh Y, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Tateishi R, Soroida Y, Sato M, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatol Res* 2013 Jan 3. doi:10.1111/hepr.12061. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23356977.
- 3) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. *J Hepatol* 2013 Jan 12. doi:pii: S0168-8278(13)00011-1. 10.1016/j.jhep.2012.12.024. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23321320.
- 4) Gotoh H, Enooku K, Soroida Y, Sato M, Hikita H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Yamazaki T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement observed at a general health examination: A cross-sectional study. *Hepatol Res* 2012 Nov 27. doi: 10.1111/hepr.12029. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23279215.
- 5) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H. Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2012 Nov 2. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01115.x. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23131000.
- 6) Ohki T, Isogawa A, Iwamoto M, Ohsugi M, Yoshida H, Toda N, Tagawa K, Omata M, Koike K. The effectiveness of liraglutide in nonalcoholic fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus compared to sitagliptin and pioglitazone.

- ScientificWorldJournal 2012;2012:496453.
Epub 2012 Aug 13. PubMed
PMID:22927782.
- 7) Kurano M, Hara M, Tsuneyama K, Okamoto K, Iso-O N, Matsushima T, Koike K, Tsukamoto K. Modulation of lipid metabolism with the over-expression of NPC1L1 in mice liver. J Lipid Res 2012 Aug 13. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22891292.
 - 8) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. Hepatology 2013;57:162-170. PubMed PMID: 22898998.
 - 9) Hikita H, Nakagawa H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Yoshida H, Omata M, Soroida Y, Sato M, Gotoh H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. J Gastroenterol 2012 Jul 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790352.
 - 10) Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. J Gastroenterol 2012 Jul 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790350.
 - 11) Okushin K, Asaoka Y, Fukuda I, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Mikami S, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Tateishi R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Koike K. IGF-II producing hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: metabolic complications and a foresight to molecular targeting therapy to the IGF signal. Case Rep Gastroenterol 2012;6(3):784-789. PubMed PMID: 23341802.
 - 12) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfectd with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. J Infect Chemother 2012;18(6):883-890. PubMed PMID: 22760340.
 - 13) Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, Koike K, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma. Hepatology 2013;57:417-418. PubMed PMID: 22707340.
 - 14) Shiina S, Tateishi R, Imamura M, Teratani T, Koike Y, Sato S, Obi S, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Omata M, Koike K. Percutaneous ethanol injection for hepatocellular carcinoma: 20-year outcome and prognostic factors. Liver Int 2012;32(9):1434-1442. PubMed PMID: 22712520.
 - 15) Uchino K, Obi S, Tateishi R, Sato S, Kanda M, Sato T, Arano T, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Systemic combination therapy of intravenous continuous 5-fluorouracil and subcutaneous pegylated interferon alfa-2a for advanced hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol 2012;47(10):1152-1159. PubMed PMID: 22438097.
 - 16) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Koike K. Mortality and morbidity of hepatectomy, radiofrequency ablation, and embolization for hepatocellular carcinoma: a national survey of 54,145 patients. J Gastroenterol 2012;47(10):1125-1133. PubMed PMID: 22426637.
 - 17) Yoshikawa T, Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, Koike K. Silencing of microRNA-122 enhances interferon- α signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. Sci Rep 2012;2:637. Epub 2012 Sep 6. PubMed PMID: 22957141.
 - 18) Mikami S, Tateishi R, Akahane M, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Computed Tomography Follow-up for the Detection of Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Initial Radiofrequency Ablation: A Single-center Experience. J Vasc Interv Radiol 2012;23(10):1269-1275. doi:10.1016/j.jvir.2012.06.032. PubMed PMID: 22999746.

- 19) Nakagawa H, Isogawa A, Tateishi R, Tani M, Yoshida H, Yamakado M, Koike K. Serum gamma-glutamyltransferase level is associated with serum superoxide dismutase activity and metabolic syndrome in a Japanese population. J Gastroenterol 2012;47(2):187-194. PubMed PMID: 21976134.
 - 20) Soroida Y, Ohkawa R, Nakagawa H, Satoh Y, Yoshida H, Kinoshita H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Shiina S, Sato T, Obi S, Hoshino T, Nagatomo R, Okubo S, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased activity of serum mitochondrial isoenzyme of creatine kinase in hepatocellular carcinoma patients predominantly with recurrence. J Hepatol 2012;57(2):330-336. PubMed PMID:22521349.
 - 21) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Kudo Y, Goto T, Yoshida H, Koike K. A miRNA machinery component DDX20 controls NF- κ B via microRNA-140 function. Biochem Biophys Res Commun 2012;420(3):564-569. PubMed PMID: 22445758.
 - 22) Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Arano T, Uchino K, Enooku K, Goto E, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Shiina S, Omata M, Koike K. Assessment of disease progression in patients with transfusion-associated chronic hepatitis C using transient elastography. World J Gastroenterol 2012;18(12):1385-1390. PubMed PMID: 22493553; PubMed Central PMCID: PMC3319966.
 - 23) Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. Cancer Sci 2012;103(4):670-676. PubMed PMID: 22320381.
 - 24) Goto E, Masuzaki R, Tateishi R, Kondo Y, Imamura J, Goto T, Ikeda H, Akahane M, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Value of post-vascular phase (Kupffer imaging) by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid in the detection of hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol. 2012;47(4):477-485.
 - 25) Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Sato T, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Yoshida H, Omata M, Koike K. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. Am J Gastroenterol 2012;107(4):569-577. PubMed PMID: 22158026.
 - 26) Enooku K, Tateishi R, Kanai F, Kondo Y, Masuzaki R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Evaluation of molecular targeted cancer drug by changes in tumor marker doubling times. J Gastroenterol. 2012;47(1):71-78. PMID: 21935635.
2. 学会発表
なし
- G. 知的所得権の出願・登録状況
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）
分担研究報告書（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部病理学教室 教授

分担研究課題：B型肝炎関連肝癌の早期診断・悪性度診断法の基礎的研究

研究要旨：biliary / stem cell markerであるCK19、EpCAM、CD133の肝細胞癌における発現および臨床病理学的な特徴に関する検討を行った。CK19の発現は分化度、門脈浸潤、線維性間質、HBsAg陽性、再発率との関連が認められ、EpCAM発現は分化度、線維性間質との関連が見られた。CK19の発現は、De novo発癌との関連、B型肝炎との関連が示唆され、今後分子的背景を含めさらに詳細に検討を行う。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス(HBV)感染に伴う肝細胞癌では、明瞭な多段階発癌過程を示さないいわゆる de novo 発癌を起こす症例があり、肝癌全体の予後の改善には de novo 発癌に関する更なる研究が望まれる。本研究は、de novo 発癌の分子病理像や多段階発癌との異同をより明確にすることにより、個々の肝癌症例に最適な診断・治療の選択を可能とすることを目的とする。B型肝炎関連肝癌の発癌や悪性度に特異的な分子やシグナル伝達経路の異常を特定することは、より有効な早期診断法・悪性度診断法の開発や新規治療標的の同定、さらには個別化治療に繋がると期待される。

B. 研究方法

1)B型肝炎関連肝癌における de novo 発癌と多段階発癌の分子機構

① 幹細胞マーカー発現と癌幹細胞性の解析、癌遺伝子・癌抑制遺伝子異常との関連の解析

② シグナル伝達経路異常と de novo 発癌、多段階発癌との関連の解析、並びに分子標的薬剤反応性の解析

2)B型肝炎関連肝癌の網羅的遺伝子発現解析およびプロテオーム解析

①癌部並びに非癌肝組織、肝癌細胞株を

用いた、網羅的発現解析とプロテオーム解析

②上記にて同定された特異的な分子異常の臨床病理学的意義の解析、並びに機能解析

（倫理面への配慮）

ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する（承認番号 16-34）。

C. 研究結果

biliary / stem cell marker である CK19、EpCAM、CD133 の肝細胞癌における発現および臨床病理学的な特徴に関する検討を行った。研究材料は、慶應義塾大学病院で 2003-2010 年に肝細胞癌と診断された肝切除検体 211 例であり、結節ごとに免疫染色および臨床病理学的因子、線維性間質増生について検討した。壊死の強いもの、混合型肝癌や細胆管癌および胆管癌様所見を含むものは除外した。免疫染色の評価方法は、CK19 は結節の 5%以上、EpCAM は 10%以

上の腫瘍細胞に染まるものを陽性とした。CD133 は正常でのコントロールである胆管では陽性であったが、殆どの症例で陽性像は得られず、評価から除外した。線維性間質に関しては HE 染色と EVG 染色で評価し、結節の 30%以上を占めるものを陽性とした。結果は CK19 陽性例が 12/211 例(5.6%)、EpCAM 陽性例は 25/211 例(11.8%)であった。臨床病理学的因子について検討したところ、CK19 陽性例では CK19 陰性例と比較して有意に、分化度が低く、門脈浸潤例が多く、線維性間質を有する症例が多かった。EpCAM 陽性例は EpCAM 陰性例に比べて有意に、分化度が低く、線維性間質を有する症例が多かった。また CK19 陽性例と EpCAM 陽性例との間には有意な関連が見られ、CK19 および EpCAM が陽性である症例は、7/211 例であった。予後に関しては、Disease Free Survival (DFS)および Overall Survival (OS)との関係をカプランマイヤー法にて検討した。CK19 陽性例は CK19 陰性例と比べて、有意に再発率が高かったが ($p<0.05$)、生存率に関しては有意な差は見られなかった($p=0.185$)。EpCAM 陽性例では EpCAM 陰性例と比べて、再発および生存率に関する有意な差($p=0.132$ および $p=0.768$)は得られなかった。またウイルス学的背景因子との関連を調べたところ、CK19 陽性例では CK19 陰性例に比べて、HBsAg 陽性との有意な関連を認めた($p<0.05$)。HCVAb 陽性率に関する CK19 発現との相関は見られなかった。EpCAM では、HBsAg、HCVAb との相関はいずれも認めなかった。

D. 考察

CK19 に関しては肝細胞癌で免疫染色が陽性となる症例があることが知られ、分化度が低く、stage が進行した癌で多く、術後の再発率やリンパ節転移率が高いとされる。また EpCAM、CD133 も同様の報告が見られ、EpCAM 過剰発現は stage の進行や生存期間に係わり、CD133 陽性例は予後が悪いとされる。

今回の検討では、Biliary / stem cell marker

陽性の肝細胞癌では悪性度（分化度、門脈浸潤）、線維性間質と相関することが示されたが、予後に関しては違いが認められた。またウイルス学的背景因子にも違いが見られた。今後、発癌様式との関連などについてさらに解析を進めていく予定である。またそれぞれの marker 同士の関連についても詳細に解析し、各 marker が陽性となることの意義を一層明らかにしていきたいと考えている。また蛍光染色および肝細胞癌細胞株を用いた分子病理学的検討も含めて、上記のような生物学的特性を示す機序についても検討していく予定である。

E. 結論

Biliary / stem cell marker 陽性の肝細胞癌は、有意に悪性度が高く、線維性間質を有することが示された。また各 marker 間での関連は認めるものの、予後、ウイルス学的背景因子などに差異も認められ、それぞれの意義および陽性例の特徴についてさらに検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: A cohort study based on a Japanese nationwide survey. Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, Ichida T, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima O, Matsui O, Matsuyama Y. J Hepatol. 2013 in press.
- 2) Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells. Fukuma M, Tanese K, Effendi K, Yamazaki K, Masugi Y, Suda M, Sakamoto M. Exp Cell Res. 319: 113-21, 2013.
- 3) Involvement of hepatocellular carcinoma biomarker, cyclase-associated protein 2 in zebrafish body development and cancer progression. Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Masugi Y, Makino S, Sakamoto M. Exp Cell Res. 319: 35-44, 2013.

- 2. 学会発表
なし

G. 知的所得権の出願・登録状況

- 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）
分担研究報告書（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、網羅的な
遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者： 武富 紹信 北海道大学大学院医学研究科 教授

分担研究課題：背景肝疾患から見た肝発癌の病態解析

研究要旨： **背景：** ウイルス性肝炎は肝細胞癌の発生母地となるが、ウイルスの持続感染を伴わない症例も存在する。肝炎感染既往が肝発癌にどのように関与するかは明らかではない。 **方法：** 2001 年から 2010 年までに当科で行った初回肝切除症例 462 例を 4 群に分類し、臨床病理学的な特徴と治療成績を検討した。HBs 抗原陽性の 195 例(B 群)、HCV 抗体陽性の 138 例(C 群)、HBs 抗原と HCV 抗体両方が陽性の 13 例(BC 群)、両方とも陰性の 116 例(NBNC 群)。 **解析：** B, BC, NBNC 群における、臨床病理学的因子、予後を腫瘍因子、宿主因子から比較検討した。また、HBV 既感染の有無がこれらの因子とどのように関わるかを比較検討した。 **結果：** 腫瘍最大径は B 群で 5.7 ± 4.4 cm、NBNC 群で 7.0 ± 4.5 cm であった($p < 0.05$)。肝硬変の合併例は B 群で 45%、NBNC 群で 22% であった($p < 0.05$)。血中 AFP、AFP-L3 分画、PIVKA-II、腫瘍個数、分化度、組織学的門脈浸潤、静脈浸潤、肝内転移は B 群、NBNC 群間で有意差を認めず、予後は同等であった。BC 群は無再発生存率・累積生存率とも有意に不良であった。HBV 既感染の有無によって上記項目および血中 AFP、AFP-L3、肝硬変合併率、腫瘍最大径、腫瘍個数、腫瘍肉眼型、組織学的分化度、門脈侵襲、静脈侵襲、無再発生存、累積生存に有意差を認めなかった。 **結論：** NBNC 群の患者、腫瘍、組織学的因子は B 群と近似していた。HBV 既感染は糖尿、アルコール多飲と共に NBNC 群に最も多い併存病態だが、再発、生存とは関係しなかった。

A. 研究目的

本邦における肝細胞癌(HCC)の原因は C 型肝炎ウイルス(HCV)が 70–80%、B 型肝炎ウイルス(HBV)が 10–20%とそのほとんどが肝炎ウイルス感染を背景として発症しているが、近年ウイルス肝炎を母地としない HCC が増加している。

B 型肝炎および B 型肝炎ウイルス感染既往が肝発癌にどのように影響するかを明らかにする。

B. 研究方法

当科で行った肝細胞癌の初回切除例の臨床病理学的な特徴と治療成績を検討した。

対象： 2001 年から 2010 年までに当科で行った初回肝切除症例 462 例を 4 群に分類した：

HBs 抗原陽性の 195 例(B 群)、HCV 抗体陽性の 138 例(C 群)、HBs 抗原と HCV 抗体両方が陽性の 13 例(BC 群)、両方とも陰性の 116 例(NBNC 群)。

解析： B, BC, NBNC 群における、臨床病理学的因子、予後を腫瘍因子、宿主因子から比較検討した。また、HBV 既感染の有無がこれらの因子とどのように関わるかを比較検討した。ただし、HBV 既感染とは、HBs 抗原陰性、HBs 抗体陽性あるいは HBc 抗体陽性の症例と定義した。

(倫理面への配慮)

臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号）に従い、事前に書面にてインフォームド・コンセントを