

た。

(2) MICA の 3'UTR を組み込んだルシフェラーゼレポーターコンストラクトを作製し microRNA による MICA 遺伝子発現調節能を検定した。この効果が、microRNA の機能に依存することを示すために、コンピューター解析で得られる microRNA の予想標的部位の seed 配列に相当する配列の中の二か所に変異を導入した変異レポーターコンストラクトを作製し上記の効果の変化を確認した。

(3) microRNA の機能を落とす anti-sense 配列発現ベクターを用いて MICA の発現変化を検定した。

(4) microRNA による MICA 発現調節後に、実際にそのレセプターである NKG2D との結合を FACS で検定した。

C. 結果

(1) 肝癌細胞株 4 種 (HLE, Huh7, Hep3B, PLC/PRF/5) と Hela 細胞で MICA の発現量を見たところ、MICA 発現細胞 (Hela, Hep3B, PLC/PRF/5) と非発現細胞 (HLE, Huh7) の二群に群分けされた。特に B 型肝炎ウイルス DNA の組み込みがあることが知られている Hep3B と PLC/PRL/5 細胞では MICA 遺伝子が高発現していたが、B 型肝炎ウイルスの関与が知られていない Huh7 と HLE では MICA 遺伝子の発現は低かった。

(2) MICA の 3'UTR 内に microRNA-93 および -106b が標的としうる配列 (Seed sequence が 100% マッチする配列 2 箇所) を同定し、実際にそれらの microRNA の過剰発現コンストラクトを用いたレポーターアッセイによって その部分が microRNA の標的になることを確認した。ここで、microRNA-93 と microRNA-106b はゲノム上で tandem に遺伝子座が並んでいて発現を含む挙動を共にする可能性が高いことから、敢えてこれらの microRNA が同時に発現するような過剰発現系を作製し今回の検討に充てた。

(3) 逆にそれらの microRNA の anti-sense 配列を発現するコンストラクトを用いて microRNA の機能を阻害すると、Hela 細胞や Hep3B 細胞ではそれに応じて MICA の発現量が増えることが確認された。ただし、もともと MICA を全く発現していない Huh7 細胞では、microRNA の機能阻害による MICA の遺伝子発現量調節が効かなかった。したがって、このような例では転写後調節ではなく転写自体による発現調節の存在も示唆された。

(4) microRNA の制御に伴う MICA の発現量変化と相関して、MICA 発現細胞の排除に関与する NKG2D (MICA のレセプター) との結合量に変化

が生じることから、microRNA によって制御した MICA 発現量の変化は、実際に免疫応答性を規定している可能性が確認された。

D. 考察

我々は以前行った GWAS 解析 によって、B 型肝炎・C 型肝炎ウイルス感染からの肝臓癌感受性を規定する SNP として MICA のプロモーター領域の SNP を同定した。C 型肝炎ウイルス感染からの肝発癌においては MICA 遺伝子発現を抑える方向に働く SNP が肝発癌に関与 (rs2596542 の A allele : $P = 4.21 \times 10^{-13}$, オッズ比 1.39) していたが、不思議なことに、B 型肝炎ウイルス感染からの肝発癌においては逆に MICA 遺伝子の発現を増やす SNP が肝発癌と相関 (rs2596542 の G allele : $P = 0.029$, オッズ比 1.19) していた。B 型肝炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルス感染からの発癌における MICA の SNP のリスクアレルについての真逆の結果の生物学的意義や分子機構は現時点ではまだ不明であるが、いずれにしても MICA 遺伝子の発現量と制御がウイルス感染からの肝発癌に密接に関与していることはこれらの結果から強く示唆されていた。

今回の我々の検討によって、MICA の発現調節にはプロモーター活性だけではなく転写後調節、とくに microRNA による mRNA の安定性調節もしくは蛋白翻訳効率の調節が重要であることが示唆された。特に MICA 遺伝子の 3'UTR には、ゲノム近傍から発現する二種類の microRNA (microRNA-93, -106b) の seed 配列に完全に相補的な配列が二か所存在しており、これらの microRNA によって発現が制御されている可能性が高いことが in silico 解析によって想定されていたが、本研究によって実際に microRNA による発現量の調節が可能であることが証明された。

ただし、もともと全く MICA が発現していない細胞においては、本研究では microRNA の機能を変化させるだけでは発現量の調節ができなかった。このようなケースでは、MICA の発現については転写後調節よりもプロモーター活性あるいはエピジェノミックな変化が重要なかもしれない。このようなケースも想定すると転写後調節の制御だけではなく転写活性の解析も並行して行なう必要があると考えられた。逆に、本研究の内容を鑑みると、多少でも転写が進めば、以降の発現量調整は転写後調節の制御によって一定の変化を得られることは想定できることから、ケースによっては転写活性と転写後調節の両者を同時に制御することが重要なものもあると考えられる。

MICA の発現量に応じてそのレセプターである

NKG2D の結合量が増加することも証明されたため、実際に MICA の発現量を制御することがその後の免疫応答性をも制御することになるということが示され、感染細胞の排除・癌化細胞の排除にむけた細胞性免疫を駆動するのに有効な分子標的となりうるということが示唆された。

E. 結論

MICA 蛋白の発現量は microRNA およびその anti-sense の発現によって、一定の調節が可能であった。ただし MICA 蛋白がもともと全く発現していない細胞では microRNA 機能の制御だけでは MICA 蛋白の発現量を調節することは難しく、他の方策も必要と思われた。いっぽう、MICA 蛋白の発現量制御と免疫応答性の相関も示されたことから、現在の核酸医薬開発の進展とあいまって、MICA 蛋白量の調節は細胞性免疫調節を利用した肝発癌の予防・治療に応用しうる有望な方策と考えられた。このように、本研究で得られた成果は、MICA 遺伝子を標的とした核酸医薬を用いた B 型肝炎感染からの発癌予防・治療の開発に向けた重要な一歩と考えられる。

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. 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. **Hepato Res** 2013 Jan 3. 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 Hepato Res** 2013 Jan 12. 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. **Hepato Res** 2012 Nov 27. 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. **Hepato Res** 2012 Nov 2. 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. **Scientific World Journal** 2012;496453. 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. 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. 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. 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. 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. 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 coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. **J Infect Chemother** 2012;18(6):883-890. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. PMID: 22493553.
 - 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. 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. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

分担研究者：松田浩一

分担研究課題：B型肝炎ウイルス感染の宿主因子の解析

研究要旨：B型肝炎における自然免疫の機能解明を目的に、MICA多型及び分泌型MICAのHBV陽性肝臓の発症リスクや予後に与える影響について検討した。その結果、MICA多型がHBV陽性肝臓の発症リスクと相関する事、またMICAの遺伝子多型と分泌型MICA値が有意な相関を示すことを明らかとした。さらに分泌型MICA陽性肝臓症例では、予後が不良であった。以上の結果よりMICAが予後マーカーであるだけでなく、治療標的としても有望であることが示された。

A. 研究目的

MICA多型及び分泌型MICAのHBV陽性肝臓の発症リスクや予後に及ぼす影響を検討することによって、B型肝炎における自然免疫の機能解明を目指す。

B. 研究方法

まずMICA多型のHBV陽性肝臓の発症リスクとの関連について検討した。解析に用いた症例は、HBV陽性肝臓症例407例、慢性B型肝炎症例699例、健常人コントロール5679症例である。SNP rs2596542のタイピングは、イルミナGeneCHIP、インバーダー法、タックマン法にて行った。統計解析には、Cochran-Armitage trend testを用いた。

また111名のHBV陽性肝臓患者血清を用いて血清中のELISA法にて測定した。さらにsMICAとMICA遺伝子多型及び肝臓患者の予後(overall survival)との関連を検討した。解析にはKruskal-Wallis test, log-rank testを用いた。

(倫理面への配慮)

本解析に用いた症例は全て、インフォームドコンセントを取得済みで、また各医療機関、研究機関の倫理委員会の承認済みである。

C. 研究結果

上記の解析によって、rs2596542がHBV陽性肝臓の発症リスクと関連を示すことが明らかとなった(p=0.029)。さらにrs2596542とsMICA値も関連を示した。またsMICAが高値の肝臓症例では予後が不良であった。

D. 考察

rs2596542のAアレルを持つ患者ではsMICAが低くなる傾向が見られたが、この傾向はHCV陽性肝臓と同様の結果であった。これらの結果より遺伝子多型がMICAの発現制御に重要であることが示された。一方遺伝子多型と発症リスクの関連においては、HCV陽性肝臓とHBV陽性肝臓とではリスクアレルが逆転していた。この原因としては、MICAの切断の有無が関与すると推測された。膜型MICAはNK細胞を活性化することによってウイルス感染細胞の排除を促進する。このことから、膜型MICAは癌抑制遺伝子として機能すると予測される。一方分泌型MICAは、decoy receptorと機能することで、NK細胞の活性を抑制することが報告されており、結果として癌化を促進すると考えられる。HBV陽性肝臓では様々なMMPが活性化しており、その結果分泌型MICAの効果が優位となるため、リスクアレルが逆転する結果になったと考えられる。

E. 結論

本解析の結果、MICA多型及び分泌型MICAが慢性B型肝炎及びHBV陽性肝臓患者の予後因子として有用であることが明らかとなった。上記の結果より、MICAに対する抗体がHBV陽性肝臓の治療標的となりうることを示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma.

Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R,

Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. PLoS One. 2012;7(9):e44743. Epub 2012 Sep 14.
2. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region.

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. J Hepatol. 2013 Jan 12. doi:pii: S0168-8278(13)00011-1. 10.1016/j.jhep.2012.12.024.

2. 学会発表

1. Impact of genetic variations on chronic hepatitis B and HCV-induced hepatocellular carcinoma. ISVHLD 2012 25th June 2012 (Invited speaker).
2. 遺伝子から分かる癌になりやすい体質とは 山梨県立中央病院 がん拠点病院勉強会 26th July 2012
3. Impact of genetic variations on chronic hepatitis B and HCV-induced

hepatocellular carcinoma KSLM 16th Oct 2012 (Invited speaker).

4. ゲノムワイド関連解析による疾患感受性遺伝子の探索ー病気になりやすい体質とは？ー第2回 Diabetes and endocrinology Forum 29th Nov 2012 (招待講演)
5. 発癌関連遺伝子解析 10年のあゆみ「オーダーメイド医療実現化プロジェクト 10年間の歩みと未来への一歩」 28th Jan 2013 (Invited)
6. GWAS revealed the roles of gene-environmental interaction in carcinogenesis JCA-AACR joint symposium 25th Feb 2013 (Invited)
7. MICA variation and soluble MICA are possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma 102th AACR meeting 2nd Apr 2012

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

分担研究者：地主 将久

分担研究課題：自然免疫応答制御に着目したB型肝炎感染を契機とした発癌機構の解明

研究要旨：

がん進展における腫瘍マクロファージ(Mac)の重要性を背景として、組織、腫瘍MacのNKG2D発現を検証した。NKG2DはF4/80(+)CD11b(+)腫瘍内Macでも特にCD206^{high}MHC-II(-)のM2サブタイプに局限して認められた。さらに肝臓内Macで他組織Macと比較して高いNKG2D発現を認めた。興味深いことにNKG2D陽性Macは、NK細胞と異なりリガンド陽性腫瘍細胞への細胞障害活性を認めず、他の免疫能修飾能が疑われた。現在HBX-TGマウスとNKG2D-KOマウスを対象にHBV発癌に対するMac、NK細胞を介したNKG2D免疫システムの役割を検証する実験系を構築中である。またTIM-3を介した自然免疫制御システムがHBV感染、発癌病態に与える影響をHBV感染系、TIM-3-KOマウスを対象に準備中である。

A. 研究目的

腫瘍マクロファージによる発癌活性が知られているが、HBV発癌への寄与は不明である。腫瘍マクロファージにおけるNKG2D免疫システムの寄与は不明である。以上よりマクロファージとHBVのクロストークが発癌プロセスに与える影響を検証することで、新たな発癌発症マーカーや分子標的剤開発につなげることを目的とする。

B. 研究方法

- ・腫瘍および健常組織マクロファージサブセットでのNKG2D発現、NKG2Dを介した免疫機能を検討した。
- ・B型肝炎発癌モデル(HBX-トランスジェニック(TG)マウス、NKG2Dノックアウト(KO)マウスを対象に、マクロファージにおけるNKG2D免疫応答を検証した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際し、動物実験等の実施に関する基本指針や動物愛護法を遵守し、当該研究を行った。以上より、実験方法について倫理面の問題がないと判断した。

C. 研究結果

- ・組織、腫瘍マクロファージのNKG2D発現を検証したところ、NKG2DはF4/80(+)CD11b(+)腫瘍内Macでも特にCD206^{high}MHC-II(-)のM2サブタイプに局限して認められた。
- ・肝臓内Macでは、脾臓、リンパ節など他組織Macと比較して高いNKG2D発現を認めた。
- ・NKG2D陽性Macは、NK細胞と異なりリガンド陽性腫瘍細胞への細胞障害活性を認めず、他の免疫能修飾能が疑われた。
- ・HBX-TGマウスとNKG2D-KOマウスを対象にHBV発癌に対するMac、NK細胞を介したNKG2D免疫システムの役割を検証する実験系を立ち上げた。
- ・TIM-3を介した自然免疫制御システムがHBV感染、発癌病態に与える影響をHBV感染系、TIM-3-KOマウスを対象に準備中である。

D. 考察

肝、腫瘍マクロファージにおいて、M2サブセットマクロファージに局限してNKG2Dは発現していた。またNKG2D陽性マクロファージはNK

細胞と異なり、抗腫瘍細胞障害活性を認めず、他の免疫修飾機能が疑われた。M2 マクロファージは免疫寛容や腫瘍活性に寄与する細胞群であることから、NKG2D 陽性マクロファージはNK細胞などとは逆に、免疫抑制や腫瘍活性を正に制御している可能性があり、今後の検討において解明されなければならない課題である。

E. 結論

NKG2D 陽性マクロファージの存在を明らかにしたとともに、その機能が従来の抗腫瘍免疫活性能とは異なる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **Jinushi M***. Regulatory mechanisms of nucleic acid-mediated innate immune responses in tumor microenvironments. *OncoImmunology*. 2012 Dec 1; 1(9):1632-1634.
2. Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, **Jinushi M** & Yoshiyama H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma. *Viruses*. 2012 Dec; 4(12):3420-39.
3. **Jinushi M***, Chiba S, Baghdadi M, Yoshiyama H. Regulation of cancer stem cell activities by tumor-associated macrophages. *American Journal of Cancer Research*. 2012;2(5):529-39.
4. China S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Gorman JV, Colgan JD, Hirashima M, Uede T, Takaoka A, Yagita H &

Jinushi M*. Tumor-infiltrating dendritic cells suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interaction between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nature Immunology*. 2012 Sep; 13(9):832-42.

5. Baghdadi M, Nagao H, Yoshiyama H, Akiba H, Yagita H, Dosaka-Akita H & **Jinushi M**. Combined blockade of TIM-43 and TIM-4 augments cancer vaccine efficacy against established melanomas. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. in press (DOI10.1007/s00262-012-1371-9)

*corresponding author

2. 学会発表

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願名称: Methods for treating MICA-related disorders (MICA 関連疾患治療法)

出願番号: WO/2008/036981

国際出願番号:PCT/US2007/079342

発明者: Glenn Dranoff, **Masahisa Jinushi**, F. Stephen Hodi

2. 実用新案登録

3. その他

B型肝炎における自然免疫の機能解明とその制御による発癌抑止法開発

分担研究者：室山良介

分担研究課題：B型肝炎ウイルスによる肝発癌に関与する MICA の発現調節機構の解明

研究要旨：我々のグループは、MICA遺伝子のプロモーター上のSNPがB型肝炎ウイルス（HBV）による肝発癌に関与し、B型肝炎患者の血中MICA濃度が高いことを以前に報告した。その成果に基づき、MICAの発現調節機構を解明し、その発現調節によるB型肝炎抑止法を開発することが本研究の課題である。本研究により、患者の予後改善やコストの削減、日本初の肝癌治療薬の開発に結びつけたいと考えている。

A. 研究目的

MICA の発現調節機構を解明するためには、種々の培養細胞株を用いた検討が必須となる。そこで MICA の mRNA レベル・細胞内蛋白レベル・血中レベルの検出・定量系を確立し、種々の肝癌細胞株における MICA 動態の把握を試みた。

B. 研究方法

1) データベース上では MICA の mRNA に非常に類似した non-coding RNA (ncRNA) が転写されている可能性が示唆されたので、実際に発現しているか否かにつき、培養細胞株の cDNA を用いて確認した。また、MICA の mRNA と ncRNA とを個別に定量できる Realtime PCR の系を確立し、種々の肝癌細胞株における発現レベルを検討した。2) MICA の発現ベクターを構築し、市販されている MICA の抗体を用いて Western blot を行い、細胞内 MICA 蛋白レベルを検出可能な抗体を探索した。3) ELISA を用いて種々の肝癌細胞株における上清中の MICA 濃度を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、現在のところ培養細胞株を用いており、倫理面への配慮は特に必要ない。しかし、将来的にはヒト由来試料を用いる可能性があり、その際は厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。

C. 研究結果

1) 培養細胞株の cDNA を用いた検討の結果、MICA に類似した ncRNA が実際に転写されていることが確認された。また Realtime PCR により、培養細胞株ごとの MICA、ncRNA の発現量が定量さ

れ、MICA の発現量よりも ncRNA の発現量の方が高い細胞株も存在していた。2) MICA の細胞内蛋白レベルを検出すべく、市販されている MICA の抗体を数種類用いて Western blot を行ったが、MICA 蛋白を明瞭に検出できる抗体は見出せなかった。3) ELISA にて培養細胞株ごとの上清 MICA 濃度を定量したところ、多くの細胞株では MICA の mRNA 発現量と正の相関を示したが、中には乖離している細胞株も存在していた。

D. 考察

MICA の発現調節機構を解明する上で、その動態を把握する検出・定量系を確立することは必須となるが、本研究にて MICA の mRNA レベル、血中レベルの検出・定量系を確立され、種々の肝癌細胞株における MICA の動態が判明した。しかしながら現段階において、細胞内蛋白レベルを検出する系がまだ確立できていない。この問題を解決すべく、現在、新しい MICA の抗体を作成中である。また、本研究において MICA の mRNA に非常に類似した ncRNA が実際に転写されていることが明らかとなり、個別に定量することも可能となった。ncRNA の機能については現在までに報告はないが、MICA の発現調節において何らかの役割を果たしている可能性があり、今後、その詳細につき解析を進める予定である。

E. 結論

MICA の動態を把握する検出・定量系を確立し、種々の肝癌細胞株における MICA 動態が把握された。このことは本研究課題の達成に向け、十分、寄与するものと考えられる

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kumar V, Lo PHY, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. **PLoS One** 2012; 7: e44743

2. 学会発表

- 1) Muroyama R, Goto K, Kowatari N, Li WW, Nakagawa R, Kato N. Fusion HBx translated from hepatitis B virus integrant is a responsible molecule for hepatocarcinogenesis and could be a universal treatment target. The 2012 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. September 22-25, 2012. Oxford, UK.
- 2) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. A genome wide association study for HCV-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 6, 2012. Venice, Italy.
- 3) Goto K, Muroyama R, Kowatari N, Nakagawa R, Li W, Kato N. Exploration for inducers of MICA, a GWAS-identified genetic susceptibility factor for HCV-induced HCC. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy. October 6, 2012
- 4) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. A genome wide association study of HCV induced liver cirrhosis identified novel susceptibility loci

at MHC region. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 9, 2012. Boston, USA.

- 5) Goto K, Muroyama R, Kowatari N, Nakagawa R, Li W, Kato N. HDAC inhibitors are potent suppressors of HCV-induced hepatocarcinogenesis by upregulating MICA, a GWAS-identified HCC susceptibility gene. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, USA. November 13, 2012
- 6) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Yoshida H, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. Genome wide association studies for HCV-induced liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science". November 22, 2012. Tokyo, Japan.
- 7) 後藤覚、室山良介、李雯雯、中川良、古渡礼恵、加藤直也: C型肝癌感受性遺伝子 MICA を誘導する薬剤の探索。第 48 回日本肝臓学会総会、OWS-295、金沢、2012 年 6 月
- 8) 後藤覚、室山良介、李雯雯、中川良、古渡礼恵、加藤直也: C型肝癌感受性を決定する遺伝子 MICA を誘導する薬剤による肝発癌抑制法の開発。第 16 回肝臓学会大会 (第 20 回日本消化器関連学会週間)、肝 P-161、神戸、2012 年 10 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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Li Q, Yu C-H, Yu J-H, Liu L, Xie S-S, Li W-W, Yang X, Fan W-B, Gai Z-T, Chen S-J, <u>Kato N.</u>	ABO blood group and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B.	PLoS One	7	e29928	2012
Li Q, Li W-W, Yang X, Fan W-B, Yu J-H, Xie S-S, Liu L, Ma L-X, Chen S-J, <u>Kato N.</u>	Type 2 diabetes and hepatocellular carcinoma: a case-control study in patients with chronic hepatitis B.	Int J Cancer	131	1197-1202	2012
Shiina S, Tateishi R, Imamura M, Teratani T, Koike Y, Sato S, Obi S, Kanai F, <u>Kato N, Yoshida H, Omata M, Koike K.</u>	Percutaneous ethanol injection for hepatocellular carcinoma: 20-year outcome and prognostic factors.	Liver Int	32(9)	1434-1442	2012
Kumar V, Lo PHY, Sawai H, <u>Kato N,</u> Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, <u>Muroyama R,</u> Tateishi R, Omata M, <u>Koike K,</u> Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, <u>Matsuda K.</u>	Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma.	PLoS One	7	e44743	2012

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 (Epub ahead of print)
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	32 (9)	3775-83		2012
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	206 (3)	415-20		2012
Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y.	Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update.	Hepatol Res	42 (6)	523-42		2012
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				[Epub ahead of print] PubMed PMID: 23376718

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, <u>Koike K</u> , 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			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 23356977
Gotoh H, Enooku K, Soroida Y, Sato M, Hikita H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Yamazaki T, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H	Perihepatic lymph node enlargement observed at a general health examination: A cross-sectional study	Hepatol Res			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 23279215
Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, <u>Koike K</u> , Hayashi N, Kumada H	Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B	Hepatol Res			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 23131000
Ohki T, Isogawa A, Iwamoto M, Ohsugi M, Yoshida H, Toda N, Tagawa K, Omata M, <u>Koike K</u>	The effectiveness of liraglutide in nonalcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus compared to sitagliptin and pioglitazone	ScientificWorldJournal			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 22927782
Kurano M, Hara M, Tsuneyama K, Okamoto K, Iso-O N, Matsushima T, <u>Koike K</u> , Tsukamoto K	Modulation of lipid metabolism with the over-expression of NPC1L1 in mice liver	J Lipid Res			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 22891292

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-κB activity via directly targeting Dnmt1 expression	Hepatology	57	162-170	2013
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			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790352
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			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790350
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	6(3)	784-789	2012
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	18(6)	883-890	2012

Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, <u>Koike K</u> , Yatomi Y	Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma	Hepatology	57	417-418	2013
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, <u>Koike K</u>	Systemic combination therapy of intravenous 5-fluorouracil and subcutaneous pegylated interferon alfa-2a for advanced hepatocellular carcinoma	J Gastroenterol	47(10)	1152-1159	2012
Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, <u>Koike K</u>	Mortality and morbidity of hepatectomy, radiofrequency ablation, and embolization for hepatocellular carcinoma: a national survey of 54,145 patients	J Gastroenterol	47(10)	1125-1133	2012
Yoshikawa T, Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, <u>Koike K</u>	Silencing of microRNA-122 enhances interferon- α signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation	Sci Rep	2	637	2012
Nakagawa H, Isogawa A, Tateishi R, Tani M, Yoshida H, Yamakado M, <u>Koike K</u>	Serum gamma-glutamyltransferase level is associated with serum superoxide dismutase activity and metabolic syndrome in a Japanese population	J Gastroenterol	47(2)	187-194	2012

Soroida Y, Ohkawa R, Nakagawa H, Sato 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, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H	Increased activity of serum mitochondrial isoenzyme of creatine kinase in hepatocellular carcinoma patients predominantly with recurrence	J Hepatol	27(2)	330-336	2012
Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Kudo Y, Goto T, Yoshida H, <u>Koike K</u>	A miRNA machinery component DDX20 controls NF-κB via microRNA-140 function	Biochem Biophys Res Commun	420(3)	564-569	2012
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, <u>Koike K</u>	Assessment of disease progression in patients with transfusion-associated chronic hepatitis C using transient elastography	World J Gastroenterol	18(12)	1385-1390	2012
Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, <u>Koike K</u>	Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation	Cancer Sci	103(4)	670-676	2012
Goto E, Masuzaki R, Tateishi R, Kondo Y, Imamura J, Goto T, Ikeda H, Akahane M, Shiina S, Omata M, Yoshida H, <u>Koike K</u>	Value of post-vascular phase (Kupffer imaging) by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid in the detection of hepatocellular carcinoma	J Gastroenterol	47(4)	47(4)	2012

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, <u>Koike K</u>	Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors	Am J Gastroenterol	107(4)	569-577	2012
Enooku K, Tateishi R, Kanai F, Kondo Y, Masuzaki R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Omata M, <u>Koike K</u>	Evaluation of molecular targeted cancer drug by changes in tumor marker doubling times	J Gastroenterol	47(1)	71-78	2012
Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Gorman JV, Colgan JD, Hirashima M, Uede T, Takaoka A, Yagita H & <u>Jinushi M.</u>	Tumor-infiltrating dendritic cells suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interaction between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1.	Nature Immunology	13(9)	832-842	2012
<u>Jinushi M</u> , Chiba S, Baghdadi M, Yoshiyama H.	Regulation of cancer stem cell activities by tumor-associated macrophages.	American Journal of Cancer Research	2(5)	529-539	2012
Iizasa H, Nanbo A, Nishikawa J, <u>Jinushi M</u> , Yoshiyama H.	Epstein-Barr Virus (EBV)-associated Gastric Carcinoma.	Viruses	4(12)	3420-3439	2012
<u>Jinushi M</u>	Regulatory mechanisms of nucleic acid-mediated innate immune responses in tumor microenvironments.	OncoImmunology	1(9)	1632-1634	2012

Baghdadi M, Nagao H, Yoshiyama H, Akiba H, Yagita H, Dosaka- Akita H, <u>Jinushi M</u>	Combined blockade of TIM-43 and TIM-4 augments cancer vaccine efficacy against established melanomas.	Cancer Immunology and Immunother apy			In press (DOI10.1000 7/s00262- 012-1371-9)
--	--	--	--	--	---

IV. 研究成果の刊行物・別刷

ABO Blood Group and the Risk of Hepatocellular Carcinoma: A Case-Control Study in Patients with Chronic Hepatitis B

Qiang Li¹*, Cui-Hua Yu²*, Jin-Hong Yu¹, Li Liu¹, Shuang-Shuang Xie¹, Wen-Wen Li³, Xia Yang⁴, Wen-Bo Fan⁵, Zhong-Tao Gai^{6*}, Shi-Jun Chen^{1*}, Naoya Kato³

1 Division of Liver Disease, Jinan Infectious Disease Hospital, Shandong University, Jinan, China, **2** Department of Pharmacy, Jinan Infectious Disease Hospital, Shandong University, Jinan, China, **3** Unit of Disease Control Genome Medicine, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan, **4** Unit of Hyperbaric Medicine, Shandong Province Hospital, Jinan, China, **5** Unit of Digestive Disease, Department of Internal Medicine, Qihe People's Hospital, Shandong, China, **6** Department of Infectious Disease, Jinan Infectious Disease Hospital, Shandong University, Jinan, China

Abstract

Background: Studies have observed an association between the ABO blood group and risk of certain malignancies. However, no studies of the association with hepatocellular carcinoma (HCC) risk are available. We conducted this hospital-based case-control study to examine the association with HCC in patients with chronic hepatitis B (CHB).

Methods: From January 2004 to December 2008, a total of 6275 consecutive eligible patients with chronic hepatitis B virus (HBV) infection were recruited. 1105 of them were patients with HBV-related HCC and 5,170 patients were CHB without HCC. Multivariate logistic regression models were used to investigate the association between the ABO blood group and HCC risk.

Results: Compared with subjects with blood type O, the adjusted odds ratio (AOR) for the association of those with blood type A and HCC risk was 1.39 [95% confidence interval (CI), 1.05–1.83] after adjusting for age, sex, type 2 diabetes, cirrhosis, hepatitis B e antigen, and HBV DNA. The associations were only statistically significant [AOR (95%CI) = 1.56(1.14–2.13)] for men, for being hepatitis B e antigen positive [AOR (95%CI) = 4.92(2.83–8.57)], for those with cirrhosis [AOR (95%CI), 1.57(1.12–2.20)], and for those with HBV DNA $\leq 10^5$ copies/mL [AOR (95%CI), 1.58(1.04–2.42)]. Stratified analysis by sex indicated that compared with those with blood type O, those with blood type B also had a significantly high risk of HCC among men, whereas, those with blood type AB or B had a low risk of HCC among women.

Conclusions: The ABO blood type was associated with the risk of HCC in Chinese patients with CHB. The association was gender-related.

Citation: Li Q, Yu C-H, Yu J-H, Liu L, Xie S-S, et al. (2012) ABO Blood Group and the Risk of Hepatocellular Carcinoma: A Case-Control Study in Patients with Chronic Hepatitis B. PLoS ONE 7(1): e29928. doi:10.1371/journal.pone.0029928

Editor: Yujin Hoshida, Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, United States of America

Received: July 12, 2011; **Accepted:** December 6, 2011; **Published:** January 3, 2012

Copyright: © 2012 Li et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study is supported by research fund of the authors' hospital (Jinan Infectious Disease Hospital, Shandong University). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: hepatology65@yahoo.com.cn (S-JC); mailto:gaizhongtao@sina.com (Z-TG)

☉ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the few cancers with well-defined major risk factors, including chronic hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infection, and cirrhosis due to many causes [1]. However not all patients with these diseases will develop HCC. Therefore within these disease groups, there are other factors that indicate greater or lesser risk [2]. In China, a hyper-endemic area of HBV infection, nearly 80% of HCC cases have been linked to chronic HBV infection, and approximately 60%–90% of these develop in patients with cirrhosis [3,4]. Older age, male sex, cirrhosis and sustained activity of liver disease are important predictors for HCC [5]. In patients with chronic HBV infection, HBV DNA level, viral genotype, and hepatitis B e

antigen (HBeAg) status have been identified as risk factors for HCC [6,7,8]. Other potential risk factors, such as diabetes mellitus, alcohol abuse, obesity, and family history of liver cancer may also play a role in the development of HCC [2,9]. As for human genetic factors, polymorphisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and epidermal growth factor (EGF) gene have been reported to be associated with HCC risk [10,11,12].

The ABO blood group has been previously found to be associated with the risk of several malignancies, including gastric cancer, pancreatic cancer, epithelial ovarian and skin cancer [13]. However, there is little data about the association with HCC risk. Two recent genome-wide association studies (GWAS) suggest that the ABO blood group antigen may affect the systemic inflammatory state. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at the ABO