

D. 考察

今回HBV患者の血清115サンプルについて検討した。HCC riskを上昇することが知られている C1653T, T1753V, A1762T, G1764A と HCC risk を低下させる G1896A 変異について検討した。HCC 発症を含めて詳細な臨床情報とあわせて検討することが必要と考えられた。また、同じサンプルについて pol 領域の薬剤耐性変異についても検討を進めていく必要がある。また、他分担者の結果ともあわせて解析していく。

GWAS 解析などの宿主因子と、ウイルスゲノム変異というウイルス因子をあわせて解析することにより、HCC 発症に関わるリスクの理解が進むことが期待される。

E. 結論

HCC 発症者を含む HBV キャリアのウイルスゲノム解析をおこなった。臨床情報とあわせて解析を進める必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, **Wakita T**. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP. *Hepatology*. 2013 Dec 21. doi: 10.1002/hep.26982. [Epub ahead of print]
- (2) Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, **Wakita T**. Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Jan 17;443(3):808-13.
- (3) Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, **Wakita T**, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with

humanized livers. *Gastroenterology*. 2014 Feb;146(2):562-72.

- (4) Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, **Wakita T**. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem*. 2013 Nov 1;288(44):31715-27

2. 学会発表

- (1) N Ogura, K Watashi, **T Wakita**. FORMATION OF COVALENTLY CLOSED CIRCULAR (ccc) DNA IN HepAD38.7 CELLS, A TETRACYCLINE INDUCIBLE HBV EXPRESSION CELL LINE. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- (2) HH Aly, K Watashi, K Chayama, **T Wakita**. The discovery of a new virus/host interaction regulating HBV life cycle. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- (3) M Iwamoto, K Watashi, S Tsukuda, HH Aly, R Suzuki, H Aizaki, O Koiwai, H Kusuhara, **T Wakita**. Mechanistic analysis on hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- (4) K Watashi, G Liang, M Iwamoto, H Marusawa, K Kitamura, M Muramatsu, R Suzuki, J Li, S Tong, Y Tanaka, K Murata, H Aizaki, **T Wakita**. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)

- (5) K Watashi, A Sluder, S Matsunaga, A Ryo, S Nakajima, M Iwamoto, S Tsukuda, K Borroto-Esoda, M Sugiyama, Y Tanaka, M Mizokami, **T Wakita**. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- (6) S Tsukuda, K Watashi, M Iwamoto, R Suzuki, H Aizaki, S Kojima, **T Wakita**. A Retinoid Derivative Inhibits Hepatitis B Virus Entry Mediated by NTCP. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai Medical Colledge, Fudan University, Shanghai, China (2013, Oct. 20-23)
- (7) 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、HH Aly、鈴木亮介、相崎英樹、小祝修、楠原洋之、脇田隆字、NTCP安定発現細胞株におけるB型肝炎ウイルス侵入機構の解析、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- (8) HH Aly, K Watashi, K Chayama, **T Wakita**. Study of new virus/host interactions regulating HBV life cycle. 第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- (9) 古賀れい奈、宮川敬、松永智子、渡士幸一、**脇田隆字**、梁明秀、Tetherin/BST-2はHBV複製を負に制御する、第61回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場、(2013, 11.10-12)
- 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25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

研究分担者：八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター長
研究協力者：長岡 進矢 国立病院機構長崎医療センター 肝炎治療研究室長

分担研究課題：当院のゲノム検体提出例の臨床背景の検討

研究要旨：当院のゲノム検体提出例174例の臨床背景の検討をおこなう。検体採取時の血液検査値(ALT値、血小板数、HBeAg/Ab、HBV-DNA量、HBsAg量)、治療内容、背景肝病変、肝細胞癌の有無、HBsAg消失の有無を病態別に検討した。登録症例の平均年齢は55.4歳、男性：106例、女性：68例であった。HBeAg陽性例：29例(16.7%)、平均HBsAg量は3226 IU/mlであった。治療内容は核酸アナログ治療例：72例、インターフェロン治療例：16例、シーケンシャル療法：4例であった。背景肝病変は慢性肝炎：109例、肝硬変：65例、肝細胞癌合併は22例(12.6%)、HBsAg消失例は26例(15%)であった。病態の内訳はHBeAg(+)陽性ASC：4例(2%)、HBeAg(-)陰性ASC:57例(33%)、慢性肝炎：47例(27%)、肝硬変：65例(37%)であった。HBsAg量の比較では、HBeAg(+)ASCは38254 IU/mlで他の群と比較し有意に高値であった($p<0.05$)。肝細胞癌合併は肝硬変で19例(29%、肝細胞癌症例の90%)であり、他の群と比較し有意に高率であった($p<0.01$)。HBsAg消失例はHBeAg(-)ASC、肝硬変でそれぞれ12例(21%)、13例(20%)で、慢性肝炎と比較し有意に高率であった($p<0.01$)。

A. 研究目的

当院のゲノム検体提出例の臨床背景の検討をおこなう。

B. 研究方法

当院より検体提出をおこなった174例の年齢、性別、検体採取時のALT値、血小板数、HBV-DNA量、HBe抗原抗体(HBeAg/Ab)、HBs抗原(HBsAg)量、治療内容：核酸アナログ製剤：LAM(ラミブジン単独)、LAM+ADV(ラミブジン+アデフォビル併用)、ETV(エンテカビル単独)、インターフェロン製剤：n-IFN(天然型インターフェロン)、PEG-IFN(ペグインターフェロン)、シーケンシャル療法、背景肝病変、肝細胞癌の有無、HBsAg消失の有無について検討をおこなう。

また、病態別HBeAg(+)ASC(Asymptomatic

carrier:無症候性キャリア)、HBeAg(-)ASC、慢性肝炎、肝硬変の臨床背景について検討をおこなう。

(倫理面への配慮)

患者に対しては血液検体の保存、研究使用に関する説明をおこない、紙面にて同意を取得した。

C. 研究結果

登録症例174例の平均年齢は55.4歳、男性：106例、女性：68例であった。HBe抗原陽性：29例(16.7%)、HBsAg量：3226 IU/mlであった。核酸アナログ治療例は72例(LAM：6例、LAM+ADV併用：22例、ETV：44例)、インターフェロン治療例は16例(n-IFN：4例、PEG-IFN：12例)、シーケンシャル療法：4例。背景肝病変は慢性肝炎109例、肝硬変65例、肝細胞癌合併は22例(12.6%)、HBsAg消失例は26例(15%)

であった(表 1)。病態別の臨床背景の内訳は、HBeAg(+)陽性 ASC : 4 例(2%)、HBeAg(-)陰性 ASC:57 例(33%)、慢性肝炎:47 例(27%)、肝硬変 : 65 例(37%)であった。

表1. 登録症例の臨床背景(n=174)

年齢(歳)	55.4
性別(男/女)	106/68
ALT値 IU/L	29.7
血小板数 $\times 10^4/\mu\text{L}$	17.4
HBV-DNA量,logcopies/ml	2.3
HBe抗原(+), n (%)	29 (16.7)
HBs抗原量, IU/ml	3226
核酸アナログ製剤(LAM/LAM+ADV/ETV)	6/22/44
インターフェロン製剤(n-IFN/PEG-IFN)	4/12
シーケンシャル療法	4
背景肝病変(慢性肝炎/肝硬変)	109/65
肝細胞癌合併, n (%)	22 (12.6)
HBsAg消失例, n(%)	26 (15.0)

HBsAg 量は HBeAg(+)ASC : 38254 IU/ml、HBeAg(-)ASC : 2284 IU/ml、慢性肝炎 : 4248 IU/ml、肝硬変 : 1188 IU/ml で、HBeAg(+)ASC が他群と比較し、有意に高値であった($p<0.05$)。また肝硬変は慢性肝炎と比較し、HBsAg が有意に低値であった($p<0.01$)。肝細胞癌合併は肝硬変で 19 例(29%、肝細胞癌症例のうち 90%)であり、HBeAg(-)ASC、慢性肝炎と比較し有意に肝発癌率が高率であった ($p<0.001$)。HBsAg 消失例は HBeAg(-)ASC、肝硬変でそれぞれ 12 例(21%)、13 例(20%)で、慢性肝炎と比較し有意に高率であった($p<0.01$)(表 2)。

表2. 病態別の臨床背景(n=174)

	HBeAg(+)ASC	HBeAg(-)ASC	慢性肝炎	肝硬変
症例数	4	57	47	65
年齢(歳)	59.8	58.4	47.5	58.1
性別(男/女)	2/2	32/25	27/20	45/21
ALT値 IU/L	29	23	43	26
血小板数 $\times 10^4/\mu\text{L}$	21.6	18.1	17.6	16.5
HBV-DNA量,LC/ml	8.5	2.4	2.6	1.6
HBe抗原(+), n (%)	4(100)	0(0)	18(38)	7(11)
HBs抗原量, IU/ml	38254	2284	4248	1188
核酸アナログ製剤	0	0	28	44
インターフェロン製剤	0	0	15	1
肝細胞癌合併, n (%)	0(0)	1(2)	2(4)	19(29)
HBsAg消失例, n (%)	0(0)	12(21)	1(2)	13(20)

D. 考察

当院の検体提出症例は B 型慢性肝疾患の各病態である HBeAg+/-ASC、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌が網羅され、PEG-IFN、核酸アナログの治療介入がなされている症例も多く含まれている。長期フォロー例が多く、HBsAg 消失例が 26 例(15%)も比較的多数含まれている。

E. 結論

当院のゲノム検体提出例の病態の内訳は、HBeAg(-)ASC、慢性肝炎が約 30%、肝硬変が約 40%であった。B 型慢性肝疾患の病態毎で HBsAg 量に有意差を認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Bae SK, **Yatsushashi H**, Takahara I, Tamada Y, Hashimoto S, Motoyoshi Y, Ozawa E, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Komori A, Ishibashi H. Sequential occurrence of acute hepatitis B among members of a high school Sumo wrestling club. *Hepato Res.* 2013 Sep 6.
- (2) Ito K, Yotsuyanagi H, **Yatsushashi H**, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology.* 2013 Jul 29.
- (3) 長岡進矢, **八橋 弘**. インターフェロン治療, -III. 治療編, 2. 抗ウイルス薬による治療-. *HEPATOLOGY PRACTICE 1 B 型肝炎の診療を極める* -基本から最前線まで. 田中榮司他, 文光堂, 東京, pp.97-103, 2013.10.11, 216 頁
- (4) **八橋 弘**. I. HBV とその感染症の基礎, 4. HBV 感染の診断法. *de novo B 型肝炎—HBV 再活性化予防のための基礎知識—*, 持田智編集, 医薬ジャーナ

- ル社, 大阪, pp.55-67, 2013.9.20, 175 頁
- (5) 八橋 弘. PegIFN と HBs 抗原量. 別冊・医学のあゆみ B 型肝炎ー最新治療コンセンサス, 溝上雅史編集, 医歯薬出版株式会社, 東京, pp.63-68, 2013.7.15, 133 頁
- (6) 八橋 弘. VI 肝疾患 急性肝炎(B 型). 治療過程で一目でわかる 消化器薬物療法 STEP 1・2・3. 一瀬雅夫, 岡 政法, 持田 智編集, メジカルビュー社, 東京, pp.154-158, 2013.4.1, 303 頁
- (7) 八橋 弘. ウイルス肝炎と肝癌の撲滅を目指した実地診療のすすめかた, B 型肝炎の自然経過と治療の進歩ー実地

医家はどのように対処すればよいのか
ー. Medical Practice 30(2) : 186-193,
2013.2.1.

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 25 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

研究分担者：松本 晶博 信州大学医学部附属病院 肝疾患診療相談センター 准教授
研究協力者：田中 榮司 信州大学医学部内科学第二講座 教授

分担研究課題：B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療耐性に関わる因子

研究要旨：【目的】 B 型慢性肝炎に対する entecavir (ETV) 治療における、耐性株出現に関わるウイルス変異について検討した。【対象と方法】 7 例の ETV 耐性例について、治療前および耐性出現後の 30 point について HBV の全塩基配列を決定し、breakthrough (BT) 群と non-response (NR) 群に分けて比較検討した。【結果】 BT 群では全例 lamivudine (LMV) に対する YMDD 耐性変異が出現し、8/11 point で ETV に対する追加変異を認めた。しかしながら、NR 群では治療開始前および耐性時における既報の ETV 耐性変異は見られず、また、BT の治療前の塩基配列と比較しても有意な変異は見られなかった。【結語】 B 型慢性肝炎に対する ETV 治療の耐性は、Breakthrough 型と non-response 型でその機序が異なっており、Breakthrough 型では HBV のポリメラーゼ領域に遺伝子変異が生じることにより耐性を獲得するが、non-response 型では遺伝子変異がないにもかかわらず耐性を示す。後者には宿主側の要因が関与している可能性が有り、今後検討が必要である。

A. 研究目的

B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療は血中の HBV DNA を減少させ、肝炎を鎮静化させることにより、肝線維化の進展を止め、肝細胞癌の発生率を低下させることができる。しかしながら、耐性株が生じると、HBV の再上昇が見られ、肝炎が再燃し、時に重症化する症例が見られる。今回我々は、entecavir (ETV) に対する耐性株が出現した症例について、HBV 全遺伝子配列を用いて耐性変異を検討した。

B. 研究方法

対象は、ETV に対し耐性の出現した 7 例（男性 5 例、年齢中央値 54 歳）で HBV 遺伝子型は 6 例が genotype C であった。4 例は lamivudine (LMV) からの移行例であり、3 例は初回投与例であった。投与期間の中央値は 1.7 年であった。7 例について ETV 開始前の 9 point と ETV 耐性株が出現した 21 point について HBV の全塩基配列を決定し、比較検

討した。患者群を 4 例の breakthrough (BT) 群と 3 例の non-response (NR) 群 (HBV DNA の 2 logcopies/ml の低下が見られない群) に分けて比較した。BT 群からは、治療前 5 point、耐性株出現後 11 point の解析を行い、NR 群からは治療前 4 point 耐性株出現後 10 point の全塩基配列を決定した。

（倫理面への配慮）

今回の研究は信州大学医学部の倫理委員会により承認されたものであり、患者さん個々より書面での承諾を得ている。

C. 研究結果

BT 群においては治療前に既報の耐性変異を有している症例はなかったが、耐性株出現後は全ての症例で LMV 耐性変異である reverse transcriptase C ドメイン 204 番の YMDD 変異を認めた。しかしながら、3/11 point で ETV 耐性における追加変異の B180 および B169 の変異は認められなかった。そ

れに対し、NR 群では既報の ETV 変異は認められず、また、そのほかに治療前と耐性株出現後において共通に有意に変化した配列は見られなかった。また、NR 群と BT 群の治療前配列を比較しても有意な変異は見られなかった。

D. 考察

これらの結果より、ETV の耐性には一旦 HBV DNA が減少するものの、耐性株が生じ、breakthrough を起こしてくるものと、遺伝子に変異が生じず、治療開始より治療効果が悪い 2 つの状態が有り、耐性の仕方に違いがあるものと思われた。

E. 結論

B 型慢性肝炎に対する ETV 治療における耐性には耐性遺伝子変化によるものと、耐性株が生じず、最初から耐性を示すものがあり、後者は宿主の因子が関与している可能性が高いと思われる。今後宿主因子についての解析が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Morita S, **Matsumoto A**, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura

T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E. Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepato Res.* 2013 Jul 16.

2. 学会発表

- (1) **松本 晶博**, 森田 進, 田中 榮司. 高感度 HBV RNA 定量系による B 型慢性肝炎核酸アナログ治療例の病態解析. 第 49 回日本肝臓学会総会 2013.
- (2) 奥原 禎久, 梅村 武司, 城下 智, 柴田 壮一郎, 木村 岳史, 森田 進, 小松 通治, **松本 晶博**, 吉澤 要, 田中 榮司. Entecavir 治療中における B 型慢性肝炎患者の血清サイトカイン、ケモカインの検討. 第 49 回日本肝臓学会総会 2013.

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 25 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 研究院長
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
器内科にて採取、収集を引き続き行なった。また、HBVワクチンに対するHBVワクチン
反応者および非反応者が存在することが知られており、その宿主規定因子の検討を明ら
かにするためHBVワクチン反応者および非反応者の血液を採取、収集した。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)
等を行なっていたいただきその宿主規定因子を探索検討する。

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。

また、HBV ワクチンに対する HBV ワクチン反応者および非反応者が存在することが知られており、その遺伝子レベルでの解析は、今後の B 型肝炎対策上重要である。

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)等を行なっていた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、収集を行なう。

(倫理面への配慮)

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

本年度までに B 型肝炎患者 42 名の同意承諾を得た後に血液採取、および臨床データ収集を行なった。また HBV ワクチンに対する HBV ワクチン反応者および非反応者合計 125 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今後も血液採取、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

本年度までに B 型肝炎患者 42 名および HBV ワクチンに対する HBV ワクチン反応解析用検体 125 名分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) Kanda T, Jiang X, Nakamoto S, Nakamura M, Miyamura T, Wu S, **Yokosuka O**. Different effects of three interferons L on Toll-like receptor-related gene expression in HepG2 cells. *Cytokine* 64(2): 577-83, 2013.
- (2) Jiang X, Kanda T, Tanaka T, Wu S, Nakamoto S, Imazeki F, **Yokosuka O**. Lipopolysaccharide blocks induction of unfolded protein response in human hepatoma cell lines. *Immunol Lett* 152(1): 8-15, 2013.
- (3) Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Nakatani SM, Ono SK, Takahashi-Nakaguchi A, Gono T, **Yokosuka O**. Prevalence of hepatitis C virus subgenotypes 1a and 1b in Japanese

patients: ultra-deep sequencing analysis of HCV NS5B genotype-specific region. *PLoS One* 8(9): e73615, 2013.

- (4) Miyauchi T, Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Kato K, Arai M, Mikami S, Sugiura N, Kimura M, Goto N, Imazeki F, **Yokosuka O**. Efficacy of lamivudine or entecavir against virological rebound after achieving HBV DNA negativity in chronic hepatitis B patients. *Int J Med Sci* 10(6): 647-52, 2013.
- (5) Kamezaki H, Kanda T, Arai M, Wu S, Nakamoto S, Chiba T, Maruyama H, Fujiwara K, Kanai F, Imazeki F, Nomura F, **Yokosuka O**. Adherence to medication is a more important contributor to viral breakthrough in chronic hepatitis B patients treated with entecavir than in those with Lamivudine. *Int J Med Sci* 10(5): 567-74, 2013.

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 25 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	消化器内科・肝臓内科	准教授
	菅原 通子	埼玉医科大学	消化器内科・肝臓内科	講師
	吉野 廉子	埼玉医科大学	消化器内科・肝臓内科	助教
	内田 義人	埼玉医科大学	消化器内科・肝臓内科	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、劇症化に關与する要因を明らかにするためには、その生体側の要因とともに、増殖能を規定するウイルス学的背景を明らかにする必要がある。そこで、我々は核酸アナログ製剤の投与中止後における血清HBV-DNA量の増加速度と、ウイルス遺伝子の塩基配列の關連を解析し、ポリメラーゼ蛋白terminal protein domainにおけるaa15-17のアミノ酸変異が増殖能を規定し、これら酸性アミノ酸が連続する領域の何れかが中性アミノ酸に置換すると増殖速度が低下する可能性を見出した。今回はHuh-7D12細胞を用いた実験によって、これら生体内で觀察された現象がin vitroでも再現されることを確認した。また、B型劇症肝炎および免疫抑制・化学療法で再活性化して血清HBV-DNA量が短期間に高値になった症例では、同領域のアミノ酸配列が増殖速度の高度であるウイルスと同様であった。また、データベースを用いてgenotype AのHBV株で同領域のアミノ酸配列を見ると、変異率はAa株に比して増殖能が低いことが知られているAe株で低率であった。以上より、polymerase蛋白terminal protein domainにおけるaa14-19のアミノ酸変異はHBVの増殖能を規定し、肝病態の成立に關与すると考えられた。

A. 研究目的

HBV感染者は全世界で約40億人存在し、うち2億4,000万人はキャリアで、年間60万人が肝疾患に起因して死亡していると推定される。HBV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て、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、血清HBV-DNA量が高値になると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、宿主因子とともにウイルス

増殖能を規定する要因を明らかにする必要がある。

そこで、我々は核酸アナログによる抗ウイルス療法が著効し、その投与を中止したB型慢性肝疾患症例で、ウイルス血症再燃時の血清HBV-DNA量の推移を評価し、生体内におけるウイルス増殖能を検討した（病院IRB承認）。この検討における核酸アナログ中止基準は、HBe抗原陰性、HBV-DNA量が2.1 Log copies/mL未満が1年以上継続し、さらにHBVコア関連抗原量が3.0 Log IU/mL未満である。202例中34例（16.8%）がこの基準を満たしたが、HBs抗原量に関する規定を設けなかったため22

例 (64.7%) でウイルス血症が再燃した。但し、これら再燃例における血清 HBV-DNA 量の増加速度は症例によって異なり、4.0 Log copies/mL 以上に上昇する期間は2週から16週以降まで多彩であった。そこで、再燃時に単離した HBV の全塩基配列を解析したところ、生体内でのウイルス増殖能と genotype、pre-core、basal core promoter 変異には関連が見られなかったが、nt2,349 から nt2,357 は増殖速度が遅い症例で変異が多かった。この領域はコア蛋白の ORF では aa151-153 に、ポリメラーゼ蛋白では terminal protein domain (TPD) の aa15-17 に相当するが、後者は DDE と酸性アミノ酸が連続しており、その何れかが中性アミノ酸に置換された HBV 株は生体内における増殖速度が遅かった。

そこで、HBV のポリメラーゼ蛋白 TPD の aa15-17 がその増殖能を規定することを明らかにするために、Huh-7D12 を用いた *in vitro* での検討を行った。また、HBV の増殖能が亢進していると推定される B 型劇症肝炎および *de novo* B 型肝炎から単離した HBV 株および増殖速度が遅いとされる genotype Ae 株で塩基配列を解析し、病態との関連を検討した。

B. 研究方法

(1) *In vitro* での検討

核酸アナログ中止後に血清 HBV-DNA 量が 4.0 Log copies/mL 以上に上昇した期間が 4 週以内、4~12 週、12 週以降であった genotype B1/Bj の感染例から夫々単離したウイルス株 (AB900095、AB900107、AB900112) の全長 DNA を Huh-7D12 細胞に導入し、培養上清の HBV-DNA 量を経時的に測定した。導入効率は pSEAP2-Basic Vector を同時に導入し、培養上清の SEAP 酵素活性で確認した。

(2) 肝疾患症例における検討

以下の症例から単離した HBV 株でウイルス DNA の全塩基配列を解析し、ポリメラーゼ蛋白 TPD における aa15-17 のアミノ酸

配列を検討した。1) HBV 急性感染による劇症肝炎症例、2) 血液悪性腫瘍に対する化学療法後に HBV 再活性化し、3 か月間で血清 HBV-DNA 量が既往 5.4 Log copies/mL まで上昇した既往感染例、3) Genotype Ae の HBV 株による急性肝炎症例。Genotype Aa と Ae 株に関しては、NCBI database によって、aa15-17 のアミノ酸配列を検証した。

C. 研究結果

(1) *In vitro* での検討

導入した HBV-DNA のコア蛋白に関しては、3 株は何れも aa151~153 が RRG でアミノ酸変異は認められなかったが、ポリメラーゼ蛋白 TPD の aa15~17 は増殖速度の遅かった株 (AB900112) のみに E17G 変異が見られ、他の 2 株 (AB900095、AB900107) は配列が DDE の野生株であった。

培養 6 時間後の上清における HBV-DNA 量 (平均±SD, n=3) は生体内での増殖速度の遅い株が $2.0 \pm 0.5 \times 10^8$ copies/mL であったのに対して、中間の株は $11.8 \pm 1.3 \times 10^8$ copies/mL、速かった株は $23.1 \pm 5.4 \times 10^8$ copies/mL で、夫々 5.9 倍、11.6 倍であった。なお、DNA の導入効率は何れの細胞でも同等であった。

(2) 肝疾患症例における検討

B 型劇症肝炎急性感染例から単離した HBV 株は genotype C で pre-core が変異株、ポリメラーゼ蛋白 TPD の aa15~17 は DDE で野生株の配列を示した。HBV 再活性化例から単離した HBV 株は genotype C で pre-core と basal core promoter はともに野生株であったが、ポリメラーゼ領域は DDE で野生株であった。一方、急性肝炎患者から単離した genotype Ae 株は同領域のアミノ酸配列は DDG であり、極性の異なる変異が認められた。また、NCBI database による検討では、同領域のアミノ酸配列は、genotype Aa 株では DDE であったが、Ae 株は DDG が大部分であり、Bj ないし C 株で増殖速度の遅い株と同様の配列を示した。

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、nt2,349~2,357 の変異がウイルス増殖に関与する可能性があり、これに相当するポリメラーゼ蛋白 TPD における aa15~17 のアミノ酸変異がその primer 機能に影響し、増殖能を規定すると想定された。この仮説は Huh-7D12 細胞を用いた *in vitro* 実験でも確認され、劇症肝炎、急性肝炎および HBV 既往感染から再活性化した症例でも臨床経過との関連性が認められた。

Genotype A 株の中では一般に増殖速度が遅いとされる Ae 株では同領域が変異株と同様のアミノ酸配列を示すのに対して、Aa 株の配列は野生株と一致している。Genotype Bj、C 株でもポリメラーゼ蛋白 TPD の aa15~17 の配列が Aa 株、Ae 株の何れを呈するかによって、その感染例の病態が規定される可能性がある。

E. 結論

HBV のポリメラーゼ蛋白 TPD の aa15~17 のアミノ酸配列は、その増殖速度を規定し、感染例における再活性化、重症化などの病態を規定する可能性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 viral factor affecting replication activity of the virus. (submitted)

2. 学会発表

- (1) Yoshino K, Uchida Y, Sugawara K, Kouyama J, Naiki K, Nakayama N, **Mochida S**. The aa15-17 amino acid sequence in the terminal protein domain of HBV polymerase as a viral factor affecting *in vivo* replication activity of the virus. EASL 2013, Am-sterdam, 2013 April.
- (2) 内田義人, 神山淳一, **持田 智**. B 型肝炎の病態を規定する可能性がある新たなウイルス要因：ポリメラーゼ領域 aa15-17 の変異. シンポジウム「B 型肝炎：概念の変遷とその臨床的意義」. 第 49 回日本肝臓学会総会, 東京, 2013 年 6 月.
- (3) Uchida Y, Yoshino K, Sugawara K, Kouyama J, Naiki K, Nakayama N, **Mochida S**. The aa15-17 amino acid sequence in the terminal protein domain of HBV polymerase as a viral factor affecting *in vivo* as well as *in vitro* replication activity of the virus. The Liver Meeting 2013 AASLD, Washington, 2013 November.

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 25 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 東京大学大学院医学系研究科 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：本邦におけるB-HCCの家族歴の実態を明らかにするため、当科に2007年～2011年に入院したB-HCC 125例（男性99例、女性26例、平均年齢60.5歳）の家族歴を、診察時の問診および過去の診療記録により調査した。当科におけるB-HCCでは、親、同胞にHBV慢性感染が判明している例はそれぞれ39例（31%）、29例（23%）、HCC歴が判明している例は7例（6%）、9例（7%）であった。家族歴の有無による、発癌年齢や生命予後への影響については今回の調査では明らかではなく、複数の同胞にB-HCCが確認された濃厚家族歴をもつ4例に限ってみても同様であった。家族歴は、問診が唯一の情報源であるが、臨床医の家族歴への関心があまり高いとは言えないことと、本人自身も家族歴を把握していない例があり、漏れのない正確な情報の集積が今後の課題である。

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、致命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

(1)B型肝炎関連肝癌（B-HCC）の家族歴に焦点を当てた報告は少ないが、これまでの報告を総合すると、親・同胞にHCC患者が存在すれば本人の発癌リスクは2～3倍程度になるものと推測される。本邦におけるB-HCCの家族歴の実態を明らかにするため、当科に2007年～2011年に入院したB-HCC 125例（男性99例、女性26例、平均年齢60.5歳）の家族歴を、診察時の問診および過去の診療記録により調査した。当科にお

ける B-HCC では、親、同胞に HBV 慢性感染が判明している例はそれぞれ 39 例 (31%)、29 例 (23%)、HCC 歴が判明している例は 7 例 (6%)、9 例 (7%) であった。家族歴の有無による、発癌年齢や生命予後への影響については今回の調査では明らかではなく、複数の同胞に B-HCC が確認された濃厚家族歴をもつ 4 例に限ってみても同様であった。家族歴は、問診が唯一の情報源であるが、臨床医の家族歴への関心があまり高いとは言えないことと、本人自身も家族歴を把握していない例があり、漏れのない正確な情報の集積が今後の課題である。

(2) 当科にて構築した統括的な肝疾患データベースを活用し、肝細胞癌を合併した慢性 B 型肝炎患者 154 例の血清を抽出し、臨床的データとともに網羅的遺伝子多型解析のために提供した。

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) Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, **Koike K**, Karin M, Maeda S. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Jan 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24395807.
- (2) Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, **Koike K**. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. *J Gastroenterol* 2013 Nov 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24258409.
- (3) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, **Koike K**, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. *Int J Cancer* 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24174293.
- (4) Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, **Koike K**. Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 Jul 23. doi:pii: S0006-291X(13)01224-2. 10.1016/j.bbrc.2013.07.064. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23891753.
- (5) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Fushimi K, **Koike K**. Acute liver disease in Japan: a nationwide analysis of the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. *J Gastroenterol* 2013 Jun 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23783841.
- (6) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, **Koike K**. High

- levels of HBV after the onset lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2013 May 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23704123.
- (7) Mikoshiba N, Miyashita M, Sakai T, Tateishi R, **Koike K**. Depressive symptoms after treatment in hepatocellular carcinoma survivors: prevalence, determinants, and impact on health-related quality of life. *Psychooncology* 2013 May 19. doi:10.1002/pon.3300. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23686523.
- (8) Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Mikami S, Sato M, Uchino K, Arano T, Enooku K, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Matsuyama Y, Omata M, Ohtomo K, **Koike K**. CT with hepatic arteriography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2013 Apr 30. doi: 10.1038/ajg.2013.109. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23629602.
- (9) Inoue Y, Tomiya T, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ikeda H, **Koike K**. Induction of p53-Dependent p21 Limits Proliferative Activity of Rat Hepatocytes in the Presence of Hepatocyte Growth Factor. *PLoS One* 2013;8(11):e78346. PubMed PMID: 24223793
- (10) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatzia Apostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, **Koike K**, Karin M. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell* 2013;155(2):384-396. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.031. PubMed PMID: 24120137.
- (11) Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Kondo Y, Akanuma M, Yoshida H, **Koike K**. Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs. *Sci Rep* 2013 Sep 24;3:2739. doi:10.1038/srep02739. PubMed PMID: 24061441.
- (12) 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;432(1):22-27. PMID: 23376718.
- (13) Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, Akanuma M, Kang YJ, Yoshida H, Otsuka M, **Koike K**. The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice. *Sci Rep* 2013 Aug 30;3:2553. doi: 10.1038/srep02553. PubMed PMID: 23989853.
- (14) 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* 2013;43(6):596-604. PubMed PMID: 23131000.
- (15) Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Otomo K, Omata M, Yoshida H, **Koike K**. Frequency, risk factors and survival associated with an intrasubsegmental recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2013 Apr 12;8(4):e59040. doi: 10.1371/journal.pone.0059040. Print 2013. PubMed PMID: 23593129; PubMed Central PMCID: PMC3625228.
- (16) 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.
- (17) 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.

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25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 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、癌抑制遺伝子であるp53、癌遺伝子である β -cateninの肝細胞癌における発現および臨床病理学的な特徴、予後に関する検討を行った。Biliary / stem cell marker陽性の肝細胞癌、p53陽性の肝細胞癌では悪性度（分化度、vp/im等）、線維性間質との関連が見られた。 β -catenin陽性の肝細胞癌は悪性度や線維性間質との関連が明らかでなく、AFP値、PIVKA値との相関のみがみられた。またHBs抗原との関連が、CK19陽性の肝細胞癌およびp53陽性の肝細胞癌で見られた。予後に関しては、CK19が一番強く関連すると考えられた。CK19陽性の肝細胞癌とEpCAM陽性の肝細胞癌、EpCAM陽性の肝細胞癌とp53陽性の肝細胞癌では関連が認められたが、その他では関連は認めなかった。以上、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るが、さらに悪性度に係わる機序、サブクラス分類との関連を検討する予定である。

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、癌抑制遺伝子である p53、癌遺伝子である β -catenin 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、予後について検討した。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%の腫瘍細胞に染まるものを陽性とした。また、p53 は結節の 5%以上で濃い核の染色像を示すもの、 β -catenin は 10%以上の核ないし細胞質に明瞭な染色所見を認めるものを陽性(異常所見陽性)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。AFP は 21ng/ml 以上、PIVKA は 40ng/ml 以上を高値とした。

結果は CK19 陽性例が 12/211 例(5.6%)、EpCAM 陽性例 は 25/211 例(11.8%)、p53 陽性例は 20/211 例(10.4%)、 β -catenin 陽性例は 18/211(8.5%)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。p53 陽性例は p53 陰性例に比べ、分化度が低く、門脈浸潤が多く、線維性間質を有する症例が多かった。 β -catenin 陽性例は AFP、PIVKA 値が高いものが多かった。マーカー同士の関連に関しては、CK19 陽性例と EpCAM 陽性例、EpCAM 陽性例と p53 陽性例で有意な関連が見られた。

予後に関しては、Disease Free Survival (DFS)および Overall Survival (OS)との関係

を Kaplan-Meier 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、p53 陽性例および β -catenin 陽性例では陰性例と比べて、再発および生存率に関する有意な差は得られなかった。p53 陽性例に関しては再発例が多く見られたが、今回の検討では統計学的には有意ではなかった。またウイルス学的背景因子との関連に関しては、CK19 陽性例および p53 陽性例では陰性例に比べて、HBs 抗原陽性のものが有意に多かった($p<0.05$)。いずれも HCV 抗体陽性率に関する相関は見られなかった。EpCAM 陽性例および β -catenin 陽性例では、HBs 抗原陽性率、HCV 抗体陽性率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。p53 陽性例に関しては、肝細胞癌に関しては免疫染色のみでの検討は難しいとの報告も見られるが、悪性度にかかわる因子であり、予後不良との関連が推測される。 β -catenin 陽性例は予後不良とする報告が見られる。

今回の検討では、Biliary / stem cell marker 陽性の肝細胞癌および p53 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。 β -catenin 陽性の肝細胞癌は悪性度や線維性間質との関連が明らかでなく、AFP 値、PIVKA 値との相関のみが見られた。また HBs 抗原との関連が、CK19 陽性の肝細胞癌および p53 陽性の肝細胞癌で見られた。予後に関しては、CK19 が一番強く関連すると考えられた。今回検討したマーカー同士の関連は一部で見られるものの、それぞれ個々のマーカーが異なる悪性度を反映している可能性が考え

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、さらに悪性度に係わるマーカーに関して検討し、サブクラス分類との関連を検討する予定である。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。

E. 結論

Biliary / stem cell marker 陽性の肝細胞癌、p53 陽性の肝細胞癌では、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 β -catenin 陽性の肝細胞癌は悪性度や線維性間質との関連が明らかでなく、AFP 値、PIVKA 値との相関のみが見られた。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、さらに悪性度に係わるマーカーに関して検討し、サブクラス分類との関連を検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Fukuma M, Tanese K, Effendi K, Yamazaki K, Masugi Y, Suda M, **Sakamoto M**. Leucine- rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 319: 113-21, 2013.
- (2) Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Masugi Y, Makino S, **Sakamoto M**. Involvement of hepatocellular carcinoma biomarker, cyclase-associated protein 2 in zebrafish body development and cancer progression. *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 25 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消化器外科学分野 I 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：B型肝細胞癌患者の切除組織から非腫瘍部の細胞を分離、初代培養した。コラゲナーゼ灌流、濾過、遠心、コラーゲンコートディッシュを組み合わせることにより肝細胞を培養した。分離操作を始めるまでに3時間以上が経過した、長時間温阻血肝からの培養では生細胞はほとんど得られなかった。温阻血時間が2-3時間の症例では生細胞が10%程度あったが、培養3日目には大部分の肝細胞は死滅し、残った生細胞のうち肝細胞は10%以下であった。培養中に繊維芽細胞が旺盛に増殖し、結果的に培養日数の経過とともに肝細胞の比率はさらに低下した。臓器保存・修復の技術を併用することにより、培養3日目までの生細胞数を増加させることができたが、肝細胞の比率は同様であった。DMSO含有培地により繊維芽細胞を減少させ肝細胞の比率を上げられたが、肝細胞数は変わらなかった。肝細胞は10週目まで維持し得た。さらに詳細な条件検討が必要だが、炎症、線維化、発癌の基礎研究に重要なリソースを構築できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

B 型肝炎感染肝細胞を初代培養し、ウイルス存在下での各種ストレスに対する反応を評価し得る細胞ソースを提供するシステムを構築する。

B. 研究方法

切除肝組織の病理診断に影響がない部分を採取し、以下の方法で細胞を分離、培養した。

- 1) 採取した盲端状の肝組織では、断面の門脈断端にカニューレションし、前灌流後にコラゲナーゼ灌流、コラゲナーゼ消化した。
- 2) 盲端状ではない組織では、血管断端から可及的に wash out し、直ちに 2mm 角に細断し、洗浄後にコラゲナーゼ消化した。
- 3) 上記の各々のコラゲナーゼ処理を行う前に、われわれが独自に作成した臓器灌流保存用の灌流液を用いて低温酸素化灌流、あるいは、細断片を低温酸素

化液に浸漬し、組織の修復を試みた。修復後に分離培養することにより、初代培養細胞の回収率が向上するかを検討した。

- 4) Williams' E, DMEM/F12 に FBS、ニコチナマイド、デキサメサゾン、ITS mixture 等を添加し、細胞増殖に適した培地を検討した。

(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・コンセントを取得した。また、臨床情報、検体を用いた研究の妥当性につきあらかじめ申請し、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得た内容について検討した。

C. 研究結果

- 1) 盲端状組織：前灌流およびコラゲナーゼ灌流により、赤血球が除去され、シングルセル化も容易であった。