

#### 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

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) Wu S, Fukai K, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, **Yokosuka O**. Initial virological response and viral mutation with adefovir dipivoxil added to ongoing Lamivudine therapy in Lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Dig Dis Sci*. 2011 Apr;56(4):1207-14.
- (2) Wu S, Imazeki F, Kurbanov F, Fukai K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Tanaka Y, Mizokami M, **Yokosuka O**. Evolution of hepatitis B genotype C viral quasi-species during hepatitis B e antigen seroconversion. *J Hepatol*. 2011 Jan;54(1):19-25.
- (3) Bekku D, Arai M, Imazeki F, Yonemitsu Y, Kanda T, Fujiwara K, Fukai K, Sato K, Itoga S, Nomura F, **Yokosuka O**. Long-term follow-up of patients with hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jan;26(1):122-8.
- (4) Kamezaki H, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Maruyama H, Fujiwara K, Imazeki F, **Yokosuka O**. Emergence of entecavir-resistant mutations in nucleos(t)ide-naive Japanese patients infected with hepatitis B virus: virological breakthrough is also dependent on adherence to medication. *Scand J Gastroenterol*. 2011 Sep;46(9):1111-7.
- (5) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Shirasawa H, **Yokosuka O**. Nuclear receptor mRNA expression by HBV in human hepatoblastoma cell lines. *Cancer Lett*. 2011 Dec 15;312(1):33-42.
- (6) Togo S, Arai M, Tawada A, Chiba T, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, **Yokosuka O**. Clinical importance of serum hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat*. 2011 Oct;18(10):e508-15.
- (7) Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Goto N, Imazeki F, **Yokosuka O**. Efficacy of lamivudine or entecavir on acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Int J Med Sci*. 2012;9: 27-32.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) 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 23～25 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）の再活性化に関与する要因を明らかにするためには、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ります。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未満が1年以上持続し、コア関連抗原が3.0 Log IU/mL未満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。ポリメラーゼ蛋白terminal protein domainのaa15~17はDDEと酸性アミノ酸が連続しているが、生体内で増殖速度の遅かった症例から単離したHBV株では、その何れかが中性アミノ酸に置換する変異が高率に観察された。同領域のアミノ酸変異によるHBV増殖速度の差異は、Huh-7D12細胞を用いたin vitro実験によって確認され、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の臨床経過とも矛盾がなかった。以上より、ポリメラーゼ蛋白terminal protein domainにおけるaa15-17のアミノ酸変異はHBVの増殖能を規定し、肝病態の成立に関与すると考えられた。

#### 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

グの中止基準を公表したが、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と HBV の全塩基配列を比較することで、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、これら症例から単離した HBV の DNA を Huh-7D12 細胞に移入する *in vitro* 実験によって、その機能を検証した。

## B. 研究方法

対象は血清 HBV-DNA 量が 4.0 Log copies/mL 以上で核酸アナログ投与を開始した B 型慢性肝疾患 202 症例。HBe 抗体陽性で血清 HBV-DNA 量 2.1 Log copies/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) 未満を示した場合に核酸アナログを中止した。血清 HBV-DNA 量は中止後 16 週までは 2 週ごと、その後は 4 週ごとに測定し、4.0 Log copies/mL 以上になった症例では、ウイルスの全塩基配列を解析し、核酸アナログを再開した。

また、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。

さらに、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。なお、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

202 例のうち中止基準を満たしたのは計 34 例 (16.8 %) で、中止後に再燃の見られなかった症例は 8 例 (23.5 %) 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、basal 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。

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。

Huh-7D12 細胞を用いた *in vitro* 実験では、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 (n=3) は生体内での増殖速度の遅い株に比して、中間の株は 5.9 倍、速かった株は 11.6 倍高値であった。なお、DNA の導入効率は何れの細胞でも同等であった。

また、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 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。

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。また、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) 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.
- (3) 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, Amsterdam, 2013 April.

- (4) 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.

- (5) 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 23～25 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 消化器内科学 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。また、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の守秘義務、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) 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。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。

2) 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。

### 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) 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.
- (2) 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.
- (3) 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.



- (4) 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.
- (5) 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. (2011 IF=9.154)
- (6) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, **Koike K**. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2013 May 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23689989.
- (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 Nov 4;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, Hatziaepostolou 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. PubMed PMID: 24120137.
- (11) 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.
- (12) **Koike K**. The oncogenic role of hepatitis C virus. *Recent Results Cancer Res* 2014;193:97-111. PMID: 24008295.
- (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. PubMed PMID: 23989853.
- (14) 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* 2013;43:906-910. PMID: 23279215.
- (15) 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* 2013;43(6):596-604. PubMed PMID: 23131000.

- (16) 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. PubMed PMID: 23593129; PubMed Central PMCID: PMC3625228.
- (17) 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.
- (18) 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- $\kappa$ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. *Hepatology* 2013;57:162-170. PMID: 22898998.
- (19) 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. PubMed PMID: 22760340.
- (20) 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. PubMed PMID: 22999746.
- (21) 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* 2011;47(2):187-194. PubMed PMID: 21976134.
- (22) 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.
- (23) Ikeda H, Tejima K, Masuzaki R, Yatomi Y, **Koike K**. Reply to the letter by H. Mawatari et al. regarding "Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B with the same grade of liver stiffness and splenomegaly". *J Gastroenterol* 2012; 47:608. PubMed PMID:22388886.
- (24) 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.
- (25) 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.
- (26) 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.
- (27) Goto T, Yoshida H, Tateishi R, Enooku K, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Imamura J, Shiina S, **Koike K**, Omata M.

- Influence of serum HBV DNA load on recurrence of hepatocellular carcinoma after treatment with percutaneous radiofrequency ablation. *Hepatol Int* 2011 Sep;5(3):767-773.
- (28) Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, **Koike K**. MicroRNA122 is a key regulator of  $\alpha$ -fetoprotein expression and influences the aggressiveness of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun*. 2011 Jun 7;2:338.
- (29) Arano T, Nakagawa H, Tateishi R, Ikeda H, Uchino K, Enoku K, Goto E, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, **Koike K**. Serum level of adiponectin and the risk of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2011;129:2226-2235.
- (30) Ikeda H, Tateishi R, Enoku K, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Kume Y, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ono T, **Koike K**, Yatomi Y. Prediction of hepatocellular carcinoma development by plasma ADAMTS13 in chronic hepatitis B and C. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(10):2204-2211.
- (31) Nakagawa H, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Watanabe N, Tejima K, Kume Y, Iwai T, Suzuki A, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Omata M, Igarashi K, Aoki J, **Koike K**, Yatomi Y. Autotaxin as a novel serum marker of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2011;412(13-14):1201-1206.
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 23～25 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：組織プロテオーム解析により肝細胞癌進展の新規分子マーカーとして同定されたタリン-1の臨床病理学的意義につき解析した。タリン-1低発現群に比べ、高発現群において肝細胞癌の分化度は有意に低く、門脈浸潤を伴っている率が有意に高かった。さらに、高発現群は低発現群に比して、有意に無病生存期間が短かった。本研究により、肝細胞癌進展に伴いタリン-1の発現が上昇することが明らかにされ、予後予測にも有用である可能性が示唆された。biliary / stem cell marker、癌遺伝子・癌抑制遺伝子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。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. 研究方法

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

1. クッパー細胞、血管平滑筋細胞、胆管および類洞の内皮細胞が抗タリン-1 抗体により著しく染まったのに対して、非癌部の肝細胞のタリン-1 に対する免疫反応性は明らかに弱かった。癌に隣接する非癌部肝細胞の細胞質の染まりより強く癌細胞の細胞質が抗タリン-1 抗体で染まる場合を、癌細胞におけるタリン-1 の発現上昇とみなした。タリン-1 は、隣接する非癌部の肝細胞と比較し、早期肝細胞癌で有意に発現が上昇していた ( $p=0.003$ )。106 個の肝細胞癌結節検体の免疫組織化学的検索にて、肝細胞癌のタリン-1 に対する免疫反応性が統計学的有意差をもって癌の脱分化に伴い漸増することが示された ( $p=0.001$ )。低分化型肝細胞癌は、タリン-1 発現上昇を伴う癌細胞の割合の高さのみならず、タリン-1 の免疫染色による細胞質の染まりの強い染色強度が特徴的であった。異型結節は、肝細胞癌と比較し、タリン-1 発現上昇の割合が有意に低かった ( $p=0.003$ )。臨床病理学的因子とタリン-1 発現の関係について検討する際、調査をした 106 個の肝細胞癌結節のタリン-1 発現上昇を伴う癌細胞の割合の平均が 53% であったこともあり、検討対象となる検体をタリン-1 発現上昇癌細胞の割合が 50% 以上の群と 50% 未満の群とに分けた。予想された通り、癌の脱分化度は両群間で有意差があった ( $p=0.004$ )。非常に興味深い結果として、タリン-1 発現上昇癌細胞の割合が 50% 未満の群に比べ、50% 以上の群において門脈浸潤を伴っている率が有意に高いことが分かった ( $p=0.029$ )。これらの結果に一致して GeMDBJ 上の公開マイクロアレイデータでの検証にて、低分化型および門脈浸潤陽性肝細胞癌で、それぞれ高分化型および門脈浸潤陰性肝細胞癌と比較し、有意にタリン-1 の mRNA 発現が上昇していることが判明した (それぞれ  $p=0.034$ ,  $0.040$ )。背景因子では、ウイルス陰性群に比して陽性

群で高発現を認める傾向はみられたが有意ではなく、また B 型、C 型の間で有意差は認めなかった。追跡が可能であった 72 人の肝細胞癌患者の無病生存期間について分析したところ、タリン-1 発現上昇を伴う癌細胞の割合が 50% 以上の 47 人の患者では、同 50% 未満の 25 人の患者に比べ、有意に無病生存期間が短かった ( $p=0.039$ )。

2. 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  $\beta$ -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、 $\beta$ -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%)、 $\beta$ -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。 $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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

1. プロテオーム解析の結果と一致して、非癌部肝細胞と比較した大多数の肝細胞癌細胞でタリン-1 発現が上昇していることが、免疫組織化学的解析にて確認された。癌の脱分化度に伴う肝細胞癌のタリン-1 に対する免疫反応性の段階的な上昇は、肝細胞癌進行過程へのタリン-1 の関与を示唆している。一般的に、進行肝細胞癌の予後不良は、高率に認められる肝内転移および血管浸潤に関連付けられる。タリン-1 発現上昇を伴う肝細胞癌に有意に高率に門脈浸潤が認められたことは、肝細胞癌に対する肝部分切除術後の再発までの期間がタリン-1 発現上昇を伴う群において有意に短かったこととの関連があるものと思われ、タリン-1 の腫瘍マーカーとしての価値が予後予測においても見出されることが示唆された。タリン-1 は、インテグリン  $\beta$  サブユニットの細胞質ドメインとアクチンフィラメントとを連

結させる作用のある数ある蛋白質の一つである。最近、タリン-1 が前立腺癌の細胞遊走、接着および浸潤を促進させることが報告された。加えてタリン-1 は、接着斑キナーゼ (focal adhesion kinase, FAK) を動員することにより、接着斑におけるシグナル伝達にも役割を果たしていると考えられている。FAK は Src や Ras を動員し、下流のシグナル経路を活性化させることが報告されている。このような知見は、タリン-1 発現上昇を伴う肝細胞癌で高率に認められた門脈浸潤と関連付けられる可能性がある。

2. 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。 $\beta$ -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。 $\beta$ -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

タリン-1 は肝細胞癌において、癌進行度に応じて発現が増加し、予後予測のマーカーとして役立つ可能性が示唆された。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  $\beta$ -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) Kanamori H, Kawakami T, Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Ebinuma H, Masugi Y, Du W, Nagasaka K, Ogiwara A, Kyono Y, Tanabe M, Saito H, Hibi T, **Sakamoto M**. Identification by Differential Tissue Proteome Analysis of Talin-1 as a Novel Molecular Marker of Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 80: 406-415, 2011
- (2) Tsuchiya K, Komuta M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Itakura J, Nakanishi H, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Enomoto N, **Sakamoto M**, Izumi N. Expression of keratin19 is related to high recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. *Oncology* 80: 278-288, 2011
- (3) Yamazaki K, Masugi Y, **Sakamoto M**.

Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma: altering transforming growth factor- $\beta$  signaling in hepatocarcinogenesis. *Dig Dis*. 29: 284-8, 2011.

- (4) Yokoo H, Yasuda J, Nakanishi K, Chuma M, Kamiyama T, Todo S, Hirohashi S, **Sakamoto M**. Clinicopathological significance of nuclear factor- $\kappa$ B activation in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 41: 240-9, 2011.
- (5) 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*. 2012.
- (6) 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.
- (7) 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 23～25 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：

**[1]** 九州大学大学院総合外科にて施行された肝細胞癌(HCC)に対する肝切除症例(279例)の病態解析を行った。HCV(+)(49%)、HBV(+)(18%)、HCV(+)/HBV(+)(3%)、HCV(-)/HBV(-)(NBNC; 30%)であった。AFB1-DNA付加体は279例中6%に認められ、HCV群0%、HBV群10%、NBNC群16%であった。NBNC群におけるAFB1陽性例(n=13)とAFB1陰性例(n=70)を比較すると、肝機能、背景肝疾患、肝硬変の程度に有意差はなかった。p53変異は279例中22%に認められ、G:C→T:A transversionは19例であった。p53変異とAFB1陽性は相関しなかったが、codon249変異を認めた3例は全てAFB1陽性であった。アフラトキシンは非肝炎ウイルス性HCCの原因の一つである。

**[2]** 北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I (以下、当科)にて施行された、HCC初回切除症例(462例)の病態解析を行った。NBNC群(25%)とHBsAb(+)(42%)の患者、腫瘍、組織学的因子は近似していた。HBV既感染は再発、生存とは関係しなかった。BC型重合感染群(2.1%)では累積生存、無再発生存共に有意に悪化した。NBNC群のうちHBV既感染(n=66)とHBV非感染(n=39)を比較すると、HBV既感染は累積生存、無再発生存に影響を与えず、一方、B型、BC型重合感染HCCの予後はHBV感染の状態が深く関与した。

**[3]** 肝細胞癌初回切除症例(521例)を予後不良の危険因子の個数から分類し、病態解析を行った。癌関連死亡(n=150, 78.1%)のうち、術後1年以内の癌関連死は48例(32%)を占めた。AFP>1,000(ng/ml)、腫瘍数≥4、腫瘍サイズ≥5 cmが術後1年以内の早期死亡の危険因子であった。これらの危険因子を有さない(Risk 0)群の5年生存率は85.4%であり、術前に危険因子を3つ有する場合には手術以外の治療を考慮する必要があると考えられた。

**[4]** 当科にて切除されたB型HCC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。コラゲナーゼ灌流により肝細胞を分離後、初代培養した。3時間以上の温阻血肝では生細胞率はほとんどなく、培養3日目には大部分の肝細胞は死滅した。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し、肝細胞は10週目まで維持された。HBV感染を背景に持つヒト肝細胞の初代培養が可能であった。

A. 研究目的

**[1]** 本邦における肝細胞癌(HCC)のうち10-20%がB型肝炎ウイルス(HBV)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。本課題ではB型HCCの病態を精査し、治療の標的となり得るメカニズムを見出すことだが、その対照として肝炎ウイルス非感染



HCC の病態を理解することは重要である。そこで強力な肝発癌物質である Aflatoxin B1(AFB1)による HCC の特徴を明らかにする。

[2] 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。

[3] 術後 1 年以内の早期死亡(Early Death; ED)は、HCC の生存率を低下させる要因として重要である。術後早期死亡(ED)群を術前に予測し得る方法があれば、非手術治療によって成績を改善できる可能性があり、少なくとも QOL を改善するはずである。ED 群および非早期死亡(NED)群の病態を解析し、その予後予測因子を見出すこと本研究の目的である。

[4] 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

[1] 九州大学総合外科(前任施設)にて 2004 年から 2008 年に HCC に対して肝切除を施行した 279 例を対象とした。抗 HCV 抗体 (+)136 例(49%)、HBs 抗原(+)50 例(18%)、抗 HCV 抗体(+)/HBs 抗原(+)9 例(3%)、抗 HCV 抗体(-)/HBs 抗原(-)84 例(30%)に分け、AFB1-DNA 付加体を免疫組織化学染色で検討し、さらに p53 遺伝子の exon5-exon9 を PCR-direct sequencing 行い point mutation を検討した。

[2] 北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I (以下、当科と略記)で行った HCC 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。

[3]対象：当科で1997年から2009年までに施行されたHCCの初回切除例 (521例)を対象とし、1年以内に死亡した群(ED群: n=48; 9.2%)と非早期死亡群 (NED群: n=473; 90.8%)に群分けし、臨床病理学的な特徴と治療成績を検討した。

解析：ED, NED 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。

[4] 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、細断片の低温酸素化を行い、組織修復を試みた。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 4 1 5 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、九州大学大学院医学研究科および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] 1) AFB1-DNA 付加体の免疫組織学的検討：** AFB1-DNA 付加体の平均の染色数(核1000個あたり)は31%(5-80%)であり全例肝細胞核に認められた。

AFB1-DNA 付加体は279例中18例(6%)に認められ、HCV群0%、HBV群10%、NBNC群16%とHBV群およびNBNC群で有意に陽性であった。NBNC群におけるAFB1陽性例(n=13)とAFB1陰性例(n=70)を比較検討したところ、肝機能、背景肝疾患(アルコール多飲の有無、NASHなど)、肝硬変の程度に有意差を認めなかった。

**2) p53 変異の検討：** p53 変異は279例中41例(22%)に認められた。Exon5:13例、exon6:11例、exon7:12例、exon8:10例、exon9:2例。G:C→T:A transversionは19例、G:C→A:T transversionは12例であった。P53変異とAFB1-DNA付加体陽性との間には有意な相関は認めなかったものの、codon249変異を認めた3例は全てAFB1-DNA付加体陽性であった。

### **[2] NBNC 群の臨床病理学的特徴**

#### **1. 患者因子**

B群、NBNC群では年齢(56.1±9.5, 67.9±9.3\*)に有意差を認めたが、T.Bil(0.8±0.4, 0.8±0.3), Alb(4.1±0.4, 4.1±0.4), ICG R15(15.2±9.9, 15.4±8.5%), 男女比(164:31, 104:12)は同様に分布していた。

#### **2. 肉眼的腫瘍因子**

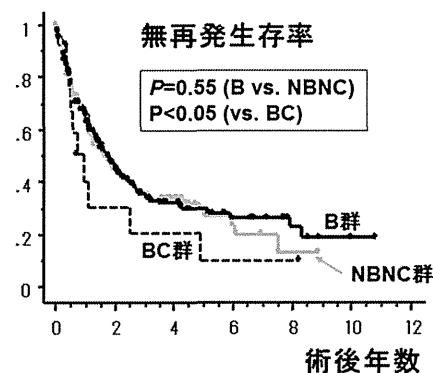
肝硬変の合併例はB群で45%、NBNC群で22%であった(p<0.05)。腫瘍最大径はB群で5.7±4.4 cm、NBNC群で7.0±4.5 cmであった(p<0.05)。血中AFP、AFP-L3分画、PIVKA-II、腫瘍個数は両群間に有意差を認めなかった。

### **3. 組織学的腫瘍因子**

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なかった。

### **4. 切除成績**

BC群が無再発生存・累積生存率とも有意に不良だったが、NBNC群とB群の予後は同等であった。



HBV 既感染症例の臨床病理学的特徴

### **5. 患者因子、腫瘍因子、予後**

NBNC群をHBV既感染の有無で分類すると、n(66, 39)年齢(67.2±9.2, 70.7±9.8), T.Bil(0.8±0.4, 0.7±0.3), Alb(4.1±0.4, 4.0±0.4), ICG R15(16.0±8.5, 15.9±9.1%), 男女比(58:8, 36:3)であり、有意な変化を認めなかった。患者因子(血中AFP, AFP-L3, 肝硬変合併率)、腫瘍因子(腫瘍最大径、腫瘍個数、腫瘍肉眼型、組織学的分化度、組織学的門脈侵襲、組織学的静脈侵襲)、予後(無再発生存、累積生存)に有意差を認めなかった。

**[3] 死因は癌進展(150; 78.1%), 手術関連死(1; 0.5%), 肝不全(15; 7.8%), その他(26; 13.5%)であった。多変量解析の結果、早期死亡の危険因子は以下の通りであった：血清アルブミン(<4 g/dl)、Child-Pugh分類(B)、根治度(R0, R1)、腫瘍数(≥4)、腫瘍サイズ(≥5cm)、肉眼的脈管浸潤(門脈・肝静脈)、AFP(>1000ng/ml)、AFP-L3(40%<)、PIVKA-II(1000m AU/ml<)、肝硬変、分化度(壊死)、顕微鏡的脈管浸潤(門脈・肝静脈)、遠隔転移。**

1年以内に癌進展によって死亡するリスク(HR)は、AFP(>1000ng/ml; vs. ≤200)では4.098 (p=0.0079)、腫瘍数(≥ 4; vs. <4)では3.535 (p=0.0208)、腫瘍サイズ(≥ 5cm; vs. 2-5)では3.687 (p=0.0295)、低分化(vs. mod.)では2.8 (p=0.0179)、vp1 (vs. vp0)では5.02 (p=0.0037)、vp2 (vs. vp0)では8.507 (p=0.0034)であった。

1年以内に癌進展によって死亡するリスク(HR)を危険因子なし(risk0; n=276)を基準として危険因子の保有数で比較すると、危険因子1つ(risk1)ではHRが7.856、risk2では46.468、risk3では136.5であった。術後生存日数はrisk0,1,2,3群で著明な相異が認められた(図右)。

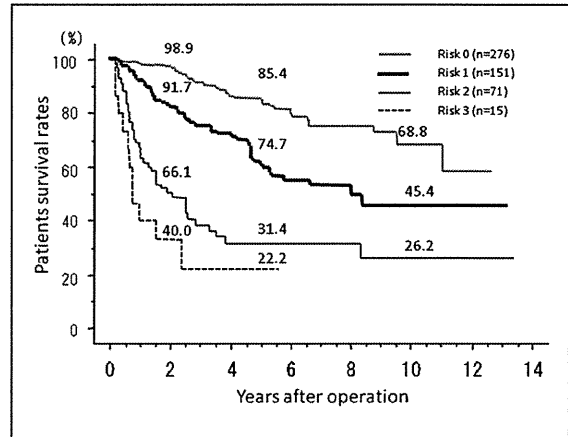
[4] 1) 盲端状組織： 前灌流およびコラゲナーゼ灌流により、赤血球が除去され、シングルセル化も容易であった。

2) 細断組織： 赤血球の混入が多かったため、金属メッシュを通した後に洗浄し、さらに溶血処理を要した。コラゲナーゼ消化に至るまでに時間を要したために、盲端状組織からの分離よりも生細胞の回収率は低かった。

3) 低温酸素化による組織修復： 移植臓器の低温酸素化灌流用に自作した灌流液を使用した。灌流液を酸素化し、約20℃で30分灌流した。その後、上記1)あるいは2)の分離操作を行った。検体処理までに阻血時間が3時間を超えた検体では、通常の培養では生細胞が回収されなかったが、低温酸素化処理を行った場合にのみ生細胞を培養できた症例があった。

比較的温阻血時間が短い場合には、低温酸素化なしでも生細胞が回収された。この場合にも低温酸素化によって回収率は向上した印象があったが、細胞量に限りがあるため、細胞数カウントは行わなかった。

4.) 培地の選択： 同様の処理を行った細胞を、種々の培地で培養した。培養3日目までに多くの細胞が細胞死に陥ったが、Williams' E, DMEM, F12mixtureを混合し、FBS、ニコチナマイド、デキサメサゾン、



ITS mixture を添加した培地では、1日目から接着する細胞が多数存在した。特に、低温酸素化後に分離し、上記培地で培養を始めた場合には、他の方法と比べ生細胞の回収率が高かった。その後の培養においても、細胞を良好に維持した。何れの処理を行っても、培養3日目に接着している細胞の中には、旺盛に分裂、増殖する敷石状の細胞集団が存在した。当初から観察可能な肝細胞は、時間経過と共に増殖細胞に囲まれて、同定が困難になった。この細胞種は繊維芽細胞と考えられ、DMSO 添加培地では増殖せず、寧ろ積極的に細胞死に陥った。その結果、当初観察されていた肝細胞が再び観察されるようになった。これを繰り返し、10週目まで肝細胞を維持し得た。

#### D. 考察

[1] 食物への Aflatoxin 暴露は発展途上国では認められるが、本邦では輸入制限などによりその暴露は少ないと言われてきた。Aflatoxin は p53 codon 249 に bulky な DNA 付加体を形成し、G→T transversion の原因となり、高頻度に肝細胞癌を引き起こす (Nature 1991, Lancet 1991)。今回の検討で、その頻度は少なかったものの、p53 遺伝子 codon249 変異を認めた 3 例は全て AFB1-DNA 付加体陽性であったことから、本邦における非ウイルス性肝細胞癌の原因の一つとして aflatoxin を考慮しなければならないことが示唆された。

[2] HBV 既感染、発癌、再発について、

今回の検討では因果関係を見出せなかった。糖尿、アルコール多飲の合併と肝硬変、発癌、再発について更なる解析が必要であろう。また、いわゆるオカルト HBV と HBV 既感染、発癌、再発の関係を明らかにすることも今後の課題であろう。

今後、B, BC, NBNC の各群における無再生存、累積生存に深く関与すると考えられる、肝癌再発、異時性発癌、肝線維化、肝硬変の進展を病理組織学的に解析し、遺伝子発現プロファイルと比較することにより、B 型肝炎に特異的な病態進行のメカニズムを明らかにすることが求められる。

**[3]** 多くの悪性度マーカーや、臨床病理学的な危険因子が提唱されていたが、予後予測は確実ではない。従来 of 予測方法に加えて、術前に診断可能な AFP(>1000ng/ml)、腫瘍数(≥4)、腫瘍サイズ(≥5cm)、によって評価することによって、適切な治療を提供する一助となるはずである。

本検討では術前診断可能な 3 つの危険因子を中心に解析したが、前記の如く多変量解析で示された危険因子はさらに多く、これらを組み合わせることで、今後さらに正確な予後予測が可能になるであろう術後の因子も含めたさらなる予測方法を見出すことにより、術前診断が risk1,2 群の予後を改善させる治療オプションを模索するべきであり、本データがその一助となるはずである。

**[4]** 本研究では、門脈遮断から肝摘出、検体処理までに要する時間が阻血時間となるが、冷蔵せずに 3 時間を超えた症例においても、組織修復処置を行えば初代培養が可能であることを示した。

系統的な灌流が困難な症例でも、ブロックであれば採取可能な場合は多い。本法を用いることにより、特殊な設備なしに、初代培養が可能になるはずである。

本研究では肝細胞は 10 週にわたって維持されたが、目的である HBV 感染が維持

された細胞であるかは検討していない。今後、HBV 感染状態の推移を明らかにする必要がある。

また、肝細胞と繊維芽細胞の関係も精査が必要である。繊維芽細胞は不要な細胞の混入なのか、あるいは、肝細胞の維持に必要なのかは今後の課題である。

以上の検討から、それぞれの癌に対する個別医療を実現するためには、患者由来の癌および背景肝の現状とゲノム情報を迅速に再現性のある方法論で精査するシステムが必要である。われわれの臨床情報と検体の凍結保存システムを発展させ、凍結融解、再培養可能な細胞リソースを構築できれば、本分野のさらなる発展に貢献すると考えられる。

現在、われわれは独自に見出した肝癌の悪性度マーカー候補分子について、各種のウイルスベクターを用いた強制発現、ノックダウンの系を構築し、癌の挙動を解析している。今後、ZFN/TALEN, CRISPR/Cas などの遺伝子制御法を併用して、より信頼度の高い検証システムを構築することにより、個別医療化への道筋が開かれるはずである。

## E. 結論

**[1]** 本邦における非肝炎ウイルス性肝細胞癌の原因としてアフラトキシンは否定できない。

**[2]** NBNC 群の患者、腫瘍、組織学的因子は B 群と近似した。HBV 既感染は糖尿、アルコール多飲と同様に NBNC 群の最も多い併存病態であり、肝発癌や悪性度への関与が推測されるが、NBNC 群の再発、生存に有意な影響を与えない。

**[3]** AFP(>1000ng/ml)、腫瘍数(≥4)、腫瘍サイズ(≥5cm)、術後 1 年以内の癌死の危険因子であり、術前に上記の 3 つの危険因子の全てを保有する症例では、手術以外の治療を第一選択にするべきである。一方、危険因子が少ない場合には、予後良好の可能性