

201423005B

厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服実用化研究事業(肝炎等克服緊急対策研究事業))

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの 病態解明及び治療法の開発等に関する研究

(H24-肝炎-一般-006)

平成24-26年度 総合研究報告書

研究代表者 **小池和彦**

東京大学医学部消化器内科学 教授

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業
(肝炎等克服緊急対策研究事業)

**C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び
治療法の開発等に関する研究**

(H24－肝炎－一般－006)

平成 24 ～ 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小池 和彦
東京大学医学部消化器内科 教授

平成 27 (2015) 年 3 月

まえがき

肝細胞癌へ進展する慢性肝疾患は、我が国の保健行政、医療の最大の問題であり、現在でもなお年間 3 万 4 千人が肝癌で死亡している。C 型、B 型肝炎に関連した肝癌が多くを占めるが、最近では、C 型、B 型肝炎ともに陰性である『非 B 非 C 型肝癌』の増加傾向が見られ、対策確立が急務である。非 B 非 C 型肝癌の中では、アルコール性肝硬変 (ASH) 合併肝癌に加え、肥満、代謝異常と関連とする非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 合併肝癌の増加が著しい。また、糖尿病患者では肝癌が多いが、高リスク患者は不明である。アルコール摂取量からは ASH と NASH のどちらにも属さない非 B 非 C 型肝癌の存在と増加も大きな問題である (非 ASH 非 NASH 非 B 非 C 型肝癌)。また、C 型肝炎関連肝癌においては、肥満、糖・脂質代謝異常という代謝関連異常が肝癌発生の促進因子であることが示されてきている。そこで、C 型肝炎、NASH、非 ASH 非 NASH の非 B 非 C 型肝疾患に関連する肝癌を、「代謝関連肝癌 (Metabolism-associated liver cancer, MALC)」として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝発癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝発癌制御を試みた。

3 年間の研究の結果、1) C 型肝炎肝発癌における代謝因子の重要性の解明、2) NASH の実態解明、病態解析、3) NASH、ASH の診断基準を満たさない非 ASH 非 NASH 非 B 非 C 型肝癌の実態解明、病態解析、4) 糖尿病患者に発生する肝癌の病態解明、を中心として臨床と基礎の両面からの検討を行ない、報告書に記載したごとく多くの成果を挙げることができた。

本報告書では、3 年間の研究の成果を記させていただいた。多くの疑問点が解明されたと考えている。まだ、いくつかの積み残された疑問点が存在するが、それは今後また検討されていくことを期待する。

最後に、本研究に貢献いただいていた研究分担者ならびに研究協力者の方々、また外からこの研究を支えて下さった多くの方々に、心から篤く御礼申し上げます。

平成 27 年 3 月

研究代表者 小池 和彦
東京大学医学部消化器内科

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）

「C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究」班

平成24～26年度 班の構成

小池 和彦	東京大学医学部 消化器内科・教授
岡上 武	大阪府済生会吹田病院・院長
橋本 悦子	東京女子医科大学消化器内科・教授
田中 真二	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・准教授
西原 利治	高知大学教育研究部医療学系医学部門臨床医学系消化器内科・教授
植木浩二郎	東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科・准教授
芥田 憲夫	虎の門病院肝臓センター・医長
川口 巧	久留米大学医学部消化器疾患情報講座・講師
松浦 善治	大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野・教授
勝二 郁夫	神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野・准教授
森屋 恭爾	東京大学医学部感染制御学・教授
建石 良介	東京大学医学部消化器内科・特任講師

目 次

I. 総括研究報告

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び
治療法の開発等に関する研究

小池 和彦 1

II. 分担研究報告

1. NASH と C 型肝炎の病態形成における臨床病理学のおよび
遺伝的要因に関する研究 28
岡上 武
2. 非アルコール性脂肪性肝障害を基盤とした肝細胞癌に関する
病理組織学的検討 34
橋本 悦子
3. HCV および NASH による代謝パスウェイ異常と
肝細胞癌の関連解析 45
田中 真二
4. 本邦における NASH 肝硬変の頻度と肝発癌における
PPAR- α の役割に関する研究 52
西原 利治
5. インスリン抵抗性と NASH 病態の分子機構の解明に関する研究.... 57
植木浩二郎
6. C 型肝炎肝発癌における代謝要因・ウイルス要因の影響 61
芥田 憲夫
7. 消化管ホルモンが肝代謝と肝発がんに及ぼす影響 66
川口 巧
8. HCV の感染性粒子産生に關与するアポリポ蛋白質..... 74
松浦 善治
9. HCV 感染培養系による C 型肝炎関連肝がんと代謝因子の解析 81
勝二 郁夫
10. C 型肝炎関連肝癌と代謝因子 88
森屋 恭爾

11. 肝細胞癌発生予後に係る代謝関連因子に関する研究	92
建石 良介	

III. 研究成果に関連した刊行物（総説抜粋）	73
--------------------------------------	-----------

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び 治療法の開発等に関する研究

総括研究報告書

肝細胞癌へ進展する慢性肝疾患は、我が国の保健行政、医療上の最大の問題であり、現在でもなお年間3万人余が肝細胞癌（肝癌）で死亡している。C型、B型肝炎に関連した肝癌が多くを占めるが、最近では、C型、B型肝炎ともに陰性である『非B非C型肝炎』の増加傾向が見られ、対策確立が急務である。非B非C型肝炎の中では、アルコール性肝硬変（ASH）合併肝癌に加え、肥満、代謝異常と関連とする非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）合併肝癌の増加が著しい。また、糖尿病患者の癌では肝癌が最も多いが、高リスク群の設定はできていない。アルコール摂取量からはASHとNASHのどちらにも属さない非B非C型肝炎の存在と増加も大きな問題である（非ASH非NASH非B非C型肝炎）。また、C型肝炎関連肝癌においては、肥満、糖・脂質代謝異常という代謝関連異常が肝癌発生の促進因子であることが示されてきている。そこで、C型肝炎、NASH、非ASH非NASHの非B非C型肝炎疾患に関連する肝癌を、「代謝関連肝癌（Metabolism-associated liver cancer, MALC）」として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、これらの疾患の病態解明を試みた。班全体研究として、日本における非B非C型肝炎の実態調査を行なった。16の臨床データを用いた階層別クラスタリングによって非B非C型肝炎は5つのカテゴリーに分別できた。近年の増加はカテゴリー1（高齢中等度飲酒男性）、5（非飲酒メタボリック男性）によるものであった。すなわち、従来考えられてきた「高度飲酒」群や「NASH」とは異なったカテゴリーの、より一般的といえる「軽度肥満、軽度～中等度飲酒」の男性が肝癌のリスクに曝されていることが初めて明らかとなった。また、個別研究としては、遺伝子 *patatin like phospholipase containing 3 (PNPLA3)* は type 4 NASH に特異的であり、かつ発癌感受性遺伝子である事、また、この *PNPLA3* 遺伝子が C型肝炎の発生に関与していることをはじめとして、C型肝炎、NASH、NAFLD、アルコール性肝癌に関する多くの成果を挙げることができた。我が国の今後の肝疾患診療、保健行政において大きな貢献を果たすことができた。

A. 研究目的

肝細胞癌へ進展する慢性肝疾患は、我が国の保健行政、医療の最大の問題であり、なお年間3万4千人が死亡する。C型、B型肝炎に関連した癌が多くを占めるが、両者陰性の「非B非C型肝炎」の増加傾向があり対策確立が急務である。非B非C型肝炎の中では、アルコール性肝硬変(ASH)合併肝癌に加え、肥満、代謝異常と関連とする非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)合併肝癌の増加が著しい。糖尿病では肝癌が多いが高リスク患者は不明である。飲酒量ではASHとNASHのどちらにも属さない非B非C型肝炎の増加も問題である(非ASH非NASH非B非C型肝炎)。一方、C型関連肝癌においては、肥満、糖・脂質代謝異常という代謝関連異常が肝癌発生の促進因子である。そこで、C型肝炎、NASH、非ASH非NASHの非B非C型肝炎疾患に関連する肝癌を、代謝関連肝癌(Metabolism-associated liver cancer, MALC)として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝癌制御を試みる。具体的には、1) C型肝炎における代謝因子解明と発癌抑制法確立、2) NASHの実態解明、病態解析と発癌抑制法確立、3) 非ASH非NASH非B非C型肝炎の実態解明、病態解析、高リスク群の設定、4) 糖尿病に発生する肝癌の病態解明と高リスク群設定、を臨床と基礎の両面から検討を行なう。

研究代表者小池は、H23年度まで『肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用に関する

包括的研究』班でウイルス肝炎における代謝性変化の発生機序と肝癌に対する影響を検討した。その結果、C型肝炎では、インスリン抵抗性や肝脂肪化が慢性肝炎進行を促進することを明らかにした。一方、小池が分担研究者であった『非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、治療法の開発に関する研究』班(H20～H22年度、研究代表者岡上武)では、日本にNASHが多く存在し、肝癌の原因であることを明らかにした。これらの先駆的な研究班の成果を受けて、本研究班においてはC型肝炎肝癌における代謝要因の解析、NASHの病態解析、非ASH非NASH非B非C型肝炎の解析を行ない、これらの肝癌発生の抑制を図った。

B. 方法

(省略)

倫理面の配慮

本研究の研究内容はヘルシンキ宣言に準じており、久留米大学倫理委員会にて承認を受けている。患者を対象とした研究では、参加者より書面により同意を得ている。また、通常の日常診療における医療従事者が行うべき守秘義務に加え、個人が識別できる情報は、暗号化し、プライバシーの保護に留意した。本研究により得られたデータは本試験の目的以外には利用していない。

動物実験では、「動物の愛護および管理に関する法律」、「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に基づき実験を遂行し

た。屠殺は「動物の殺処分方法に関する指針」準拠して、可能な限り処分動物に苦痛を与えない方法を用いた。

C. 結果

1) (1)当初 NAFLD529 例に網羅的遺伝子関連解析(GWAS)を行い *PNPLA3* の rs738409 の SNP(I148M)が NASH 発症・進展感受性遺伝子と報告したが、Matteoni type 3 の症例数が少なかったため(PLoS ONE 2012)、今回 NASH 肝癌 58 例を含む NAFLD397 例を追加し、888 例 NAFLD (control2525 例)と 58 例の NASH 肝癌で GWAS を行った。その結果 I148M は type 4 NASH に特異的 (p -value 1.34×10^{-29} , HWE $p < 10^{-7}$)かつ発癌感受性遺伝子である事が判明した(p -value 1.7×10^{-9}) (論文作成中)。

(2)I148M は C 型肝炎の線維化、脂肪蓄積にも関与している事も明らかになった。

(3)肝生検で診断した NAFLD280 例での proteome, metabolome 解析から、NAFL と NASH で有意差のある血清生化学的マーカーが複数みつたっており、それらを組み合わせて現在その鑑別法を作成中である。

(4)5642 例の糖尿病患者のフォローが約 5 年経過しており、肝発癌症例もかなりみられ、現在肝発癌を中心に長期予後を解析中である。

(岡上 武)

2) 検討 1. NAFLD-HCC と C 型肝炎ウイルス感染に関連する HCC (HCV-HCC)の比較：臨床背景では、BMI、肥満(BMI \geq 25)・II 型糖尿病(DM)・脂質異常症 (DL)の合併率はいずれも NAFLD-HCC で高く、高血

圧 (HTN)では両群に差が無かった(表 1)。

HCC 主腫瘍径は、NAFLD-HCC で中央値 40mm に対し HCV-HCC で 20mm と、NAFLD-HCC で高値であった。分化度は両群とも中分化が約 70%と最多であった。高分化型のうち、内部に中分化結節を含む nodule in nodule 型を呈した症例が NAFLD-HCC では 7 例含まれ、HCV-HCC の 3 例に対し高率であった。組織型は、両群とも索状型が約 70%と最も多かった。

SH-HCC の頻度は 50%に対し 20%と NAFLD-HCC で高率であった。各特徴的所見の出現頻度では、steatosis, ballooning, Mallory 体、pericellular fibrosis の全項目が NAFLD-HCC で有意に出現率が高かった。

免疫組織染色では、早期 HCC 関連マーカーと肝前駆細胞関連マーカーは NAFLD-HCC と HCV-HCC 両群間に差は無く、癌幹細胞・細胞分化増殖関連因子では、癌部での陽性率が NAFLD-HCC と HCV-HCC 群間で異なったのは Nanog のみで、NAFLD-HCC で陽性率が高く、結節内の全癌細胞の 50%以上が陽性の 6 例はいずれも NAFLD -HCC で、全例 SH-HCC であった。

検討 2. 典型的 SH-HCC 症例と標準 HCC 例の比較：臨床背景では、SH-HCC 群は標準 HCC 群に比し、背景とする肝疾患としてアルコール性肝障害と NAFLD が多く (合計で SH-HCC の 95% vs. 標準 HCC の 25%)、肥満あるいは生活習慣病を高率に合併 (SH-HCC での合計合併率 100% vs. 標準 HCC での 60%) し、BMI も高値であった。

原因別全症例中の SH-HCC の割合では、NAFLD の 37%、ALD の 12%が典型的 SH-HCC であり、肝炎ウイルス感染を基盤とする HCC では、典型的 SH-HCC の合併率は 1%未満と低率であった。

SH-HCC と標準 HCC の肉眼所見・非癌部組織・癌部の分化度・組織型の比較では、SH-HCC は発癌時主腫瘍径が有意に大きく（中央値 35mm vs. 20mm）、非癌部における steatohepatitis 合併率が高率（85% vs. 10%）であった。脈管浸潤合併は 40% vs. 35%、胆管浸潤合併は 10% vs. 10%と両群で有意差は無かった。

癌部の免疫組織染色陽性率の比較では、Nanog 陽性率が SH-HCC 群で高く（80% vs. 20%）癌部の強陽性例は SH-HCC 群の 5 例のみであった。

SH-HCC と標準 HCC の無再発生存率では、5 年無再発生存率に有意差はなかった（52% vs. 41%, $p=0.453$ ）。注目すべき事項として、初回肝切除術施行時の主腫瘍径が 50mm 以上で術後 5 年以上無再発生存例は、SH-HCC の 3 例のみであった。

（橋本悦子）

3) 症例は B 型肝炎 101 例、C 型肝炎 286 例、重複感染 4 例、NBNC 164 例であった。NBNC 肝癌は C 型肝炎に比べて有意に男性に多く（ $p=0.0039$ ）、B 型肝炎に比べて高齢発症であり（ $p=0.031$ ）、背景肝は肝硬変が少なかった（ $p=0.0003$ ）。腫瘍因子では腫瘍径は大きいにも関わらず（ $p<0.001$ ）、有意に AFP が低値であった（ $P=0.001$ ）。NBNC 肝癌の予後は、B 型肝炎・C 型肝炎に比べて無再発生存期間、全生存期間とも有意に良好であった（ $p<0.005$ ）。また B 型肝炎、C 型

肝癌、NBNC 肝癌の代謝関連因子の合併は、肥満(BMI30 以上; 1%, 3%, 8.3%)、糖尿病 (13.3%, 17.2%, 49.4%)、高血圧(20%, 45.5%, 61%)、高脂血症(11.4%, 17.2%, 25.6%)、アルコール多飲(70g/day 以上; 30.5%, 33.8%, 49.4%)の全てにおいて NBNC 肝癌で頻度が高かった（ $p<0.005$ ）。NBNC 肝癌症例の網羅的遺伝子発現解析の結果、肥満度および糖尿病と正相関する非癌部発現遺伝子群として、90 遺伝子を抽出した。その遺伝子機能パスウェイ解析では細胞接着、細胞骨格、インテグリンシグナル、血管発生などと有意な相関を認め（ $p<0.01$ ）、発現および機能の検証によって *SLAMF7*, *CTGF*, *ITGBL1*, *LIMA1* の 4 遺伝子を抽出した。培養ヒト肝癌細胞を用いた 4 遺伝子の発現解析では、糖およびインスリン付加によって相乗的に *CTGF* 遺伝子が発現亢進することを見出した。遺伝子導入によって作成したヒト *CTGF* 高発現株では *in vitro* 増殖能には変化を認めなかったが、網羅的遺伝子発現解析・パスウェイ解析によってケモカイン関連遺伝子群の高発現と相関することを見出した（ $p<0.0001$ ）。*CTGF* 高発現株は *in vitro* マクロファージ遊走能、NF- κ B 活性化を惹起することを確認した。*CTGF* 高発現株を用いた *in vivo* 同所性肝腫瘍モデルでは、腫瘍増殖の亢進（ $p=0.032$ ）および集簇マクロファージの NF- κ B 活性化を検出した（ $p=0.02$ ）。さらに肝癌臨床検体を用いた病理組織学的解析の結果、糖尿病と肥満を有する症例の非癌部肝細胞および星細胞に *CTGF* 蛋白が有意に高発現し（ $p=0.049$ ）、*CTGF* 陽性糖尿病症例では非癌部肝のマクロファージ・クッパー細胞に

における NF- κ B 活性化を認めた ($p=0.01$)。非癌部 CTGF 陽性症例は陰性症例に比べて、有意に無再発生存率が低下した($p=0.041$)。

(田中真二)

4) 本研究では 2009 年度検診受診者における非アルコール性脂肪性肝疾患の有病率が男性で 41.0%、女性で 17.7%であり、肥満と高 LDL-C 血症が重要な誘因であることを明らかにした。NASH 肝硬変の予備群と評価された検診受診者は 2~3%であり、簡便性から BAAT index や FIB-4 による肝硬変予備群の検出と二次検診受診勧奨の必要性が確認された。

次に、遺伝性 NASH のモデル動物である MC4R 欠損マウスではヒトと同様に肝線維化が伸展し、肝発癌が生じることを明らかにした。また、肝の線維化は中心静脈から 200 μ m 近傍に最初に生じ、肝小葉の中心と辺縁の双方向に肝細胞周囲性に線維の伸展を認めることを明らかにした。

さらに、PPAR- α の欠損 MC4R 欠損マウスを創出し、NASH 肝発癌の頻度が低下することを示し、脂肪肝による慢性的な PPAR- α の活性化が NASH 肝癌の誘発に重要であることを証明した。

(西原利治)

5) ①野生型マウスでは、摂食により ER ストレスが生じること、その際 ER ストレス関連分子 (コシャペロン) Sdf211 が誘導され、ER ストレスを終息させることを見いだした。db/db マウスでは、ER ストレスが亢進してインスリン抵抗性や脂肪肝を生じているが、Sdf211 をアデノウイルスで過剰発現させると、これらが改善した。②肝臓特異的 Sdf211 ノックアウトマウスは、耐

糖能障害を呈しており、肝臓の脂肪蓄積も増加していた。また、ノックアウトマウスの初代幹細胞では、ツニカマイシン刺激による ER ストレス反応が亢進・遷延していることが分かった。③糖尿病患者の肝臓では、XBP-1, BIP, CHOP, Sdf211 など ER ストレスの終息シグナルの発現が低下しているほど、NASH の進展が認められた。④インスリンやフロリジンの治療で、STAM マウスの NASH 進展が抑制されることが判明した。

(植木浩二郎)

6) (検討 1) aa70 Mutant 定量値が増加している症例では *IL28B* rs8099917 non TT の頻度が高く、肝線維化進行例(FSC4)の頻度も高くなる傾向が確認され($P<0.001$; Chi-squared test)、aa70 Mutant 定量は宿主要因と関連しながら経時的に変化する可能性が示唆された。更に、aa70 Mutant 定量値の増加に伴い AFP 値も増加する傾向が確認され($P=0.003$; Kruskal Wallis test)、aa70 Mutant 定量は肝発癌の一指標として有用な可能性が示唆された。(検討 2) HCV RNA 持続陽性の状態からの肝発癌例における aa70 Mutant 定量中央値の推移は、発癌 10 年前 30%、発癌 5 年前 65%、発癌 1 年前 80%。肝発癌例の aa70 Mutant 定量値は経時的に増加傾向を示した。この様に定量法で経時的に定量推移を評価することが肝癌危険群の早期指摘に有用な可能性がある。初診時背景因子の中で、総コレステロール高値($P=0.059$)、LDL コレステロール高値($P=0.007$)、HDL コレステロール低値($P=0.012$)、BMI 高値($P=0.035$)の症例では aa70 Mutant 変化量が大きい傾向が確

認された(Chi-squared test)。特に、初診時 BMI は aa70 Mutant 変化量と正の相関を示す傾向が確認された($r=0.539$, $P=0.001$; Spearman rank correlation test)。この様に脂質要因が aa70 Mutant 変化量に影響する可能性が示唆された。SVR 後に肝発癌した症例における aa70 Mutant 定量中央値の推移は、SVR5 年前 45%、SVR 直前 95%。SVR 後肝発癌例の aa70 Mutant 定量値も経時的に増加傾向を示した。SVR 前で最終治療時の HDL コレステロール値は aa70 Mutant 定量値と負の相関を示す傾向が確認された($r=-0.824$, $P<0.001$; Spearman rank correlation test)。更に、肝発癌までの期間に影響する要因を検討すると、空腹時血糖が高い症例($P=0.004$)、aa70 Mutant 定量が多い症例($P=0.045$)で肝発癌までの期間が短い傾向にあった(Mann-Whitney U test)。この様に代謝要因とウイルス要因が SVR 後肝発癌例の発癌期間に影響する可能性が示唆された。

(芥田憲夫)

7) 検討①肝疾患の病期進展と活性型グレリンの関連：HBV 群および HCV 群の両群において、活性型グレリン値は、肝疾患の病期進展とともに有意に低下した(図1 点線)。慢性肝疾患における層別解析では、HCV 群の活性型グレリン値は NAFLD 群もしくは HBV 群と比較し有意に低値であった。また、肝硬変 Child-Pugh grade A における層別解析においても、HCV 群の活性型グレリン値は HBV 群と比較して有意に低値であった。

検討②Exendin-4 による NASH モデルマウ

ス体重と肝の肉眼所見の変化：コントロール群の体重は徐々に増加し、14 週齢で約 50 g となった。一方、Exendin-4 群は 7 週齢より体重はほぼ増加せず、14 週齢で約 40 g とコントロール群と比較し有意に低値であった。Exendin-4 群の肝臓は、コントロール群の肝臓と比較して、褐色調であった。

Exendin-4 による肝組織所見、肝組織中の中性脂肪含量、および NAFLD activity score の変化：Exendin-4 群およびコントロール群ともに著明な肝線維化は認めなかったが、Exendin-4 群における肝小葉内の炎症、肝細胞内の脂肪蓄積や肝細胞風船様変化は、コントロール群と比較して抑制されていた。Exendin-4 群における NAFLD activity score はコントロール群と比較して有意に低値であった。

検討③Sitagliptin による NASH 関連肝がんモデルマウスの肝腫瘍に及ぼす影響

Vehicle 群と Sitagliptin 群の間で、肝腫瘍が発生したマウス個体数に有意差は認めなかったが、Sitagliptin 群の腫瘍数と腫瘍容積は Vehicle 群と比較して有意に低値であった。

(川口 巧)

8) VLDL 産生系に関わる宿主因子であるアポリポ蛋白質 A (ApoB) や ApoE 等の肝臓特異的因子が HCV の粒子産生に関わっていることが示唆されてきた。HCV の粒子産生における肝臓特異的因子の発現の意義を明らかにするために、AFP を産生する癌細胞株をスクリーニングし、HCV の感染性を評価した。その結果、肝細胞由来の JHH4 細胞と胃癌由来の FU97 細胞で肝細胞癌株と同等レベルで肝臓特異的

な因子を発現しており、高い HCV の粒子産生能を保持していることが示された。さらにアポリポ蛋白質の役割を詳細に解明するために、ApoB と ApoE 遺伝子を同時に欠損させた Huh7 細胞を作製したところ、HCV の感染性粒子産生が顕著に抑制された。肝組織と Huh7 細胞でアポリポ蛋白質の発現を比較すると、Huh7 細胞では ApoB と ApoE 以外のアポリポ蛋白質の発現が肝組織よりも低いことが明らかになった。さらに、ApoB と ApoE 遺伝子のダブルノックアウト細胞に ApoA や ApoC を発現させると HCV 粒子の産生を回復できることから、ApoA や ApoC も粒子産生に関与することが示唆された。アポリポ蛋白質の 2 次構造解析から、HCV の粒子産生を可能にするアポリポ蛋白質には共通した両親媒性の α ヘリックスが存在し、この α ヘリックスの発現によっても、HCV 粒子の産生が回復することから、アポリポ蛋白質の両親媒性の α ヘリックスが HCV の粒子産生に関与することが示された。さらに、遺伝子型 1 や 3 と JFH1 とのキメラ HCV を用いても同様の現象が確認されたことから、各遺伝子型に共通して、感染性粒子産生にアポリポ蛋白質が関与していることが示唆された。

(松浦善治)

9) C 型肝炎ウイルス(HCV)感染培養系を用い、HCV による代謝因子の変化とその分子機構を解析した。HCV 感染肝細胞では HNF-1 α の転写抑制と HNF-1 α 蛋白質のライソソーム依存性分解が促進され、1) GLUT2 の発現抑制と 2) L-FABP の発現抑制が起こり、糖代謝、脂質代謝異常に関

与することが示唆された。HCV NS5A と HNF-1 α の結合には NS5A の Val¹²¹、HNF-1 α の POU_s ドメインが必須である。また NS5A 阻害剤 Daclatasvir が NS5A 依存性 HNF-1 α 分解を阻害し、HCV による代謝異常を改善する可能性が示された。メタボローム解析では、HCV 感染時には核酸合成の上昇、TCA 回路を介したエネルギー獲得経路の抑制、アミノ酸変動を介した有機酸合成の促進が起こることが示された。また、肝細胞内の脂肪滴を調節する宿主因子の発現変化を解析したところ、Itch ユビキチンリガーゼの活性化、Adipophilin 蛋白質の減少を認めた。脂肪滴の足場蛋白 Spartin の切断が脂肪滴増大化に関与することが示唆された。

(勝二郁夫)

10) C 型肝炎と NASH(非アルコール性肝炎)において肝発癌と治療において脂質、糖質、アミノ酸、鉄代謝の重要性が認識されている。①回胆汁酸代謝、腸管分泌ホルモンインクレチンの発癌抑制作用について検討し、UDCA は肝腫瘍マーカーである SCD mRNA の抑制ならびに膵臓において GLP1-R mRNA 発現増加をもたらす肝発癌抑制とともにインクレチン signaling 増強をもたらす可能性が示唆された。②DPP4 inhibitor は TGR5 mRNA 増加ならびに脂肪組織抗炎症作用と補完的作用をもたらす可能性が示された。さらに併用により VEGF 発現抑制がもたらされることが示された。また HCV core 蛋白発現細胞の検討から core 蛋白が ca uniporter を介して肝細胞ミトコンドリア膜に鉄を輸送しミトコンドリア障害と fenton 反応により間接的活性酸素を発生することを示した。

(森屋恭爾)

1) 近年増加しつつある非ウイルス性肝細胞癌の背景因子、病態、予後を特に代謝関連因子に着目して検討した。平成 24 年度には通院中の糖尿病および高血圧患者を対象とし FibroScan®による肝硬度測定および肝脂肪量の測定を開始した。平成 25 年度には全国 55 の第 3 次医療機関において 1991 年～2010 年までに診断された非 B 非 C 型肝細胞癌 5633 症例を収集し、階層化クラスタリングの手法を用いて 5 つのカテゴリーに大別した。平成 26 年度には、体組成の構成要素である骨格筋量、内臓脂肪量、皮下脂肪量、筋内脂肪量を測定し、肝癌治療後の予後との関係を検討した。非 B 非 C 肝癌においては、肥満・糖尿病・脂肪肝を背景とした代謝関連肝癌が大半を占めることをあらためて明らかにするとともに、これらの発生母体であるコホートを設定し、長期経過を観察するプラットフォームを確立できた。また、体重減少だけでなく筋肉量の維持・増強がこれら肝癌患者の予後向上に役立つ可能性を見出した。

(建石良介)

D. 考察

1) Matteoni らは NAFLD を組織学的に 4 つの type に分類し、予後の解析から type 1,2 が NAFL で type 3,4 が NASH と分類した。NAFLD の 20%前後が NASH に進展すると言われ、進行した NASH からはしばしば肝癌が発症する。しかし、NAFLD から NASH へ進展や NASH 発症・進展、NASH 肝発癌における遺伝的要因は充分明らかにされていない。今回肝生検で診断した

多数例の NAFLD を組織学的に 4 つのタイプに分類し GWAS を行い、遺伝的には type 3 は type1, type 2 と同じで、典型的な NASH である type 4 の発症・進展と肝発癌のみに *PNPLA3* の rs738409 の SNP が深く関与していることが明らかになった。また C 型肝炎では 50%前後に脂肪蓄積が見られ、脂肪蓄積は線維化進展例に多いが、*PNPLA3* (rs738409) の SNP が C 型肝炎における脂肪蓄積と線維化進展に関与していることが明らかになった。

また、糖尿病患者では高頻度に肝障害を合併し、その多くが NAFLD であるが、糖尿病患者の長期予後に及ぼす NAFLD の影響は十分に明らかでない。5642 例の糖尿病患者をフォローしており、NAFLD からの肝発癌や糖尿病患者の長期予後に及ぼす NAFLD の影響を検討中である。また metabolome 解析、proteome 解析から、NAFL と NASH の血液生化学的鑑別法も作成中である。

(岡上 武)

2) SH-HCC 典型例は NAFLD-HCC の 36%、ALD-HCC の 12%、HCV-HCC の 1%に認められた。SH-HCC の背景肝疾患は脂肪性肝疾患が主体であり、肥満・生活習慣病が関与する可能性が示唆された。SH-HCC は標準 HCC に比し、主腫瘍径が大きいにもかかわらず脈管浸潤・胆管浸潤は同程度で、術後無再発生存率は同等であったが、直径 50mm 以上の術後 5 年無再発例および癌部 Nanog 高発現例は SH-HCC 典型例でのみ認められた。今回の自験例の検討でも HCC 無再発生存率は SH-HCC 典型例と標準 HCC 例とで差異を認めなかつ

た。しかし、主腫瘍径は標準 HCC より有意に大きいものにも拘わらず、脈管浸潤と胆管浸潤、HCC 無再発生存率が同等であったこと、巨大 HCC 術後無再発例の存在、Nanog 発現の差異などから、癌腫としての動態が通常 HCC とは異なる可能性も示唆される。SH-HCC 典型例を多数例集積し、再発や予後など生物学的動態に関連する事項を中心に、更なる検討が必要と考える。

(橋本悦子)

3) NBNC 肝癌症例は代謝関連因子と相関が高く、網羅的遺伝子発現解析の結果、ウイルス性肝癌と異なった特異的遺伝子機能異常が内在している可能性が示された。本研究では糖尿病および肥満と正相関する非癌部遺伝子群から、培養細胞を用いた検証によって代謝関連遺伝子として CTGF を同定した。CTGF (connective tissue growth factor) は線維化、炎症など間質反応に関与する CCN ファミリーに属する分泌タンパクであり (*J Cell Biol* 1991)、我々は遺伝子クローニングによって CCN ファミリーが癌進展に関与することを報告している (Tanaka et al. *Oncogene* 1999, *Gastroenterology* 2002, 2003, *Hepatology* 2003)。CTGF はヒト肝癌細胞の *in vitro* 増殖能には関与しないが、ケモカイン発現亢進によってマクロファージ活性化、遊走能を促し、*in vivo* 解析ではオートクラインよりもむしろパラクライン機序によるマクロファージ活性化を伴った肝癌腫瘍の有意な増殖促進が示唆された。さらに臨床検体を用いた検証によって非癌部肝 CTGF 蛋白発現と肝癌再発が有意に相関することが示されており、NBNC 代謝関連肝癌の再発予

測バイオマーカーとして有用であるばかりでなく、治療標的となりうる可能性が示唆された。今後、糖尿病による肝組織での CTGF 発現機序および癌微小環境相互作用の解明に加え、大規模臨床検体を用いた validation study が必要である。

(田中真二)

4) MC4R 遺伝子に異常が生じるとマウスでもヒトと同様に幼児期より高度肥満を呈する。MC4R 遺伝子変異を持つこれらの症例は遺伝性 NASH を発症し、しばしば肝硬変で死亡することが知られている。従って、この遺伝性疾患を研究すれば非遺伝性 NASH で観察される代謝異常に近い病態を知ることができるのではないかと考えられる。今回、中心静脈周囲性の肝細胞を取り囲む特徴的な pericellular fibrosis がどのように形成されるか、MC4RKO マウスであきらかになったので、この成績がヒトに外挿可能であれば、pericellular fibrosis を標的とする治療法の開発は NASH 治療の新たな option に繋がるのではないかと考えられた。

(西原利治)

5) これまでの検討から、Sdf2l1 は、肝臓において BIP と協調して、ER ストレスを終息させると考えられる。その発現誘導は、肝臓でのインスリンシグナルが十分にあることが必要であり、Sdf2l1 の発現低下がインスリン作用を低下させるという悪循環を形成していることが、マウスおよびヒト検体の解析から示唆された。糖尿病 NASH モデルマウスについては、血糖値の改善が NASH の進展を抑制していることが示唆され、肝癌進展の抑制には肝臓での適正なイ

ンスリン作用の改善も必要である可能性も示唆された。

(植木浩二郎)

6) トランスジェニック・マウスによる動物実験では HCV core 蛋白による肝細胞脂肪化・インスリン抵抗性といった脂質/糖代謝への影響やそれらを介した肝発癌への影響が報告されてきた。当施設の検討は、このような基礎的な検討を臨床面から支持する成績であるといえる。今回の肝発癌例のみの検討では、肝発癌の 10 年前より既に aa70 Mutant 定量値が増加傾向を示し、その変化量には代謝要因の関与が示唆された。更に、SVR 後発癌例でもウイルス排除前の aa70 Mutant 定量値は経時的に増加傾向を示し、代謝・ウイルス要因が肝発癌期間に影響する可能性が示唆された。この様な、ウイルス排除前の Core アミノ酸置換の状態が SVR 後肝発癌にまで影響するという成績は、イニシエーターとしての HCV が排除される前段階で既に aa70 Mutant の症例では肝発癌の素地が出来上がっている可能性を示唆する所見と思われる。即ち、Core アミノ酸置換は肝発癌の Surrogate marker としての役割を担っている可能性があるといえる。今後は、aa70 Mutant 定量値の推移に影響している代謝要因も加味しながら総合的にウイルス・代謝・宿主要因と肝発癌との関係性を評価していく必要がある。更に、今回の検討はあくまで肝発癌例のみの検討であるため、今後は更に症例数を増やして、非発癌例における aa70 Mutant 定量値の経時変化の経過とも比較していく必要がある。

(芥田憲夫)

本研究により、①HCV 感染が血漿活性型グレリン値低下の危険因子であること、② GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 は、NASH モデルマウスの肝障害を抑制すること、③DPP4 阻害剤である sitagliptin は NASH 関連肝がんマウスモデルにおける肝発癌に対し抑制的に作用することが明らかになった。本研究結果より、消化管ホルモンは、代謝性肝疾患の病態に関与するだけでなく、GLP-1 シグナリングの制御が代謝関連肝がんの新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

(川口 巧)

7) 今回の検討により、ApoA、ApoB、ApoC および ApoE が両親媒性の α ヘリックスとウイルス粒子の結合を介して、HCV の感染性粒子の産生を可能にしていることが明らかとなった。相補的な機能をお互いに保持することから、アポリポ蛋白は抗ウイルス治療の標的に成り難い。また、ApoA と ApoE はそれぞれ HDL および VLDL に高い特異性を持って結合するが、HCV 粒子産生においては、ApoA も ApoE も同様の機能を保持していた。今後は、アポリポ蛋白がどのような機構で HCV の粒子産生に関わっているのかを明らかにしたい。

(松浦善治)

8) HNF-1 α 不活化による肝アデノーマで HNF-1 α の標的遺伝子の L-FABP の転写抑制が起こり、著明な肝脂肪化、糖代謝異常が起こることが知られている。HCV 感染ではライソソーム依存性に HNF-1 α の分解が促進される。それに伴い L-FABP の転写抑制が起こり、蛋白レベルでも著明な減少をした。L-FABP は脂肪酸と結合し、

脂肪酸を細胞内の脂肪滴、ペロキシソーム、ミトコンドリアなどに輸送する。L-FABPの発現量が著明に減少すると脂肪酸の輸送に障害が起こると考えられ、これが脂肪滴の貯留や肝脂肪化につながると考えられた。L-FABP量をsiRNAによりノックダウンさせると、感染性ウイルス粒子の産生量が上昇した。これはL-FABPの減少はHCV感染性粒子の産生に有利であることを示唆しており、HCVがHNF-1 α の量を減少させ、L-FABP量を減少させることにより、ウイルス産生に有利な環境を作っていることが示唆された。L-FABPのウイルス産生における役割については、今後さらに解析する必要がある。HCV NS5AのVal121がHNF-1 α との結合および分解に重要であることが示された。以前、NS5A Val121がFKBP8との相互作用に重要でHCV複製制御に深く関与することが報告されているが、同じアミノ酸が別の宿主因子HNF-1 α との相互作用にも必須であり、病原性に関わることが示唆された。また、NS5A阻害剤のDaclatasvirはHCV複製を抑制し、HNF-1 α の量は回復するので、NS5A-HNF-1 α を介した代謝異常にDaclatasvirが有効であることが示唆された。今後、臨床的にDaclatasvir使用で糖脂質代謝が改善するか解析する必要がある。

(勝二郁夫)

9) HCV core 蛋白と mitochondria 内の鉄による酸化ストレス増大機序が示されHCV 発癌抑制薬剤の候補が得られた。

(森屋恭爾)

10) 低体重群では、内臓肥満や筋内脂肪が少ない一方で、予後不良のサルコペニア

が多く含まれることで、通常体重群よりも予後が悪くなっていることが考えられる。

(建石良介)

10) 自己評価

達成度について：当初設定した目標について、ほぼ各項目について3年間の目標通りに研究が遂行されたと考える。「抑制法の開発」については更なる検討が必要である。研究成果の学術・国際・社会的意義について：全国的な非B非C型肝癌の増加の中、代謝関連肝癌として捉えて研究、診断、治療を行なうというコンセプトのもつ社会的な意義は大きいと考えられる。

今後の展望について：代謝関連肝癌(MALC)に関して、臨床データ、基礎実験を通じて、発癌機序の解明、抗リスク群の設定等、早期発見、早期治療に向けた取り組みの成果が期待される。

11) 結論

非B非C型肝癌の階層化クラスタリング解析よって、従来言われているNASHやアルコール性肝硬変以外に肝機能正常・高齢男性や肥満と飲酒のリスクを併せ持つ集団など新たな背景集団を抽出することができた。C型肝炎、NASH、非ASH非NASHの非B非C型肝疾患に関連する肝癌を、「代謝関連肝癌(Metabolism-associated liver cancer, MALC)」として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝発癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝発癌制御が可能になると考えられた。この様な認識をもって患者の管理・治療に当ることによ

り、患者の予後、QOL を大幅に改善することが期待される。

1 2) 健康危険情報

なし

1 3) 研究発表

論文発表のみ

1. Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, Kokudo N, Tanaka S, Arii S, Yotsuyanagi H, Koike K, Itoh F. DNA methylation at hepatitis B viral integrants is associated with methylation at flanking human genomic sequences. *Genome Res* 2015 Feb 4. pii: gr.175240.114. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25653310.
2. Fujiwara N, Nakagawa H, Kudo Y, Tateishi R, Taguri M, Watadani T, Nakagomi R, Kondo M, Nakatsuka T, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Tanaka Y, Ohtomo K, Shiina S, Koike K. Sarcopenia, Intramuscular Fat Deposition, and Visceral Adiposity Independently Predict the Outcomes of Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatol* 2015 Feb 24. pii: S0168-8278(15)00141-5. Doi:10.1016/j.jhep.2015.02.031. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25724366.
3. Minami T, Tateishi R, Shiina S, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K. Comparison of improved prognosis between hepatitis B- and hepatitis C- related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2015 Jan 6. doi: 10.1111/hepr.12468. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25559860.
4. Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H,

Fujinaga H, Shinzawa S, Koike K, Horie T.

Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein.

Toxicol Appl Pharmacol 2014 Dec 26. pii:

S0041-008X(14)00442-6.

doi:10.1016/j.taap.2014.12.004. [Epub ahead of print]

PubMed PMID: 25545986.

5. Tateishi R, Okanoue T, Fujiwara N, Okita K, Kiyosawa K, Omata M, Kumada H, Hayashi N, Koike K. Clinical characteristics, treatment, and prognosis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a large retrospective multicenter cohort study. *J Gastroenterol* 2014 Jun 15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24929638.
6. Nakagawa H, Fujiwara N, Tateishi R, Arano T, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Impact of serum levels of IL-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2014 Aug 28. doi: 10.1111/jgh.12719. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25168107.
7. Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, Dhar D, Ogata H, Zhong Z, Valasek MA, Seki E, Hidalgo J, Koike K, Kaufman RJ, Karin M. ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development. *Cancer Cell* 2014;26(3):331-343. PubMed PMID: 25132496.
8. Fujiwara N, Tateishi R, Kondo M, Minami T, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Masuzaki R, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Cause-specific mortality associated with aging in patients with hepatocellular carcinoma

- undergoing percutaneous radiofrequency ablation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014 Jul 19. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25051219.
9. Fujiwara N, Tateishi R, Nakagawa H, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Slight elevation of high sensitivity C-reactive protein to predict recurrence and survival in patients with early stage hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2014 Jul 29. doi: 10.1111/hepr.12398. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25070147.
10. Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, Koike K. Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA. *Oncotarget* 2014 Jul 30;5(14):5581-90. PubMed PMID: 25026299.
11. Masaki N, Sugiyama M, Shimada N, Tanaka Y, Nakamuta M, Izumi N, Watanabe S, Tsubota A, Komatsu M, Masaki T, Enomoto N, Yoneda M, Murata K, Ito K, Koike K, Mizokami M. Pretreatment prediction of the outcome of response-guided peginterferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2014 Dec;29(12):1996-2005. PubMed PMID:24910341.
12. Mikami S, Tateishi R, Hagiwara S, Sato M, Minami T, Uchino K, Enooku K, Sato T, Nakagawa H, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Ikeda H, Omata M, Yoshida H, Koike K. Tumor markers are more useful in patients undergoing surveillance for hepatocellular carcinoma with unreliable results by ultrasonography. *Hepatol Res* 2014 May 26. doi: 10.1111/hepr.12365. [Epub ahead of print] PubMed PMID:24861870.
13. Sato M, Hikita H, Hagiwara S, Sato M, Soroida Y, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Kojima S, Matsuura T, Yotsuyanagi H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Potential associations between perihepatic lymph node enlargement and liver fibrosis, hepatocellular injury, or hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 2014 May 22. doi: 10.1111/hepr.12361. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24849617.
14. Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Fushimi K, Koike K. Variceal hemorrhage - Analysis of 9987 cases from a Japanese nationwide database. *Hepatol Res* 2014 May 14. doi: 10.1111/hepr.12357. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24827451.
15. Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. *Hepatol Res* 2014;44(10):E240-E252. PubMed PMID: 24224477.
16. Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. The impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus Infection. *Hepatol Res* 2014;44(10):E137-44. PubMed PMID: 24125181.
17. Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H. Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis

- C using multiple fibrosis markers. *Hepatol Res* 2014;44(11):1047-1055. PubMed PMID: 23941604.
18. Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K. Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2014;44(10):E32-37. PubMed PMID: 23841664.
19. Shibata C, Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Muroyama R, Kato N, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. *Virology* 2014;462-463:42-48. PubMed PMID: 25092460.
20. Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection. *World J Gastroenterol* 2014;20(11):3044-3049. PubMed PMID: 24659896.
21. Kondo M, Ishizawa T, Enooku K, Tokuhara Y, Ohkawa R, Uranbileg B, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Kokudo N, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum autotaxin levels in hepatocellular carcinoma patients were caused by background liver fibrosis but not by carcinoma. *Clin Chim Acta* 2014;433:128-134. PubMed PMID: 24642343.
22. Nguyen T, Xu J, Chikuma S, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, Koike K, Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, Kobayashi M. Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models. *Int Immunol* 2014;26(7):397-406. PubMed PMID: 24569264. doi:10.1093/intimm/dxu040
23. Kumada H, Suzuki Y, Ikeda K, Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, Ido A, Yamamoto K, Takaguchi K, Izumi N, Koike K, Takehara T, Kawada N, Sata M, Miyagoshi H, Eley T, McPhee F, Damokosh A, Ishikawa H, Hughes E. Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology* 2014;59(6):2083-2091 PubMed PMID: 24604476.
24. Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2014;135(4):871-879. PubMed PMID: 24420733.
25. 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;22(10):2347-2353. PubMed PMID: 23686523.
26. 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* 2014;49(4):748-754. doi: 10.1007/s00535-013-0826-x. PMID: 23689989.
27. 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.