

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Tsunematsu S, Chuma M, Kamiyama T, Miyamoto N, Yabusaki S, Hatanaka K, Mitsuhashi T, Kamachi H, Yokoo H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Orimo T, Wakayama K, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Tsukuda Y, Sho T, Suda G, Morikawa K, Natsuzaka M, Nakanishi M, Ogawa K, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging*. 2015 Jan 13.
2. Maeda T, Konishi K, Tanoue K, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Hashizume M. Minimally invasive image analysis of biliary-pancreatic structure for preoperative simulation. *Hepatogastroenterology*. 2014 Sep;61(134):1744-7.
3. Shibasaki S, Takahashi N, Homma S, Nishida M, Shimokuni T, Yoshida T, Kawamura H, Oyama-Manabe N, Kudo K, Taketomi A. Use of transabdominal ultrasonography to preoperatively determine T-stage of proven colon cancers. *Abdom Imaging*. 2014 Nov 16. [Epub ahead of print]
4. Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Orimo T, Wakayama K, Kamachi H, Tsuruga Y, Yamashita K, Shimamura T, Todo S, Taketomi A. Multiplication of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence-II is a powerful predictor of prognosis and recurrence in hepatocellular carcinoma patients after a hepatectomy. *Hepatol Res*. 2014 Nov 10. doi: 10.1111/hepr.12451. [Epub ahead of print]
5. Shimada S, Fukai M, Wakayama K, Ishikawa T, Kobayashi N, Kimura T, Yamashita K, Kamiyama T, Shimamura T, Taketomi A, Todo S. Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver. *Surg Today*. 2014 Nov 2. [Epub ahead of print]
6. Alam MT, Nagao-Kitamoto H, Ohga N, Akiyama K, Maishi N, Kawamoto T, Shinohara N, Taketomi A, Shindoh M, Hida Y, Hida K. Suprabasin as a novel tumor endothelial cell marker. *Cancer Sci*. 2014 Dec;105(12):1533-40. doi: 10.1111/cas.12549. Epub 2014 Nov 5.
7. Mizukami T, Kamachi H, Mitsuhashi T, Tsuruga Y, Hatanaka Y, Kamiyama T, Matsuno Y, Taketomi A. Immunohistochemical analysis of cancer stem cell markers in pancreatic adenocarcinoma patients after neoadjuvant chemoradiotherapy. *BMC Cancer*. 2014 Sep 21;14:687.
8. Kawamura H, Takahashi N, Homma S, Minagawa N, Shibasaki S, Takahashi M, Taketomi A. Assessment of postoperative symptoms after laparoscopy-assisted distal gastrectomy for stage I gastric cancer. *Int Surg*. 2014 Sep-Oct;99(5):645-9. doi: 10.9738/INTSURG-D-13-00111.1. PubMed PMID: 25216436; PubMed Central PMCID: PMC4253939.
9. Kakisaka T, Kamiyama T, Yokoo H, Orimo T, Wakayama K, Tsuruga Y, Kamachi H, Harada T, Kato F, Yamada Y, Mitsuhashi T, Taketomi A. Hand-assisted laparoscopic splenectomy for sclerosing angiomatoid nodular transformation of the spleen complicated by chronic disseminated intravascular coagulation: a case report. *Asian J Endosc Surg*. 2014 Aug;7(3):275-8. doi: 10.1111/ases.12116.
10. Kawamura H, Takahashi N, Tahara M, Takahashi M, Taketomi A. Laparoscopic gastrectomy after coronary artery bypass grafting using the right gastroepiploic artery: a report of two cases. *Asian J Endosc Surg*. 2014 Aug;7(3):251-5.
11. Sakai H, Kado S, Taketomi A, Sakane F. Diacylglycerol kinase δ phosphorylates phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent, palmitic acid-containing diacylglycerol species in response to high glucose levels. *J Biol Chem*. 2014 Sep 19;289(38):26607-17.
12. Asahi Y, Kamiyama T, Nakanishi K, Yokoo H, Tahara M, Usui A, Funakoshi T, Sato M, Sasaki A, Matsuno Y, Taketomi A, Todo S. Chondroma of the diaphragm mimicking a giant liver tumor with calcification: report of a case. *Surg Today*. 2014 Dec;44(12):2361-5.
13. Kawamura H, Takahashi N, Takahashi M, Taketomi A. The differences in microorganism growth on various

- dressings used to cover injection sites: inspection of the risk of catheter-related bloodstream infections caused by Gram-negative bacilli. *Surg Today*. 2014 Dec;44(12):2339-44.
14. Kawamata F, Homma S, Minagawa N, Kawamura H, Takahashi N, Taketomi A. Comparison of single-incision plus one additional port laparoscopy-assisted anterior resection with conventional laparoscopy-assisted anterior resection for rectal cancer. *World J Surg*. 2014 Oct;38(10):2716-23.
 15. Honda S, Okada T, Miyagi H, Minato M, Taketomi A. High drain amylase and lipase values predict post-operative pancreatitis for choledochal cyst. *Afr J Paediatr Surg*. 2014 Apr-Jun;11(2):124-7.
 16. Orimo T, Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Wakayama K, Tsuruga Y, Kamachi H, Taketomi A. Usefulness of artificial vascular graft for venous reconstruction in liver surgery. *World J Surg Oncol*. 2014 Apr 23;12:113.
 17. Akamatsu N, Sugawara Y, Kokudo N, Eguchi S, Fujiwara T, Ohdan H, Nagano H, Taketomi A, Kitagawa Y, Shimada M, Ku Y, Yanaga K, Shirabe K, Ikegami T, Mizokami M, Takeuchi M, Maehara Y. Outcomes of living donor liver transplantation for hepatitis C virus-positive recipients in Japan: results of a nationwide survey. *Transpl Int*. 2014 Aug;27(8):767-74.
 18. Kakisaka T, Kamiyama T, Yokoo H, Orimo T, Wakayama K, Tsuruga Y, Kamachi H, Hatanaka K, Taketomi A. [Long-term survival of a patient with metachronous lymph node metastasis and bile duct tumor thrombus due to hepatocellular carcinoma successfully treated with repeated surgery]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2013 Nov;40(12):1831-3. Japanese.
 19. Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuzaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, amiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):272-81. doi: 10.1093/carcin/bgt343. Epub 2013 Oct 15.
- 学会発表
3. 皆川 のぞみ, 崎浜 秀康, 小林 希, 小原美都, 柴崎 晋, 若山 顕治, 折茂 達也, 柿坂 達彦, 敦賀 陽介, 本間 重紀, 横尾 秀樹, 蒲池 浩文, 川村 秀樹, 高橋 典彦, 神山 俊哉, 武富 紹信 肝細胞癌における循環腫瘍細胞ならびに骨髄腫瘍細胞と臨床病理組織 学的因子の検討 第 114 回日本外科学会 京都 2014 年 4 月 3 日-5 日
 4. 大畑 多嘉宣, 横尾 英樹, 神山 俊哉, 若山 顕治, 折茂 達也, 柿坂 達彦, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信 肝細胞癌における FABP5 の新規バイオマーカーとしての有用性 第 114 回日本外科学会 京都 2014 年 4 月 3 日-5 日
 5. 横尾 英樹, 神山 俊哉, 武富 紹信 肝がんの諸問題 非 B 非 C 型肝細胞癌切除例の検討 第 50 回日本肝臓学会総会 東京 2014 年 5 月 29 日-30 日
 6. 若山 顕治, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 柿坂 達彦, 折茂 達也, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信 肝右葉巨大肝癌に対する、ベッセルシーリングシステムを用いた右横隔膜切除、肝右葉受動先行右系肝葉切除 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 和歌山 2014 年 6 月 11-13 日
 7. 武富 紹信 HCC に対する肝移植術後管理 第 26 回日本肝胆膵外科学会・学術集会 和歌山 2014 年 6 月 11-13 日
 8. 柿坂 達彦, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 折茂 達也, 若山 顕治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信 当科における肝細胞癌に対する腹腔鏡下肝切除術の成績 第 52 回日本癌治療学会 横浜 2014 年 8 月 28 日-30 日
 9. 腰塚 靖之, 高橋 徹, 後藤 了一, 青柳 武史, 柏浦 愛美, 山本 真由美, 岡本 花織, 太田 稔, 山下 健一郎, 武富 紹信, 嶋村 剛 当院における肝移植後 de novo 悪性腫瘍症例の検討 第 50 回日本移植学会総会 東京 2014 年 9 月 10 日-12 日
 10. 後藤 了一, 山下 健一郎, 腰塚 靖之, 高橋 徹, 青柳 武史, 太田 稔, 夏井坂 光輝, 小川 浩司, 鈴木 友己, 神山 俊哉, 坂本直哉, 武富 紹信, 嶋村 剛 C 型肝炎・肝細胞癌に対する肝移植の現状と課題 当科における肝移植後 C 型肝炎再発例の治療成績の検討 第 50 回日本移植学会総会

東京 2014年9月10日-12日

11. 柿坂 達彦, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 折茂 達也, 若山 颯治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信 巨大肝細胞癌手術症例の治療成績 第6回日本 Acute Care Surgery 学会 学術集会 青森 2014年9月20-21日
12. 武富 紹信, 急性肝不全症に対する肝移植の適応とタイミング 第52回日本人工臓器学会、札幌、2014年10月17日-19日
13. 加藤 紘一, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 柿坂 達彦, 折茂 達也, 若山 颯治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信 エリスロポエチン産生による多血症を伴った巨大肝細胞癌の1例 第76回日本臨床外科学会 2014年11月20日-22日
14. 加藤 紘一, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 柿坂 達彦, 折茂 達也, 若山 颯治, 敦賀 陽介, 蒲池 浩文, 武富 紹信 肝細胞癌腹腔鏡下術後に早期腹膜播種再発をおこした1例 第76回日本臨床外科学会総会 郡山 2014年11月20日-22日
15. 若山 颯治, 神山 俊哉, 横尾 英樹, 柿坂 達彦, 蒲池 浩文, 敦賀 陽介, 山下 健一郎, 嶋村 剛, 武富 紹信 下大静脈/右心房腫瘍栓を伴う高度進行肝細胞癌に対する外科的治療 第76回日本臨床外科学会総会 郡山 2014年11月20日-22日

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

ウイルス感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響

研究分担者 夏井坂 光輝 北海道大学病院消化器内科 助教

研究要旨

がん幹細胞の存在が多くの固形癌においても同定され、再発、転移、治療抵抗性に深く関与していることが明らかとなってきた。がん幹細胞を標的とした新たな治療法の開発は、癌研究における最も重要な研究課題の一つである。本研究は肝細胞癌における癌幹細胞の解析、また、C型肝炎ウイルス感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響を次世代シーケンサーを用いた新たな研究手法により明らかにすることを目的に遂行される。次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスにより、転写因子である KLF5 が肝細胞癌幹細胞において非常に重要な役割を担うことが明らかとなりつつある。

A. 研究目的

HCV 感染が肝細胞癌の生物学的悪性度に関与している可能性が考えられるが、HCV 感染が癌幹細胞に与える影響は明らかとなっていない。HCV 感染系を用いて、HCV 感染および HCV 駆除が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響を解析し、ウイルス感染を背景とした肝細胞癌におけるがん幹細胞を標的とした新たな治療法を開発することを目的に本研究は遂行される。

B. 研究方法

HCV 感染系、肝細胞癌由来 Huh7 細胞を用いて、HCV 感染が肝細胞癌がん幹細胞に与える影響を解析する。次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンシングにより、肝細胞癌がん幹細胞における重要な候補遺伝子を絞込む。候補遺伝子の遺伝子発現に及ぼす HCV 感染の影響を、とくに転写責任領域のメチル化に関して次世代シーケンサーにより解析する。さらに臨床検体を用いたエピゲノム解析を行う。

（倫理面への配慮）

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言（2008 年 10 月修正）」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 25 年 2 月 8 日全部改正）」を遵守し

て実施する。

研究実施に係る試料等を取扱う際は、被験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し、被験者の秘密保護に十分配慮する。遺伝子解析の結果も同様に個人情報とは分離し保管される。固有の通し番号と個人識別情報の対応表は個人識別情報管理者によって厳重に保管される。研究の結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含まないようにする。

C. 研究結果

肝細胞癌においては CD44⁺/CD133⁺細胞が癌幹細胞の性質を有することを複数の細胞株（Huh7、HepG2）を用いて確認した。次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスにより、肝細胞癌がん幹細胞において重要な機能を有する可能性のある候補遺伝子を選定した。転写因子である KLF5 は CD44⁺/CD133⁺細胞において過剰発現しており、KLF5 のノックダウンにより CD44⁺/CD133⁺細胞は有意に減少し、逆に KLF5 を過剰発現することで CD44⁺/CD133⁺細胞の比率は増加した。さらに DNA 結合部位を TGF-β でアセチル化すると、KLF5 による CD44⁺/CD133⁺細胞増加作用は現弱し、KLF5 の脱アセチル化変異体により CD44⁺/CD133⁺細胞は著明に増加した。KLF5、

さらには KLF5 の DNA 結合部位のアセチル化の状態が CD44⁺/CD133⁺細胞の制御において非常に重要であることが示唆された。RNA シーケンスにより得られたその他の候補遺伝子に関しても解析を継続している。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスにより、KLF5 が肝細胞癌幹細胞を制御する重要な因子であることを見出した。更には、本研究により KLF5 の DNA 結合部位のアセチル化の状態が CD44⁺/CD133⁺細胞の制御に重要であることが示唆されている。転写因子自体を標的とした治療法の開発は困難な場合が多いが、KLF5 の DNA 結合部位のアセチル化は肝細胞癌幹細胞をターゲットとした新たな治療法の標的となり得る可能性がある。また、HCV 感染が KLF5 の発現、KLF5 のアセチル化の状態に及ぼす影響に関しては今後の解析結果が待たれる。

E. 結論

KLF5 が肝細胞癌幹細胞における重要な転写因子であることを見出した。KLF5 を標的とした肝細胞癌幹細胞に対する新たな治療法開発の萌芽となる可能性が期待される。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

論文発表

1. Kagawa S*, **Natsuizaka M*** (* contributed equally), Whelan KA, Facompres N, Naganuma S, Ohashi S, Kinugasa H, Egloff AM, Basu D, Gimotty PA, Klein-Szanto AJ, Bass A, Wong K, Diehl JA, Rustgi AK, Nakagawa H. Cellular senescence checkpoint function determines differential Notch1-dependent oncogenic and tumor suppressor activities. *Oncogene*. 2014. In press.

2. Kinugasa H, Whelan KA, Tanaka K, **Natsuizaka M**, Long A, Guo A, Chang S, Kagawa S, Srinivasan S, Guha M, Yamamoto K, St. Clair DK, Avadhani NG, Diehl JA, Nakagawa H. Mitochondrial SOD2 regulates epithelial-mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression. *Oncogene*. 2015. In press.

3. Vega ME, Giroux V, **Natsuizaka M**, Liu M, Klein-Szanto AJ, Stairs DB, Nakagawa H, Wang KK, Wang TC, Lynch JP, K Rustgi AK. Inhibition of Notch signaling enhances transdifferentiation of the esophageal squamous epithelium towards a Barrett's-like metaplasia via KLF4. *Cell Cycle*. 2014;13(24):3857-66.

4. Kubota Y, Kawakami H, **Natsuizaka M**, Kawakubo K, Marukawa K, Kudo T, Abe Y, Kubo K, Kuwatani M, Hatanaka Y, Mitsuhashi T, Matsuno Y, Sakamoto N. CTNNB1 mutational analysis of solid-pseudopapillary neoplasms of the pancreas using EUS-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing. *J Gastroenterol*. 50(2):203-10.

5. Tsunematsu S, **Natsuizaka M**, Fujita H, Otsuka N, Terashita K, Sato F, Kobayashi T, Nakai M, Tsukuda Y, Horimoto H, Sho T, Suda G, Nakanishi M, Hashino S, Chuma M, Sakamoto N. Hepatosplenic Gamma-delta T-cell Lymphoma Associated with Epstein-Barr Virus. *Intern Med*. 2014;53(18):2079-82.

6. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudou M, Chuganji Y, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato G, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, **Natsuizaka M**, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N for the NORTE study group. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reaction. *Hepatol Res*. 2014. In press.

7. Tsunematsu S, Chuma M, Kamiyama T, Miyamoto N, Yabusaki S, Hatanaka K, Mitsuhashi T, Kamachi H, Yokoo H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Orimo T, Wakayama K, Ito J, Sato F, Terashita K, Nakai M, Tsukuda Y, Sho T, Suda G, Morikawa K, **Natsuizaka M**, Nakanishi M, Ogawa K, Taketomi A, Matsuno Y, Sakamoto N. Intratumoral artery on contrast-enhanced computed tomography imaging: differentiating intrahepatic cholangiocarcinoma from poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging*. 2015. in press.

学会発表

1. **Natsuizaka M**, Maehara O, Sato F, Kubota Y, Suda G, Itoh J, Tsunematsu S, Tsukuda Y, Terashita K, Nakai M, Sho T, Ogawa K, Ohnishi S, Sakamoto N. A pivotal role of KLF5 in regulation of cancer stem-like cells in hepatocellular carcinoma. AASLD the LIVER meeting 2014. Boston, Nov 7-11, 2014.

2. Natsuizaka M, Kaimila B, Kubota Y, Hatanaka Y, Marukawa K, Terashita K, Sato F, Ohnishi S, Suda G, Ohashi S, Kagawa S, Whelan K, Rustgi AK, Nakagawa H, Sakamoto N. EGFR inhibitors eliminate esophageal cancer stem cells by suppressing epithelial-mesenchymal transition. Digestive Disease Week and the 115th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Chicago, May 3-6, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

C 型慢性肝炎における免疫遺伝子多型と NK 細胞解析

研究分担者 巽 智秀 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 助教

研究要旨

C 型慢性肝炎・肝癌の病態形成において自然免疫、特に natural killer (NK) 細胞が重要な役割を担うことが知られている。本年度は、C 型慢性肝炎における免疫調節因子 Galectin-9 (Gal-9) の NK 細胞に対する役割を明らかにすることを目的とした。C 型慢性肝炎患者の血清 Gal-9 値は健康人に比し有意に高値であった。また Gal-9 は NK 細胞の細胞傷害能を増強し、活性化 NK 細胞は T 細胞を傷害することから、肝障害と活性化 T 細胞除去、HCV の持続感染に関わることが示唆された。

共同研究者

西尾 啓 大阪大学消化器内科学 大学院生
板倉史晃 大阪大学消化器内科学 大学院生

A. 研究目的

我が国の C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染患者は約 200 万人存在すると推定され、HCV 感染症の制御・克服は重要な課題である。HCV は持続感染をおこし慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌と進行していく。

慢性肝疾患の病態形成にはウイルス側因子に加えて、宿主側の防御応答である自然免疫や獲得免疫などの免疫応答が、重要な役割を担うことが知られている。C 型慢性肝炎において、HCV 感染に対する宿主側の免疫応答として慢性的に内因性 IFN- α が分泌された結果、末梢血中の NK 細胞の細胞傷害活性が増強し、肝障害に関連していることを示唆する報告がなされている。さらには慢性ウイルス感染時、活性化 NK 細胞は T 細胞を抑制または傷害し、持続感染に寄与することを示唆する報告もなされている。このように C 型

慢性肝炎の病態形成に NK 細胞が一定の役割を果たすことが明らかとなっているが、その活性化のメカニズムについては明らかとなっていない。

NK 細胞の活性化は活性型レセプターと抑制性レセプターとのバランスによって規定されることが知られている。近年、Galectin-9 (Gal-9) が NK 細胞に対する活性化リガンドとして働くことが報告された。Gal-9 は β -galactoside binding lectin の一種で、様々な組織に存在するが特に肝臓に多く発現することが知られている Gal-9 とそのレセプターとして知られる T cell Ig and mucin domain 3 (Tim-3) は免疫システムを調節する免疫分子として注目されており、C 型慢性肝炎において、Tim-3/Gal-9 が T 細胞に対して抑制的に機能することも明らかとなっている。また C 型慢性肝炎患者の血清 Gal-9 値は健常者に比し上昇していることも報告されているが、C 型慢性肝炎における NK 細胞に対する Gal-9 の役割は未だ不明で、Gal-9 が NK 細胞の調節を介して C 型慢性肝炎

の病態を形成する一因となっている可能性がある。

そこで本研究では、C型慢性肝炎のNK細胞による病態におけるGal-9の意義を明らかにすることで、新たな治療戦略の構築を目指すことを目的とした。

B. 研究方法

大阪大学医学部附属病院臨床研究倫理審査委員会承認のプロトコルを用いてC型慢性肝炎患者(CHC群)・対照群(Control群)の血清Gal-9値をELISA法で測定した。またCHC群・Control群の末梢血単核球(PBMC)を採取し、フローサイトメトリーにてTim-3の頻度解析を行った。さらにNK細胞に対するGal-9の与える影響を評価するためにrecombinant human Gal-9を添加しNK細胞の機能評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究遂行にあたっては、事前に施設倫理委員会にて実験内容が承認され、C型肝炎患者及び健康者に文書を用いて説明の上、署名による同意を得た上で、採血し解析を行った。

C. 研究結果

対象はC型慢性肝炎患者55例対照群41例である。各群年齢はそれぞれ 63 ± 11 歳、 66 ± 8 歳であった。血清Gal-9値はC型慢性肝炎患者で 175 ± 190 (pg/ml)、対照群で 19.5 ± 66 (pg/ml)であり、C型慢性肝炎患者群で有意に高値であった(図1)。C型慢性肝炎患者での検討ではAST・ALT値の異常値群において血清Gal-9値は高値であり、肝障害との関連が示唆された。

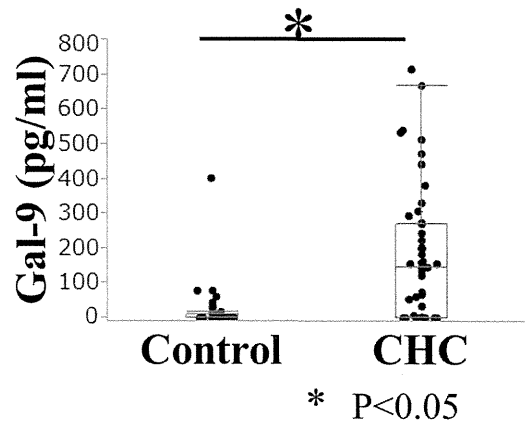


図1 各群での血清Gal-9値

次にC型慢性肝炎患者・対照群のNK細胞上のTim-3の頻度解析を行ったところ、C型慢性肝炎患者で 87 ± 9.1 (%), 対照群で 88 ± 7.4 (%)であり、両群間に有意差はなかった(図2)。

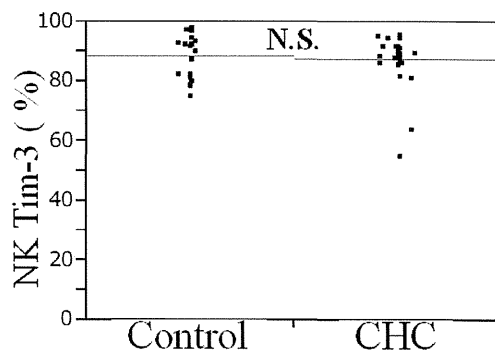


図2 NK細胞上のTim-3発現頻度

NK細胞に対するGal-9の与える影響を調べるために、recombinant human Gal-9 (rhGal-9)の添加実験を行った。NK細胞はヒト末梢血よりPBMCを採取、MACSにて単離し、rhGal-9を添加した時のNK細胞の細胞傷害能を評価した。NK細胞の細胞傷害能の評価として、K562細胞に対する細胞傷害活性と細胞傷害のマーカーであるNK細胞上のCD107aをフローサイトメトリーにて測定した。いずれもrhGal-9濃度依存的に増加した(図3)。

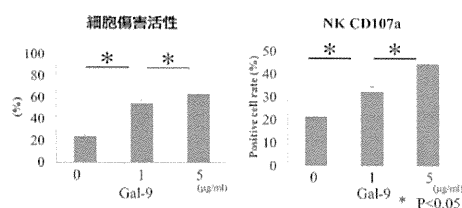


図3 Gal-9のNK細胞傷害能に与える影響

またGal-9により活性化されたNK細胞はT細胞に対する細胞傷害能の亢進を認めた。さらにHCV感染増殖系(JFH-1)とPBMCを共培養したところ、上清中Galectin-9濃度は有意に上昇しており、共培養時のNK細胞の細胞傷害能も有意に亢進していることが明らかとなった。

D. 考察

C型慢性肝炎患者において血清Galectin-9値は対照群に比し有意に高値であり、肝障害との関連が示唆された。またIn vitroの検討により、Galectin-9はNK細胞を活性化し、活性化したNK細胞が肝障害や活性化T細胞除去に関与していることも示唆された。これらの結果よりGal-9と免疫担当細胞の間にはcrosstalkが存在し、Gal-9により活性化されたNK細胞は肝障害や活性化T細胞除去に関与することが考えられ、Gal-9はHCVの持続感染に寄与する可能性が示唆された。Gal-9の産生源及び発現を調節している因子については今後の検討が必要である。

E. 結論

C型慢性肝炎において、Gal-9はNK細胞を介した肝障害とHCV持続感染の一因となっている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Miyazaki M, Yamada A, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Fukui H, Inui Y, Hijioka T, Inada M, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Kato M, Miyag M, Yoshida Y, Tatsumi T, Kasahara A, Hamasaki T, Hayashi N, Takehara T. Post-treatment levels of α -fetoprotein predicts incidence of hepatocellular carcinoma after interferon therapy. **Clin Gastroenterol Hepatol** 12: 1186-1195, 2014
- Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Makino Y, Saito Y, Tanaka S, Shimizu S, Sakamori R, Miyagi T, Wada H, Nagano H, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T Synthetic lethal interaction of combined CD26 and Bcl-xL inhibition is a powerful anticancer therapy against hepatocellular carcinoma. **Hepatol Res.** 2014 Oct. [Epub ahead of print]

学会発表

- Akira Nishio, Tomohide Tatsumi, Takahiro Suda, Atsuo Takigawa, Tadashi Kegasawa, Onishi Yoshiki, Seiichi Tawara, Satoshi Aono, Takatoshi Nawa, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara Monocytes-derived Galectin-9 induces the cytotoxicity of NK cells in chronic hepatitis C The 65th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease, Boston, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得
なし
- 実用新案登録

なし

3. その他
なし

GWAS より得られた肝疾患関連 SNP における臨床的意義の検討

分担研究者 前川 伸哉 山梨大学医学部第一内科 講師

研究要旨:近年 GWAS 解析等により C 型あるいは B 型慢性肝疾患進展に関連する幾つかの SNP が報告されているが、必ずしも臨床的意義が確立された有用なマーカーとはいえない。本検討では、C 型慢性肝炎、さらに B 型慢性肝炎における病態において、GWAS より見いだされた SNP 因子の関与を検討、臨床的有用性を明らかとすることを目的として末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出、MICA(rs2596542)、DEPDC5(rs1012068)、IL28B(rs8099917)、PNPLA3(rs738409)、HLA-DPA1(rs3077)の SNP についてタイピングを行い、ファイブロスキャンを用いた肝硬度値を含む臨床因子との関連について検討した。

その結果、C 型慢性肝炎において、MIC_A は既存因子とは独立して、また DEPDC5 は高齢者において肝発癌に関連し、PNPLA3 は線維化に関与することが示された。一方、B 型慢性肝炎の病態における MIC_A、DEPDC5、PNPLA3 の SNP の関与は必ずしも高いとは言えず、病態進展機序は C 型と B 型で異なることが考えられた。

研究協力者：前川 伸哉 山梨大学医学部第一内科 講師

A. 研究目的

近年 GWAS 解析等により C 型慢性肝疾患、あるいは B 型慢性肝疾患の進展に関連する幾つかの SNP が報告されているが、十分な追試がされていないこと、また SNP の有用な慢性肝疾患のサブグループの特徴などについても明らかとなっていないことから、必ずしも臨床的意義が確立された肝疾患進展に有用なマーカーとはいえない。

本研究では、MICA、DEPDC5、IL28B (IFL3)、PNPLA3、HLA-DPA1 に注目し、これらの SNP と C 型慢性肝炎、あるいは B 型慢性肝炎における肝線維化・肝発癌などの病態進展との関連を明らかにすることを目的として検討を行った。

B. 研究方法

C 型慢性肝疾患 298 症例、B 型慢性肝疾患症例

264 症例に対して、末梢血白血球よりゲノム DNA を抽出し、MICA(rs2596542)、DEPDC5(rs1012068)、IL28B(rs8099917)、PNPLA3(rs738409)、HLA-DPA1(rs3077)の SNP について realtime-PCR を用いて SNP タイピングを行い、ファイブロスキャンを用いた肝硬度値を含む臨床因子との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は山梨大学における倫理委員会の承認(遺伝子研究)を得ており、対象者全員から文書による同意を得たうえで行われた。

C. 研究結果

C 型慢性肝疾患において、MICA リスクアレル(A)は既知の肝癌リスクとは独立した HCC 関連因子 (Odd Ratio 1.9, p=0.02) であり、DEPDC5 リスク

アレル(G)は65歳以上の高齢者においてHCCと関連した(OR2.8, p=0.01)。一方、IL28Bリスクアレル(G)は肝線維化あるいは肝癌と直接の関連は認めずPNPLA3リスクアレル(G)は肝発癌との関連を認めなかったものの、肝線維化と有意に関連した(p=0.03)。

一方、B型慢性肝疾患においてMICA、DEPDC5、PNPLA3、IL28BはHCC合併、血小板値、HBs抗原量、HBe抗原量、HBcr抗原量などと明らかな関連を認めなかった。一方、HLA-DPA1のリスクアレル保有率は臨床病期が進展するにつれて低下する傾向を認めた。

D. 考察

C型慢性肝炎において、MICAは、肝線維化と独立して肝発癌に関連し、またDEPDC5は高齢者の肝発癌リスクを上昇させた。一方、PNPLA3、IL28Bは直接肝癌との関連を認めないものの、肝癌に至る病態を修飾することが考えられた。

一方、B型慢性肝炎の病態におけるMIC_A、DEPDC5、PNPLA3のSNPの関与は必ずしも高いとは言えず、病態進展機序はC型とB型で異なることが考えられた。B型慢性肝炎の病態形成におけるHLA-DPA1の関与が考えられた。

E. 結論

C型慢性肝疾患においては、これらSNPの検討は病態進展高リスクな集団を同定するうえで臨床的な有用性が示唆された。一方、B型慢性肝疾患における意義についてはさらなる検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

I. 論文発表

1. Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsushashi H, Kurosaki M, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, Honda M, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, Watanabe H, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, Tokunaga K, Tanaka Y. Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C. *Hum Genet.* 2015 Mar;134(3):279-89.
2. Itakura J, Kurosaki M, Takada H, Nakakuki N, Matsuda S, Gondou K, Asano Y, Hattori N, Itakura Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Takahashi Y, Maekawa S, Enomoto N, Izumi N. Naturally occurring, resistance-associated hepatitis C virus NS5A variants are linked to IL28B genotype and are sensitive to interferon-based therapy. *Hepatol Res.* 2015 Jan 6. doi: 10.1111/hepr.12474. [Epub ahead of print]
3. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Okuyama-Dobashi K, Yasumoto J, Maekawa S, Enomoto N, Okamoto T, Matsuura Y, Morimatsu M, Manabe N, Ochiai K, Yamashita K, Moriishi K. Hallmarks of hepatitis C virus in equine hepatitis virus. *J Virol.* 2014 Nov 15;88(22):13352-66.
4. Tatsumi A, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Liver stiffness measurement for risk assessment of

- hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2014 Jun 24. doi: 10.1111/hepr.12377. [Epub ahead of print]
3. その他
なし。
5. Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Deep sequencing analysis of variants resistant to the non-structural 5A inhibitor daclatasvir in patients with genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatol Res.* 2014 Feb 25. doi: 10.1111/hepr.12316. [Epub ahead of print]
6. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatol Res.* 2014 Dec;44(13):1339-1346.
7. Maekawa S, Enomoto N. Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 201449(1) :163-4.

H. 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。

次世代シーケンス技術を用いた肝発がん・予後に関する遺伝子の網羅的解析

研究分担者 朝比奈靖浩 東京医科歯科大学 教授

【目的】本研究では肝細胞癌の病態と関連する遺伝子を解明する目的で、臨床肝癌検体から半導体シーケンスを用いて癌関連遺伝子変異を網羅的に解析した。【方法】臨床的背景因子、無再発生存期間、生存期間等の各種臨床データが明らかである肝細胞癌手術例 104 例を対象とした。腫瘍部および肝臓の非腫瘍部をペアとした DNA サンプルから癌関連 50 遺伝子の 2790 箇所の Hotspot をターゲットとして deep sequence を行った。【結果】93 検体中 9 遺伝子で変異を認め、TERT promoter 68 例 (65%)、TP53 37 例 (36%)、CTNNB1 31 例 (35%)、PTEN 2 例 (2%)、CDKN2A 2 例 (2%)、HRAS 1 例 (2%)、PIK3CA 1 例 (2%)、STK11 1 例 (2%)、GNAS 1 例 (1%)、NFE2L2 1 例 (1%) であった。TERT promoter 変異は高齢 ($p=0.017$)、HCV 感染 ($p=0.0026$) と有意に関連があり、TERT promoter 変異は有意に無再発生存期間 ($p=0.010$)、生存期間 ($p=0.048$) が有意に短かった。【結語】HCV 起因性肝癌は TERT promoter 変異が多く、TERT promoter 変異を有する肝癌は変異を有しないものに比し有意に予後不良であった。本遺伝子領域は HCV 起因性肝細胞癌の新たな治療標的となり得ると考えられた。

A. 研究目的

肝細胞癌は C 型慢性肝炎・肝硬変を背景として発生し、他の固形癌と同様に癌の進行に伴って遺伝子異常が蓄積すると考えられているが、治療反応性、再発の有無、生命予後など臨床病態と密接に関連する遺伝子異常は明らかになっていない。本研究では肝細胞癌の病態と関連する遺伝子を解明する目的で、臨床肝癌検体から半導体シーケンスを用いて低頻度に存在する遺伝子変異も含めて網羅的検索を行った。

B. 研究方法

2001年以降に肝細胞癌に対して手術を行い、臨床的背景因子、無再発生存期間、

生存期間等の各種臨床データが明らかである104例を対象とした。年齢中央値 = 70 歳、男 / 女 = 77 / 27例、HBV / HCV / NBNC = 28 / 50 / 12 / 14例、腫瘍径中央値 = 3.8cm、Child-Pugh grade A / B = 95 / 9例、高分化 / 中分化 / 低分化 = 33 / 51 / 20例、再発あり = 66例。腫瘍部および肝臓の非腫瘍部をペアとしたDNA サンプルから癌関連50遺伝子の2790箇所の Hotspot をターゲットとして Ion AmpliSeq Cancer Panel Kit v2とARID1A、ARID2、AXIN1、NFE2L2をターゲットとした Ion Ampliseq Custom Panel を使い、Libraryを増幅、Template作成後、Ion PGM Sequencerを用いて deep sequence を行った。データ解析はTorrent Suite v2.2を

用い標準ヒトゲノムhg19をリファレンス配列とし、これらへのマッピングおよびSNPの検出を行った。また、TERT promoter領域の2か所のhotspotに対してdirect sequenceを行った。

(倫理面への配慮)

所属施設の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

腫瘍部は平均 2024 リード、非腫瘍部は 1173 リード得られた。検出された Hotspot 変異のうち肝臓の非腫瘍部に認められなかった変異を体細胞変異とした。93 検体中 9 遺伝子で変異を認め、TERT promoter 68 例 (65%)、TP53 37 例 (36%)、CTNNB1 31 例 (35%)、PTEN 2 例 (2%)、CDKN2A 2 例 (2%)、HRAS 1 例 (2%)、PIK3CA 1 例 (2%)、STK11 1 例 (2%)、GNAS 1 例 (1%)、NFE2L2 1 例 (1%)であった。これらの遺伝子変異と臨床的背景因子の関連を解析したところ、TERT promoter 変異は高齢 ($p=0.017$)、HCV 感染 ($p=0.0026$)、non-HBV 感染 ($P<0.0001$)、TP53 変異は HBV 感染 ($p=0.0026$)、non-HCV 感染 ($p=0.0014$)、CTNNB1 変異は non-HBV 感染 ($p=0.010$) と有意に関連があった。C 型肝癌に多く認められた TERT promoter 変異は有意に無再発生存期間 ($p = 0.010$)、生存期間 ($p = 0.048$) が短かった。

D. 考察

肝細胞癌の約 90%は TERT promoter 変異、TP53 変異、CTNNB1 変異を認め、それぞれ etiology との関連を認めた。さらに TERT promoter 変異は HCV 起因性肝細胞癌に多く、予後不良と関連していた。これらの癌関連遺伝子の測定は肝細胞癌の病態や治療効果を予測する上で有用であり、HCV 起因性肝細

胞がんの新たな治療標的となり得ると考えられた。

E. 結論

C 型肝癌は TERT promoter 変異が多く、TERT promoter 変異を有する肝癌は変異を有しないものに比し予後不良であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

3. Murakawa M*, Asahina Y*, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kitazume-Kusano A, Watanabe T, Kawai-Kitabatake F, Otani S, Taniguchi M, Goto F, Nishimura-Sakurai N, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. *MM and YA contributed equally to this work. Impaired induction of IL28B and expression of IFN λ 4 associated with non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2015 doi: 10.1111/jgh.12902.
4. Tsuchiya K*, Asahina Y*, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. * These authors contributed equally to this study. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2014; 120: 229–273.
5. Tsuchiya K, Asahina Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful radiofrequency ablation in patients with early stage hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2014; 20: 291–297.
6. Yasui Y, Kudo A, Kurosaki M, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S,

- Hosokawa T, Ueda K, Matsunaga K, Nakanishi H, Tsuchiya K, Itakura J, Takahashi Y, Tanaka S, Asahina Y, Enomoto N, Arii S, Izumi N. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: A propensity score matching study. *Oncology* 2014; **86**: 53–62.
7. Suda G, Yamamoto Y, Nagasaka A, Furuya K, Kudo M, Yoshimichi C, Tsukuda Y, Tsunematsu S, Sato F, Terasita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Natsuizka M, Ogawa K, Ohnishi S, Chuma M, Fujita Y, Abe R, Taniguchi M, Nakagawa M, Asahina Y, Sakamoto N. Serum granulysin levels as a predictor of serious telaprevir-induced dermatological reactions. *Hepatology* 2014 Sep 11. doi: 10.1111/hepr.12421.
 8. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. *PLoS One* 2014; **9**: e86449.
 9. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, Izumi N. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: evaluation by near infrared spectroscopy. *Hepatology* 2014; **44**: 319–326.
 10. Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Miura M, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Fukasawa M, Uetake T, Ohtaka M, Sato T, Asahina Y, Kurosaki M, Izumi N, Ichikawa T, Araki T, Enomoto N. Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging. *Hepatology* 2014; **44**: 1339–1346. doi: 10.1111/hepr.12309.
 11. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y, Izumi N. Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2014; **44**: 720–727.
- 学会発表
1. Kawai-Kitahata F, Asahina Y, Kaneko S, Nagata H, Goto F, Otani S, Taniguchi M, Murakawa M, Nitta S, Watanabe T, Tasaka-Fujita M, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Enomoto N, Watanabe M. Gene alterations in β -catenin and p53/cell cycle control pathway are closely associated with development and prognosis of hepatocellular carcinoma: Comprehensive analyses by next generation sequencing technology. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 2. Nakagawa M, Asahina Y, Taniguchi M, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka Y, Watanabe M. Impact of host and therapeutic factors and resistant associated variants on response to interferon based-direct acting antiviral treatment in difficult-to-treat chronic hepatitis C patients. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 3. Murakawa M, Asahina Y, Nakagawa M, Sakamoto N, Nitta S, Kawai-Kitahata F, Taniguchi M, Watanabe T, Itsui Y, Kakinuma S, Watanabe M. Expression of IFN/4 in liver and PBMC is closely associated with higher basal expression of ISGs and impaired induction of IL28B by interferon treatment in chronic hepatitis C non-responder patients. **The 65th Annual**

- Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
4. Watanabe T, Asahina Y, Nakagawa M, Kakinuma S, YItsumi Y, Taniguchi T, Murakawa M, Nagata H, Miura M, Maekawa S, Enomoto E, Watanabe M. Emergence or selection of resistant associated variant immediately after initiation of the therapy is predictive for failure of direct acting antiviral therapy: ultra-deep sequencing analyses for serial time points. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 5. Otani S, Kakinuma S, Kamiya A, Goto F, Kaneko S, Azuma S, Asahina Y, Watanabe M. Matrix Metalloproteinase-14 regulates the maturation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 6. Tsuchiya K, Yasui Y, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Clinical outcomes in patients who develop hepatocellular carcinoma after hepatitis C viral eradication by antiviral therapy. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 7. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Yamamoto K, Sasazuki T, Sugiyama M, Seto W, Yuen M, Poovorawan Y, Ahn SH, Han K, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang J, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. Associations of HLA-DPB1 with CHB infection and HBV related HCC in Asia. **The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2014), Boston, USA, November 7-11, 2014.**
 8. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN λ 4 influenced by the polymorphisms near IL28B gene are closely associated with a non-response to interferon in chronic hepatitis C patients. **The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.**
 9. Tsuchiya K, Yasui Y, Takada N, Nakakuki S, Matsuda S, Kaneko S, Muraoka M, Yamashita N, Hattori N, Tamaki N, Osaki S, Suzuki T, Hosokawa K, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriaminepentaacetic acid magnetic resonance imaging and contrast enhanced ultrasonography with sonazoid as part of therapeutic strategies for small nonhypervascular hepatic nodular lesions. **The 49th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2014), London, UK, April 8-14, 2014.**
 10. 中川美奈, 朝比奈靖浩, 渡辺 守 シンポジウム 難治性 C 型慢性肝炎に対するプロテアーゼ 3 剤併用療法の治療効果と DAA 耐性変異の検討 第 40 回日本肝臓会東部会 東京, 2014 年 11 月
 11. 朝比奈靖浩, 中川美奈, 渡辺 守 シンポジウム NS3 および NS5A 阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレビル 3 剤併用療法の治療効果 第 50 回日本肝臓会総会 東京, 2014 年 5 月
 12. 朝比奈靖浩 公聴会 NS3 および NS5A 阻害剤耐性変異とシメプレビルおよびテラプレビル

ル3剤併用療法の治療効果

第50回日本肝臓会総会

東京, 2014年5月

13. 中川美奈, 朝比奈靖造, 渡辺 守
パネルディスカッション C型慢性肝炎に対するインターフェロンをベースとしたプロテアーゼ3剤併用療法の治療効果とDAA耐性変異の検討

第19回日本肝臓会大会

神戸, 2014年10月

14. 櫻井幸, 朝比奈靖造, 渡辺 守
パネルディスカッション B型慢性肝炎における核酸アナログ治療中の肝発癌危険因子の検討

第40回日本肝臓会東部会

東京, 2014年11月

15. 井津井康浩, 朝比奈靖造, 渡辺 守
ワークショップ 高齢者C型慢性肝炎へのIFN治療後発癌と発癌に関する因子の解析

第19回日本肝臓会大会

神戸, 2014年10月

16. 井津井康浩, 朝比奈靖造, 渡辺 守
ワークショップ ウイルス性急性肝炎およびde novo B型肝炎の動向

第40回日本肝臓会東部会

東京, 2014年11月

17. 東正新, 朝比奈靖造, 渡辺 守
ワークショップ 肝細胞癌スクリーニング時における拡散強調画像陽性所見の重要性

第40回日本肝臓会東部会

東京, 2014年11月

18. 村川美也子, 朝比奈靖造, 中川美奈, 後藤文男, 大谷賢志, 河合富貴子, 谷口未樹, 新田沙由梨, 渡辺貴子, 櫻井幸, 井津井康浩, 東正新, 柿沼晴, 坂本直哉, 渡辺 守

ワークショップ C型慢性肝炎治療におけるIFN不応性に関わるIL28B近傍遺伝子多型(SNP)と血球内IFN λ 産生能の関連

第50回日本肝臓会総会

東京, 2014年5月

19. 中川美奈, 朝比奈靖造, 渡辺 守
ワークショップ インターフェロン治療後の線維化マーカーの推移と発癌リ

スクの検討

第50回日本肝臓会総会

東京, 2014年5月

20. 中川美奈, 朝比奈靖造, 渡辺 守
ワークショップ 次世代プロテアーゼ阻害剤併用3剤治療の適応症例の検討
第100回日本消化器病学会総会
東京, 2014年4月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

分担研究者報告書（平成 26 年度）

「Yamagata Study(住民検診基盤でのコホート研究)を用いた病変進展・肝発癌の分子機構の解析」

研究分担者 上野 義之 山形大学医学部消化器内科 教授

研究要旨：平成 26 年度の分担研究では、日本人地域住民コホートにおける HCV 感染の現状およびコホートの発癌状況についてのデータを得るために 1) HCV 抗体陽性率と陽性者の特徴、および発癌状況と生命予後の検討、2) 次世代シーケンサーを用いて宿主因子解析のための基礎検討、という 2 点実施した。40 歳以上の住民コホートを 5 年間追跡した 2 例に原発性肝癌の発生および死亡を認めた。発癌のイベント数が少ないため、統計学的差を出すためにはさらに拡大したコホートの活用が求められる。一方次世代シーケンサー I を用いた基礎検討では、HCV 全長に対するカバー率が現状ではまだ低く、さらなる基礎検討を重ねて安定的なシーケンシングを行なう技術の確立が必要であると考えられた。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染による肝組織進展および発癌には様々な危険因子が関与していることが明らかになっているが、来たる HCV 全例治癒の時代に備え、HCV 排除後の肝組織進展、発癌のハイリスク群の特定が必要と考えられている。

平成 26 年度の分担研究では、前年に引き続き日本人地域住民コホートにおける HCV 感染の現状およびコホートの発癌状況について把握し、HCV 非感染コントロールとしての基礎的なデータを得るために以下の項目について検討した。

- 1) HCV 抗体陽性率と陽性者の特徴、および発癌状況と生命予後を把握する。
- 2) 次世代シーケンサー ION-PGM シーケンサーを用いて宿主因子解析のための基礎検討を行なう

B. 研究方法

山形大学「地域特性を生かした分子疫学研究」(Takahata Study) のデータベースを利用し、初回調査 (H16~H18) で HCV 抗体測定を行った 3511 名を分析対象とした。さらに 5 年後の追跡調査 (H21, H23) を受診した対象者を縦断研究の分析対象とした。

HCV 抗体は第 3 世代抗体 (ラテックス凝集法) を用い、陰性 (Unit <1.0)、弱陽性 (Unit 1.0~6.6)、陽性 (Unit ≥ 6.7) と判定した。

データはいずれも匿名化された形で解析に用いられた。

<検討 1> 山形県地域がん登録との照合により得られた平成 20 年 12 月までの発癌状況と、住民基本台帳および死亡個票との照合により得られた予後調査のデータを分析に用いた。癌および死因の分

類には国際疾病分類第 10 版を用いた。対象者の HCV 抗体判定別に比較検討した
<検討 2>

今回の検討でコホートの開始時と追跡時で検体の利用が可能でありウイルス量が比較的安定していた 2 症例で Ion-PGM シーケンサーを用いて予備検討を行なった。次世代シーケンサーの概略は血清 Total RNA を抽出後、HCV 全ゲノム長のシーケンスを行ない、アダプター配列の除去後データベース (HCV-Con1) へのマッピングを行ない、最終的な変異を抽出した。

(倫理面への配慮)

本研究は、山形大学医学部倫理審査委員会の倫理審査の承認を受け実施された。

C. 研究結果

<検討 1> 対象者 3511 名の HCV 抗体判定結果は陰性 3452 名 (98.3%)、弱陽性 27 名 (0.8%)、強陽性 32 名 (0.9%) であった。山形県地域がん登録データとの照合の結果、5 年間の観察期間内に HCV 抗体強陽性者 32 名中 3 名に発癌を認め、そのうち 2 名に原発性肝癌 (C220) が認められた。一方、HCV 抗体陰性者では 134 名に発癌を認め、最も多かったのは胃癌 (C160~163, C169) 計 42 名であり、次に多かったのは結腸および直腸の癌 (C180, 182, 184, 186, 187, 189, 209) 計 21 名であった。HCV 抗体弱陽性者には 2 名の発癌を認め、白血病

(C441) と眼瞼 (C421) であった。HCV 抗体陰性者と弱陽性者に原発性肝癌発生は認めなかった。したがって、今回のコ

ホートのサイズでは HCV 抗体陽性者の肝発癌のリスクは高いものの、肝細胞癌に対する宿主因子をそのまま検討することは困難でより規模の大きいコホートを用いることが必要と考えられた。

<検討 2> 今回の次世代シーケンサー用いた結果についてその概要を下表に示す。

Sample	総リード数	QC 後リード数	%	Mapped reads (length bp)	Coverage (length bp) / [HCV-Con1]
Case1- pre	1,189,464	872,748	73.4	2,390 (358,984)	37.4
Case1- post	914,925	914,925	76.2	600 (92,767)	9.7
Case2- pre	1,316,011	1,007,757	76.6	298 (43,090)	4.5
Case2- post	1,530,309	1,269,615	83.0	1,077 (132,032)	13.7
平均	1,237,677	961,728	77.3		

以上より今回の次世代シーケンサーを用いた検討ではまだカバー領域が狭く手技的に安定していないため、さらなる基礎検討が必要であることが示唆された。

D. 考察

40 歳以上の住民コホートを 5 年間追跡した結果 2 例に原発性肝癌の発生および死亡を認め、いずれも HCV 抗体強陽性者からの発癌であった。本コホートは HCV 抗体陽性率 1.7% と本邦においては比較的低い陽性率の地域住民からなるが、HCV 感染が肝発癌および肝癌死亡のリスクとなっていた。しかし、実数としては発癌のイベント数が少ないため、統計学的差を出すためにはさらに拡大したコホートの活用