

厚生労働科学研究委託事業（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））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規診断法の開発

業務項目：臨床情報・検体収集および関連解析の実施（劇症化等）

わが国における B 型急性肝不全の実態

担当責任者：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

研究要旨：2010~2014年発症した急性肝不全、遅発性肝不全（LOHF）の実態調査で集計した1,061症例のうち、B型症例を対象としてその臨床像を解析した。B型は225例で全体の21.2%を占めており、急性感染127例（56.4%）、キャリア90例（40.0%）、判定不能8例（3.6%）に区分された。急性感染例は非昏睡型60例（47.2%）、急性型53例（41.7%）、亜急性型12例（9.4%）、LOHF 2例（1.6%）に分類され、各病型における比率はそれぞれ11.7%、18.0%、5.3%、5.0%であった。キャリア例は非昏睡型26例（28.9%）、急性型18例（20.0%）、亜急性型37例（41.1%）、LOHF 9例（10.0%）に分類され、各比率は5.1%、6.1%、16.4%、22.5%であった。また、HBs抗原陰性の既往感染からの再活性化が25例、HBs抗原陽性のキャリアの再活性化が26例であり、キャリア例の56.7%は免疫抑制・化学療法が原因で発症した医原病であった。非昏睡型の急性感染例は56例（93.3%）、キャリア例は16例（61.5%）が内科的治療のみで救命されたが、昏睡型ではそれぞれ17例（25.4%）、5例（7.8%）であった。肝性脳症を発症する重症化例を対象として、後方視的に遺伝子検査を実施するのは困難であることが明らかになった。

A. 研究目的

劇症肝炎は発症数が年間約 400 例と推計される [1]。厚生労働省研究班の全国調査では、1998~2009 年に発症した劇症肝炎と遅発性肝不全 (late onset hepatic failure: LOHF) は計 1,186 例が集積されており、そのうち 462 例 (39.0%) が B 型症例であった [2,3]。これら希少疾患を前方視的に集積して、その遺伝子解析を実施するのは困難である。そこで、厚労省研究班の登録例を対象として、後方視的に遺伝子解析を実施するための準備研究として、2010~2013 年に発症した B 型症例の実態を解析した。

B. 研究方法

厚生労働省の難治性疾患克服研究事業「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究」

班が平成 23~26 年度に実施した「急性肝不全、LOHF の全国調査」に登録された症例を基に [4,5]、B 型症例の臨床像を解析した。急性肝不全、劇症肝炎および LOHF は 2011 年に厚生労働省研究班が発表した診断基準に準拠した [6]。

C. 研究結果

2010~2013 年に発症した急性肝不全は 1,021 例（非昏睡型 512 例、急性型 283 例、亜急性型 226 例）、LOHF は 40 例で、解析対象は計 1,061 例であった。このうち B 型は 225 例で全体の 21.2%を占めていた。

(1) 感染形式と病型

急性感染例が 127 例 (56.4%)、キャリアが 90 例 (40.0%) で、8 例 (3.6%) ではその区分が困難であった (図 1)。

急性感染例は非昏睡型が 60 例 (47.2%), 昏睡型が 67 例 (52.8%) で、後者は急性型 53 例 (41.7%), 亜急性型 12 例 (9.4%), LOHF 2 例 (1.6%) に分類された。このため各病型における比率は、非昏睡型が 11.7%, 急性型が 18.0%, 亜急性型が 5.3%, LOHF が 5.0%であった。

キャリア例は非昏睡型が 26 例 (28.9%), 昏睡型が 64 例 (71.1%) で、急性型 18 例 (20.0%), 亜急性型 37 例 (41.1%), LOHF 9 例 (10.0%) に分類された。各病型に占める比率は非昏睡型が 5.1%, 急性型が 6.1%, 亜急性型が 16.4%, LOHF が 22.5%であった。

(2) 臨床像

B 型症例全体では男が 133 例, 女が 92 例で、年齢は平均 51.2 歳 (標準偏差 17.4, 13~93 歳) であった。病型別ないし感染形式別に見ても、何れも男性が多かった (表 1)。しかし、年齢は亜急性型 (61.4 ± 13.9) と LOHF (68.1 ± 14.3) は非昏睡型 (45.3 ± 17.3 歳) と急性型 (48.7 ± 15.7) に比しては、キャリア例 (61.2 ± 15.7) は急性感染例 (43.9 ± 14.7) に比して、有意に高齢であった。

キャリア例の比率は亜急性型 (71.2%) と LOHF (81.8%) が非昏睡型 (29.5%) と急性型 (24.3%) に比して有意に高率であった (表 1)。生活習慣病, 悪性腫瘍, 精神疾患などの基礎疾患を併発している頻度と薬物歴を有する比率は、非昏睡型と急性感染例では 34.5%と 35.5%で比較的低率であったが、昏睡型の各病型とキャリアは何れも 50%以上で、特に亜急性型と LOHF で高率であった。

HBs 抗原陰性の既往感染からの再活性化が 25 例, HBs 抗原陽性のキャリアの再活性化が 26 例であり、キャリア例の 56.7%は免疫抑制・化学療法が原因で発症した医原病であった。

(3) 予後

非昏睡型は内科的治療のみで急性感染例

のうち 56 例 (93.3%), キャリア例のうち 16 例 (61.5%) および判定不能例の 1 例が救命され (図 1), 救命率は 88.0%であった (表 1)。しかし、昏睡型ではそれぞれ 17 例 (25.4%) と 5 例 (7.8%) で救命率が低率であった。病型別では急性型が 28.3%に対して亜急性型は 8.7%と低率で、LOHF に救命例は見られなかった。また、急性感染例は内科的治療による救命率が全体で 87.6%であり、キャリア例の 25.3%より高率であった。

肝移植は 26 例 (20.6%) で実施され、その救命率は 65.4%であった。このため肝移植実施例も含む全症例での救命率は 49.3%で、病型別では非昏睡型 88.6%, 急性型 31.1%, 亜急性型 17.3%, LOHF 9.1%, 急性感染例とキャリア例はそれぞれ 65.4%と 42.2%であった。

D. 考察

2010~2013 年に発症した B 型急性肝不全は 225 例で、このうち昏睡型は 137 例であった。急性肝不全 1,061 例のうち肝炎症例は 863 例 (81.3%) で、このうち従来 of 劇症肝炎, LOHF に相当する昏睡型症例は 462 例 (46.5%) で、これら症例における B 型症例の比率は 29.7%である。1998~2009 年の劇症肝炎, LOHF では B 型症例の比率が 39.0%であり [2,3], その比率は 2010 年以降には減少していることが明らかになった。なお、肝炎症例における B 型の比率は、1998~ 2009 年は急性型が 55.4%, 亜急性型が 26.7%, LOHF が 15.2%であったのに対して、2010 年以降はそれぞれ 34.1%, 25.1%, 28.9%であり、急性型における低下が顕著で、LOHF 症例ではむしろ上昇していた。なお、急性型における急性感染例とキャリア例の比率は 1998~2009 年では 3.9 : 1, 2010 年以降では 2.9 : 1 であり、特に急性感染例の比率が低下していた。一方、2010~2013 年の B 型 LOHF 症例は 9 例であるが、そのうち 7 例は既往感染の再活性化であり、de novo B 型肝炎症例の増加が比率増加に寄与すると考えられた。

E. 結論

急性肝不全, LOHFのうちB型の症例は, 再院は特に急性型で減少していると考えられた。その一方で, 免疫抑制・化学療法によるHBs抗原陰性の既往感染からの再活性化例が増加している。非昏睡型は内科的治療による予後が良好であるが, 昏睡型は予後が不良であり, 肝移植実施例も含めて, 後方視的に遺伝子検査を実施できる重症例は少数であることが明らかになった。

F. 引用論文

- (1) 森 満, et al. 難治性肝疾患の全国疫学調査成績. 厚生労働省特定疾患対策研究事業「難治性疾患の疫学研究班」平成17年度報告書, 2006, pp39-42.
- (2) Fujiwara K, et al. Fulminant hepatitis and late onset hepatic failure in Japan. *Hepatology* 2008; 38: 646-657.
- (3) Oketani M, et al. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009. *Hepatology* 2013; 43: 97-105.
- (4) 持田 智. 劇症肝炎に関する研究. 厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」平成23-25年度総合研究報告書, 2014; pp29-44.
- (5) 持田 智. 急性肝不全, LOHFの全国調査(2013年). 厚生労働省科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)「難治性の肝・胆道疾患に関する調査研究班」平成26年度報告書, 2015; 印刷中.
- (6) Mochida S, et al. Diagnostic Criteria of Acute Liver Failure: A Report by the Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. *Hepatology* 2011; 41: 805-812.

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Uchida Y, Kouyama J, Naiki K, Sugawara K, Inao M, Nakayama N, **Mochida S**. A Possible Novel Genotype HBV Strain Developing Due to Recombination between Genotypes H and B Strains

Isolated from a Japanese Patient. *Hepatology* 2014; 44: 1130-1141

- (2) **Mochida S**, Takikawa Y, Nakayama N, Oketani M, Naiki T, Yamagishi Y, Fujiwara K, Ichida T, Tsu-bouchi H. Classification of the etiologies of acute liver failure in Japan: A report by the Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan. *Hepatology* 2014; Feb 17. doi: 10.1111/hepr.12295. [Epub ahead of print].
- (3) Harigai M, **Mochida S**, Mimura T, Koike T, Miyasaka N. The proposal for management of rheumatic disease patients with hepatitis B virus infection receiving immunosuppressive therapy. *Modern Rheumatology* 2014; 24: 1-7.

2. 学会発表

- (1) Nakayama N, Tsubouchi H, **Mochida S**. Clinical features and outcome of acute liver failure due to HBV infection in Japan. 11th JSH Single Topic Conference, 2014 Nov, Hiroshima.
- (2) Nakao M, Uchida Y, Kouyama J, Naiki K, Sugawara K, Inao M, Nakayama N, **Mochida S**. Possible mutant nucleoside sequences in the polymerase region of HBV gene responsible for multiDrug resistance against nucleoside/nucleotide analogs. 11th JSH Single Topic Conference, 2014 Nov, Hiroshima.
- (3) Uchida Y, Kouyama J, Naiki K, Nakao 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. 11th JSH Single Topic Conference, 2014 Nov, Hiroshima.
- (4) Nakayama N, Tsubouchi H, **Mochida S**. The etiology, clinical features and outcome of acute liver failure in Japan. The Liver Meeting, AASLD, 2014 Nov, Boston.
- (5) 中尾将光, 内田義人, 中山伸朗, **持田智**, 溝上雅史. 免疫抑制療法によるHBV再活性化: 治療が長期に亘った場合の再活性化の実態, 第50回日本肝臓学会総会, 2014年5月, 東京.

(6) 中山伸朗, 内田義人, 持田 智. わが国における急性肝不全の実態から見た治療戦略の展望. WS-3「急性肝不全: 予後向上を目指す新規治療法の展望」JDDW2014, 2014年10月, 神戸.

(7) 中尾将光, 内田義人, 持田 智. 核酸アナログ多剤耐性のHBV変異株: 新たな遺伝子変異の可能性. PD-2「B型肝炎の新展開」第40回日本肝臓学会東部会, 2014年11月, 東京.

(8) 中山伸朗, 持田 智. 肝移植を実施した急性肝不全例における予後予測: 新ス

コアリング法と決定木法での評価. W-1「急性肝不全の内科的治療と肝移植のup to date」第40回日本肝臓学会東部会, 2014年11月, 東京.

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

3. その他

なし

図1. 急性肝不全, LOHFにおけるHBV感染 (2010~2013年 : 225例)

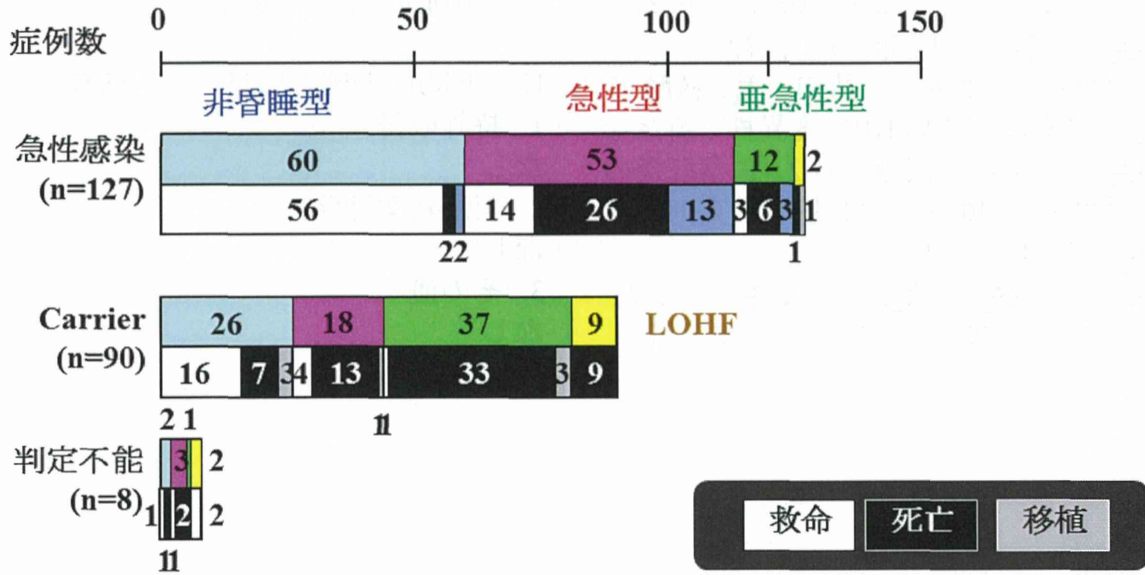


表1 B型急性肝不全, LOHF (2010~2013年 : 225例)

	病 型				感染形式	
	非昏睡型 (n=88)	急性型 (n=74)	亜急性型 (n=52)	LOHF (n=11)	急性感染 (n=127)	キャリア (n=90)
臨床像 (¹ 症例数 ² 平均±SD, ³ %) *p<0.05 vs 非昏睡方&急性型, #p<0.05 vs 急性感染						
男:女 ¹	48:40	45:29	30:22	10:1	71:56	57:33
年齢 ²	45.3±17.3	48.7±15.7	61.4±13.9*	68.1±14.3*	43.9±14.7	61.2±15.7#
キャリア ³	29.5 (26/88)	24.3 (18/74)	71.2* (37/52)	81.8* (9/11)	0 (0/127)	100 (90/90)
基礎疾患 ³	34.5* (30/87)	58.3 (42/72)	65.4* (34/52)	81.8* (9/11)	35.5 (44/124)	73.3* (66/90)
薬物歴 ³	41.2* (35/85)	51.5 (35/68)	70.8* (34/48)	70.0* (7/10)	40.8 (49/120)	66.7* (56/84)
救命率 (%)						
内科治療	88.0 (73/83)	28.3 (17/60)	8.7 (4/46)	0 (0/10)	67.6 (73/108)	37.3 (31/83)
肝移植	100 (5/5)	42.9 (6/14)	83.3 (5/6)	100 (1/1)	52.6 (10/19)	100 (7/7)
全 体	88.6 (78/88)	31.1 (23/74)	17.3 (9/52)	9.1 (1/11)	65.4 (83/127)	42.2 (38/90)

厚生労働科学研究委託事業（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））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：HB 感染集積家系における宿主因子の探索：北海道における家族内感染
担当責任者：夏井坂 光輝 北海道大学病院 助教

研究要旨：本分担研究で我々は、同一家系内に集積する慢性HBV感染者を対象にGWAS
解析を実施し、B型慢性肝炎発症およびB型肝炎ウイルス排除に関わる新しい宿主遺伝要
因を探索することを目的に本研究は遂行される。現在対象者の検索および臨床データ、
検体の収集調査を行い、DNA検体収集を進めている。本研究の成果によりB型肝炎の自
然経過に関連するあらたな宿主遺伝子多型が見いだされる可能性がある。

A. 研究目的

日本全国における B 型肝炎ウイルスキャ
リア率 (HBs 抗原陽性率) は 1.3% であるが、
北海道のそれは 2.4% と高率であることが
知られている。HBV 感染母体からの垂直感
染による HBV キャリアは 20 歳代までにセ
ロコンバージョンを来たし臨床的治癒に向
かう症例 (85%) と、慢性肝炎に移行し、
肝硬変・肝臓癌に発展する症例(15%)に二分
される。これまで日本人を含むアジア人サ
ンプルを用いた GWAS から、HBV 慢性感
染の経過に関連する遺伝子多型として、
HLA-DPA1, -DPB1 が同定されている
(Kamatani et al. 2009)。しかしそのオッズ比
は低く他の宿主遺伝要因が存在することは
明らかである。

本分担研究の目的は、同一家系内に集積
する慢性 HBV 感染者を対象に GWAS およ
び全エクソーム解析を実施し、B 型慢性肝
炎発症および B 型肝炎ウイルス排除に関わ
る新しい宿主遺伝要因を探索することであ
る。

B. 研究方法

1. 家系調査と検体収集：HBV 多発家系内
の症例を中心に臨床データ、検体の収集調
査を行う。

2. 既知の遺伝子関連解析：

HLA-DPA1/DPB1/DQ (Kamatani, Nat Gen
2009; Nishida, Plos One 2012)

3. 探索的遺伝子解析：慢性感染、肝発癌、
肝線維化進展に関連する遺伝子のスクリー
ニング、絞り込みを行う。

(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。

被験者各人に説明文を用いて書面と口頭
で説明し、文書による同意を得る。

C. 研究結果

HBV 慢性感染多発家系内の症例を中心

に臨床データ、検体の収集調査を行い、HBV 感染 21 家系、3 人以上の HBV 陽性兄弟 9 家系を同定した。現在臨床情報の収集および、DNA 検体収集を進めている。

D. 考察

現在 B 型肝炎関連 SNP として HLA-DP が同定されているが、本研究では HLA を共有する同一家系間で生じる異なった HBV 感染臨床像の患者を対象にすることによりあらたな関連遺伝子多型が同定される可能性がある。

E. 結論

本研究の成果により B 型肝炎の自然経過に関連するあらたな宿主遺伝子多型が見いだされる可能性があり、引き続き症例情報の集積を遂行する。

F. 研究発表

1. 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, **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.
- (2) 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 Dec 15;13(24):3857-66.
- (3) 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*. 2014. In press.

- (4) Kagawa S*, **Natsuizaka M*** (* contributed equally), Whelan KA, Facompre 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.
 - (5) 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.
 - (6) 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*. 2014. In press.
 - (7) 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. 2014;53(18):2079-82.
- ##### 2. 学会発表
- (1) **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.

- (2) 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 endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration and next-generation deep sequencing. Digestive Disease Week and the 115th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Chicago, May 3-6, 2014.
- (3) Whelan KA, Kagawa S, Guo A, Natsuizaka M, Kinugasa H, Ohashi S, Kita Y, Natsugoe S, Naganuma S, Klein-Szanto AJ, Amaravadi RK, Rustgi

AK, Nakagawa H. Autophagy regulates esophageal cancer stem cell phenotypic plasticity by targeting mitochondria and oxidative stress. Digestive Disease Week and the 115th annual meeting of the American Gastroenterological Association, Chicago, May 3-6, 2014.

- (4) 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.

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

厚生労働科学研究委託事業（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））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規診断法の開発

業務項目：臨床情報・検体収集および関連解析の実施

担当責任者：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消化器内科 助教

研究要旨：(1) B型肝炎関連肝癌（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、問診および過去の診療記録により調査した。母親、同胞にHBV慢性感染が判明している例はそれぞれ43例（34%）、32例（26%）、HCC歴が判明している例は8例（7%）、9例（8%）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明らかではなかった。

(2) 当院当科の外来通院中の、肝細胞癌のない慢性B型肝炎患者の検体を収集中である。発癌例の検体は既に収集したため、現在は無症候性・無治療の例や、拡散アナログ製剤投与例など、比較的経過良好な例を対象としている。臨床検査値や治療内容と効果、家族歴の情報などとともに、網羅的遺伝子多型解析に提供する予定である。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）感染症は世界で最も蔓延しているウイルス肝炎であり、我が国でも100万人を超える持続感染者が存在する。HBVを感染宿主から完全に排除することは出来ず、持続感染者の一部は肝硬変や肝細胞癌の発症に至り、致命的経過をたどるため、HBV関連肝疾患は今後も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。従来、HBV関連肝癌の発生には、家族歴が危険因子となることが指摘されていたが、未だ正確な実態は明らかではない。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家族歴ほかの臨床的因子や、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。また外来通院中の発癌歴のない慢性 HBV 感染患者をリストアップし、本研究への同意を得られた患者の検体を収集する。本学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た研究計画に基づき、患者の同意を得て血球の採取、保存を行い、本学および共同研究施設にて網羅的遺伝子多型解析を実施する。

（倫理面への配慮）

新 GCP を遵守し、臨床試験の目的・方法、検査の副作用、患者に関する個人情報、守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した。

C. 研究結果

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233人の

うち、書面による同意が得られている 150 例余りの検体を抽出し、網羅的遺伝子解析に用いた。

さらに現在、外来通院中の、いわゆる無症候性キャリアや、核酸アナログ製剤内服中の比較的経過が良好である慢性 HBV 感染患者の検体を収集中であり（平成 26 年末時点で 30 検体を収集）、今後匿名化処理のち網羅的遺伝子解析に用いる予定である。

B 型肝炎関連肝癌 (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、問診および過去の診療記録により調査した。母親、同胞に HBV 慢性感染が判明している例はそれぞれ 43 例 (34%)、32 例 (26%)、HCC 歴が判明している例は 8 例 (7%)、9 例 (8%) 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明らかではなかった。

D. 考察

本邦における新規肝細胞癌の発生は漸減傾向にあり、特に C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の減少が目立つが、HBV 関連肝細胞癌は依然減少しておらず、今後も数十年にわたり、一定数の発癌例が認められると推測される。

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、患者の同胞や両親の臨床情報を得るために、ほとんど患者本人の口述（およびそれを医師が記載した過去の診療録）に頼るしかなく、正確な評価は予想以上に困難であった。基本的な問診の重要性を再認識する必要がある。

臨床において核酸アナログ製剤が広く用いられ、慢性 HBV 感染患者の肝線維化の進行や肝発癌が抑止されるようになってきた。将来、HBV 関連肝癌の病像、疫学は大きく変わる可能性が高い。その中で患者の家族歴の有無が例えば高発癌リスク例の囲い込みなどに一定の意義を持つか、今後も検討が必要である。

E. 結論

これまでの検討では家族歴の有無による発癌や生命予後への影響は明らかではなかった。

外来通院中の慢性 HBV 感染患者の検体を収集中であり、臨床情報を加え、今後の研究班における網羅的多型解析に用いる予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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. [Epub ahead of print]
- (2) Asaoka Y, Tateishi R, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, **Koike K.** Frequency of and predictive factors for vascular invasion after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2014 Nov 14;9(11):e111662.
- (3) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, **Koike K.** Impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatol Res.* 2014 Oct;44(10):E137-44.
- (4) 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 Oct;44(10):E32-7.
- (5) 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 Sep;26(9):1039-46.
- (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*. 2015 Feb;30(2):379-88
- (7) 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 Aug 15;135(4):871-9.
- (8) 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. [Epub ahead of print]
- (9) 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.
- (10) 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]
- (11) 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 Jun 10;433:128-34.
- (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. [Epub ahead of print]
- (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. [Epub ahead of print]
- (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. [Epub ahead of print]
- (15) Nakagomi R, Tateishi R, Shiina S, Imamura J, Fujiwara N, Asaoka Y, Kondo Y, **Koike K.** Drastically reduced neoplastic seeding related to radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2014 May;109(5):774-6.
- (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.** 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 Apr;49(4):748-54.
- (17) 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. 2014 Mar;49(3):547-54.

- (18) 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. 2014 Feb;49(2):173-84.

2. 学会発表

- (1) 田中康雄, 立石敬介, 中塚拓馬, 工藤洋太郎, 浅岡良成, 伊地知秀明, 建石良介, **小池和彦** Sharpin promotes hepatocellular carcinoma invasion through transactivating Versican expression 第73回日本癌学会学術総会
- (2) 松野達哉, 島佑介, 南達也, 小田島慎也, 近藤祐嗣, 建石良介, 江頭正人, 桂正樹, 中井雄大, 大倉直樹, 赤羽正章, **小池和彦** 超音波パルスドプラ法が診断に有用であった、肝芽腫術後・放射線化学療法後に肝静脈狭窄および門脈圧亢進症をきたした症例 第21回日本門脈圧亢進症学会
- (3) 山敷宣代, 菅原寧彦, 田村純人, 金子順一, 富樫順一, 田中智大, 野尻佳代, 青木琢, 阪本良弘, 長谷川潔, **小池和彦**, 國土典宏 肝移植後長期における移植肝臓内科医の役割 第50回日本移植学会総会
- (4) 浅岡良成, 田中康雄, 建石良介, **小池和彦** 肝臓における Hippo シグナルの役割に関する検討 第50回日本肝臓学会
- (5) 建石良介, 岡上武, 沖田極, 清澤研道, 小俣政男, 熊田博光, **小池和彦** 本邦の非B非C肝臓における NASH/NASH 近縁疾患の実態 第50回日本肝臓学会
- (6) 中川勇人, 前田慎, 平田喜裕, **小池和彦** 肝臓の恒常性維持・発癌における接着因子 E-cadherin の役割 第21回肝細胞研究会
- (7) 内野康志, 建石良介, 南達也, 佐藤雅

哉, 榎奥健一郎, 中川勇人, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 椎名秀一朗, **小池和彦** Bモードで検出困難な肝腫瘍に対するソナゾイド造影超音波下ラジオ波焼灼術

- (8) 佐藤雅哉, 加藤直也, **小池和彦** C型肝臓癌に対するラジオ波焼灼術後の再発、予後に対する MICA、DEPDC5、IL28B、PNPLA3 遺伝子多型の意義の検討 第50回日本肝臓学会総会
- (9) 建石良介, 四柳宏, **小池和彦** C型肝炎に対する DAA を用いた治療戦略 C型慢性肝炎に対するテラプレビル/PEG-IFN α 2b/リバビリン3剤併用療法の有効性 第50回日本肝臓学会総会
- (10) **小池和彦**, 小西弘記, 長岐為一郎 ウイルス排除と肝発癌抑止を目指した B型肝炎治療戦略 GSK548470(テノホビルジソプロキシルフマル酸塩:TDF)の核酸アナログ製剤未治療の代償性 B型慢性肝疾患(CHB)に対する第III相臨床試験(48週中間集計) 第50回日本肝臓学会総会
- (11) 近藤祐嗣, 近藤真由子, 中込良, 藤原直人, 南達也, 佐藤雅哉, 内野康志, 榎奥健一郎, 中川勇人, 浅岡良成, 建石良介, 椎名秀一朗, **小池和彦** 肝臓癌に対する局所療法成績向上のための工夫(技術認定を含めて) 経皮的ラジオ波焼灼術の成績向上のための技術的工夫 第50回日本肝臓学会総会
- (12) 大塚基之, 大野元子, **小池和彦** 肝炎ウイルスに対する創薬研究 抗ウイルス補助療法としての臨床応用を見すえたフラボノイドによる microRNA の成熟阻害を利用した C型肝炎ウイルス増殖抑制効果について 第50回日本肝臓学会総会
- (13) 中川勇人, 前田慎, 平田喜裕, **小池和彦** 自己免疫性肝臓疾患の病態と治療をめぐる問題点 肝臓、特に胆管上皮細胞における E-cadherin 欠失は、硬化性胆管炎を惹起する 第50回日本肝臓学会総会

- (14)佐藤雅哉, 近藤真由子, 建石良介, 加藤直也, 吉田晴彦, 小池和彦 C型肝炎における肝線維化進展をどう評価し治療するか IL28B SNPがC型慢性肝炎患者における肝線維化・炎症・脂肪化に与える影響 メタアナリシスによる検討 第50回日本肝臓学会総会
- (15)内野康志, 建石良介, 中川勇人, 中込良, 近藤真由子, 藤原直人, 南達也, 佐藤雅哉, 榎奥健一郎, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 吉田晴彦, 椎名秀一朗, 柴原純二, 小池和彦 肝障害における金属元素の役割 肝細胞癌に対するラジオ波焼灼術後再発危険因子としての血清フェリチン値 第50回日本肝臓学会総会
- (16)室山良介, 後藤覚, 松田浩一, 田中靖人, 茶山一彰, 溝上雅史, 小俣政男, 小池和彦, 加藤直也 肝疾患における自然免疫の役割 最新知見と今後の展開 腫瘍自然免疫を司るMICAのB型およびC型肝炎における役割 第50回日本肝臓学会総会
- (17)四柳宏, 渡邊嘉行, 山本博幸, 平石哲也, 及川律子, 山田典栄, 森屋恭爾, 伊東文生, 小池和彦 B型肝炎肝細胞癌における組み込みの意味 第50回日本肝臓学会総会
- (18)鈴木義之, 小西弘記, 長岐為一郎, 小池和彦, 熊田博光 GSK548470(テノホビルジソプロキシルフマル酸塩:TDF)の他剤効果不良の代償性B型肝炎肝疾患(CHB)に対する第III相臨床試験(48週中間集計) 第50回日本肝臓学会総会
- (19)建石良介, 岡上武, 小池和彦 非B非C肝癌の背景としてのアルコール性肝障害/NASHの実態 第50回日本肝臓学会総会
- (20)藤原直人, 建石良介, 小池和彦 血清酸化ストレスマーカーd-ROMsはNAFLD患者における肝炎マーカーになりうる 第100回日本消化器病学会総会
- (21)佐藤雅哉, 建石良介, 小池和彦 肝細胞癌のラジオ波焼灼術後の再発・予後を予測するノモグラムの開発 第40回日本肝臓学会東部会
- (22)藤原直人, 建石良介, 小池和彦 C型慢性肝炎患者の発癌予測においてファイブスコアは血小板数、APRI、FIB-4よりも優れたマーカーである 第40回日本肝臓学会東部会
- (23)榎奥健一郎, 奥新和也, 藤永秀剛, 堤武也, 森屋恭爾, 四柳宏, 小池和彦 糖尿病患者での肝線維化進展症例スクリーニング 第29回日本糖尿病合併症学会
- (24)佐藤雅哉, 建石良介, 康永秀生, 吉田晴彦, 小池和彦 診断群分類包括評価(Diagnosis Procedure Combination;DPC)データベースから見た我が国における肝硬変患者に対する外科的治療後の院内死亡率に関わる因子の検討 第22回日本消化器関連学会週間
- (25)大野元子, 大塚基之, 小池和彦 NAFLD/NASHの病態解析と新規治療 アピゲニン摂取によるmiRNA103の発現低下を介したNASHの病態改善効果 第22回日本消化器関連学会週間
- (26)内野康志, 建石良介, 中川勇人, 近藤真由子, 藤原直人, 南達也, 佐藤雅哉, 榎奥健一郎, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 椎名秀一朗, 柴原純二, 小池和彦 肝細胞癌に対するラジオ波焼灼術後再発危険因子としての血清フェリチン値 第22回日本消化器関連学会週間
- (27)高田朱弥, 大塚基之, 小池和彦 肝癌の予防・制御をめざすB型肝炎の治療戦略 HBs抗原に依存した肝発癌機序の解明と発癌予防法の開発 第22回日本消化器関連学会週間
- (28)南達也, 建石良介, 小池和彦 明日の肝癌診療のためのバイオマーカーの探索 C型肝炎ウイルス駆除後の発癌サーベイランスにおけるAFPの有用性の検討 第22回日本消化器関連学会週間
- (29)建石良介, 岡上武, 小池和彦 NBNC肝がんの諸問題 糖尿病治療内容が非B非C肝癌発癌年齢に与える影響 第22回日本消化器関連学会週間
- (30)浅岡良成, 御子柴直子, 小池和彦 進行

肝癌の集学的治療 予後と QOL の観点から ソラフェニブ長期投与が可能であった肝細胞癌症例の QOL に関する検討 第 22 回日本消化器関連学会週間

(31) 藤原直人, 建石良介, 小池和彦 高齢者肝疾患の最適医療 個別化医療の工夫 肝細胞癌患者においてサルコペニアは年齢よりもより強い予後予測因子である 第 22 回日本消化器関連学会週間

(32) 近藤真由子, 建石良介, 中込良, 藤原直人, 佐藤雅哉, 南達也, 内野康志, 榎奥健一郎, 中川勇人, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 椎名秀一郎, 小池和彦 AFP10ng/mL 未満かつ L3 分画高値を呈する肝細胞癌の特徴 第 22 回日本消化器関連学会週間

(33) 中込良, 建石良介, 三神信太郎, 近藤真由子, 藤原直人, 佐藤雅哉, 南達也, 内野康志, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 椎名秀一郎, 小池和彦 経皮的ラジオ波焼灼術における予防的抗菌薬投与に関する前向き試験 第 22 回日本消化器関連学会週間

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

厚生労働科学研究委託事業（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））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規
診断法の開発

業務項目：大規模な検体および臨床情報収集とヒト肝由来初代培養細胞ストックの作成
担当責任者：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

研究要旨：HBV感染肝細胞癌 (HCC) の予後決定因子を探索するためには診療情報と組織、血液のセットが必要である。われわれが蓄積した試料と臨床応報はHCC切除801例(43例)、転移性肝腫瘍214例(21例)、良性疾患13例(1例)であり(括弧内は26年4月から27年2月に追加された症例数)。HCC初回切除症例の肝炎ウイルス感染の状況は、HBV(+)361例、HBV/HCV両方(+)15例、HBV/HCV両方(-)215例であり、ゲノム網羅的解析に使用可能な検体が順調に集積された。

肝細胞におけるHBV感染の病態を増悪させる因子を同定するためには、種々の遺伝子多型、遺伝子修飾を内包するヒト肝細胞リソースが必要である。ラット細断肝組織を用いて初代培養の条件を検討し、ヒト切除肝組織からの初代培養が可能となった。実際にHBV感染症例で初代培養が可能であった。生細胞の回収率は術中の温阻血時間に依存するため、虚血時間が短い外側区切除が良い適応と考えられた。また、組織片を新規臓器修復・保存液に浸漬し、低温～室温で酸素化し、修復した後に培養することで、生細胞の回収率が改善できる可能性が示唆された。

ラット、ヒト、何れにおいても成熟肝細胞を3か月以上維持し得た。また、線維芽細胞をフィーダーとして増殖する幼若細胞を見出した。現時点では完全な細胞同定には至っていないが、肝細胞への分化誘導が期待される、肝芽細胞、小肝細胞、組織幹細胞である可能性もあり、今後も解析を継続する。この細胞と線維芽細胞は凍結融解、再培養が可能であり、ほぼ無限に増殖可能であることが示された。線維芽細胞から直接肝細胞を誘導するprotocolも報告されており(i-Hep)、小肝細胞、肝芽細胞からの肝細胞誘導の可能性も考慮すると、HBV感染肝細胞を必要な時に必要なだけ供給できる系を確立するための、基礎的な知見が得られたと言える。

A. 研究目的

1. HBV 感染肝細胞癌の予後決定因子を探索するために必要な検体および臨床情報のデータセットを確立し、他の肝炎ウイルス感染あるいは肝炎ウイルス非感染例との臨床像の相異を明らかにする。また、HBV 感染における線維化、癌化のリスク因子となる宿主因子、あるいは、ウイルス因子を探索するために、ゲノム網羅的解析に使用可能な検体の収集状況を明らかにする。

2. 肝細胞における HBV の感染、増殖、炎症、

線維化、癌化の病態を増悪させる因子を同定し、新規治療を開発することを目指し、種々の遺伝子多型、遺伝子修飾を内包するヒト肝細胞リソースを構築する。

B. 研究方法

1. 組織バンク登録症例のチェック

北海道大学消化器外科 I では患者に書面で同意を得たうえで、切除組織を癌部、非癌部に分けて、凍結組織、OCT 包埋凍結組織、ホルマリン固定パラフィン包埋組織、血清、臨床情報（予後；生存・再発）を保管

してきた。

登録症例総数、肝疾患症例数、疾患別症例数、肝細胞癌の内訳 (ウイルス感染)、H26年4月から27年2月までに追加された症例数、を検証した。

2. 切除肝組織からの初代培養

A) ラット肝を用いた検討

常法の如く門脈から脱血、コラゲナーゼ灌流後に、低速遠心、比重遠心、磁気ビーズ抗体による positive selectionなどを併用して肝細胞、クッパー細胞、類洞内皮細胞、星細胞を分取、培養した。次にラット切除肝組織からの初代培養を模倣した操作を行った。

非脱血細断組織を自作の冷蔵臓器保存液で洗浄し、可及的に脱血後、コラゲナーゼ、プロナーゼ、DNaseIの混合液で消化、分散し、以下は同様に処理した。

B) ヒト肝切除症例における初代培養

肝炎ウイルス非感染症例を中心に初代培養のシステムを構築した。

インフォームドコンセントの下、肝切除直後に非癌部肝組織を3mm角程度に切り出した。直ちに自作の冷蔵臓器保存液で洗浄、脱血後、コラゲナーゼ、プロナーゼ、DNaseIの混合液でラット肝組織の処理と同様に消化、分散した。

数種類の培養液、培養条件を組み合わせ、磁気ビーズ抗体による線維芽細胞の除去、等を行い、線維芽細胞が少ない条件下で増加する細胞選別し、最長5か月にわたって継代培養し、細胞の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究の全ての担当者は、「ヘルシンキ宣言(2008年10月修正)」、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日改正、以下臨床研究倫理指針)」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」(厚生科学審議会答申、平成10年12月16日)、に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会の承認の下に実施

した。

書面によるインフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報等を厳格に管理した。

なお、今後の研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成26年11月25日、一部改正、厚生労働省)、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成26年12月22日、文部科学省、厚生労働省)、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針ガイダンス(平成27年2月9日、文部科学省、厚生労働省)に準拠して研究を遂行する。

C. 研究結果

1. 組織バンク登録症例のチェック

これらの登録症例総数は4707例であった。そのうち、肝切除症例は1199例(79例)であり、内訳は肝細胞癌切除801例(43例)、胆道癌171例(14例)、転移性肝腫瘍214例(21例)、良性疾患(肝エキノコックス症、血管腫など)13例(1例)、であった(括弧内は26年4月から27年2月までに追加された症例数)。

肝細胞癌初回切除症例の肝炎ウイルス感染の状況は、HBV(+)361例[B]、HCV(+)210例[C]、HBV/HCV両方(+)15例[BC]、HBV/HCV両方(-)215例[NBNC]であった。

2. 切除肝組織からの初代培養

A) ラット肝を用いた検討

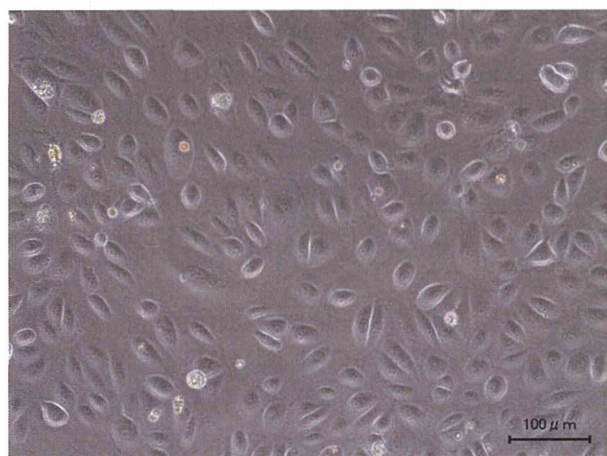
何れの方法でも4種類の肝構成細胞と線維芽細胞の培養が可能であった。培養の経過中に血清濃度、DMSO、添加因子を変えることによって、小型で旺盛に増殖する細胞コロニーを選択的に増やすことが可能であった。この小型の増殖細胞は添加因子や線維芽細胞の除去によって増殖が減速し、様々な大きさとなり、不均一な細胞集団を形成した。

B) ヒト肝切除症例における初代培養

温阻血が2時間を超えた症例では生細胞は回収できなかった。成熟肝細胞の回収率は背景肝の障害の程度と血流遮断時間に規

定されると考えられた。HBV 感染肝からの初代培養も可能であった。また、ラットでの知見と同様に、培養の経過中に血清濃度、DMSO、添加因子を変えることによって、細胞が小型化し、旺盛に増殖する条件を見出した (写真上)。

小型細胞のコロニーの中心を擦過して細胞を除去すると、24-48 時間で元の細胞よりも大型の細胞で埋め尽くされた (写真下)。これらの結果から、ヒト肝の初代培養系においても、ほぼ無限に増殖させることができる細胞集団が得られる条件があり、その細胞が培養条件によって異なる細胞形態に分化することが確認できた。肝芽細胞、小肝細胞から種々の成熟度の肝細胞への分化を観察したものと推測している。



D. 考察

組織バンク登録症例のチェック

肝細胞癌患者におけるウイルス感染の有無、種類による病理所見、予後、あるいは、背景肝組織の病態進展等を解析するに資する試料が既に収集されており、本年度も順調に症例を蓄積している。新規に集積された症例は観察期間が短いので、早期再発した症例のみが本研究に使用されることになる。

集積された試料は、本研究の主な解析対象である HBV 感染肝細胞癌はもとより、種々の比較が可能である。具体的には、a) 感染ウイルスによる相異、b) ウイルス非感染肝細胞癌症例との比較、c) 大腸癌肝転移症例との比較、d) 良性肝疾患との比較、により、各群における癌部、非癌部肝組織、血球由来 genomic DNA を比較することが可能である。さらには、他臓器の癌と肝細胞癌におけるゲノム修飾の相異も比較可能である。これらの網羅的比較解析と臨床情報 (病理、予後、治療、抗癌剤耐性等) を多変量解析することにより、新たな予後因子、治療標的分子を同定し、新規治療法の開発に結実することが大いに期待される。今後さらに肝切除症例の組織、血清検体収集、予後追跡を行う予定である (登録症例の追加と予後調査期間の延長)。

切除肝組織からの初代培養を目指した検討

ラット肝組織片、ヒト切除肝組織からの初代培養が可能であった。ヒト切除肝組織は血流遮断による温阻血障害と引き続く低温・低酸素、培養手技における復温、プロテアーゼ消化、遠心、再酸素化等のストレスが累積されるため、温阻血時間が比較的短い外側区切除が第一選択と考えられた。しかし、温阻血障害の程度は温阻血時間と肝臓の状態 (ウイルス感染、線維化、脂肪化) の程度が大きく影響するので、温阻血時間が短くても障害が強い場合もあり、症例の選択は難しい。

われわれはまず、ラットの細断肝組織片で条件を検討し、続いてウイルス非感染症例のヒト切除肝組織で検討した。組織片を

新規臓器修復・保存液に浸漬し、低温～室温で酸素化し、修復した後に培養することで、生細胞の回収率が增加する傾向があった（厳密な数的な比較はしていない）。

ラット、ヒト、何れにおいても、成熟肝細胞を単離培養は可能であり、3 か月以上細胞を維持し得たが、殆ど増殖しなかった。一方、培養後 3-4 週間から急速に増殖する小型細胞が存在し、線維芽細胞をフィーダーとして増殖する幼若細胞と推測された。肝芽細胞、小肝細胞、Oval cell などと称される細胞と推測されるが、現時点では完全な細胞同定には至っていない。

切除肝組織から肝細胞、肝芽細胞（小肝細胞）を初代培養し凍結細胞ストックを作成するための基礎的検討を引き続き行う。HBV 感染肝細胞を必要な時に必要なだけ供給できる系を確立するための重要な知見が得られたと考えている。

E. 結論

1. HBV 感染肝細胞癌の予後決定因子を探索するために必要な検体およびデータセットがほぼ確立され、ゲノム網羅的解析に使用可能な検体が順調に集積されている。

2. ヒト切除肝組織からの初代培養が可能となり、肝細胞源となることが期待される幼弱細胞の増殖が可能になった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama 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.
- (2) 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. *Hepato Res*. 2014 Nov 10.

- (3) 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 Oct 5. doi: 10.1111/cas.12549.
 - (4) 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. doi: 10.1074/jbc.M114.590950. Epub 2014 Aug 11.
 - (5) 若山 颯治, 神山 俊哉, **武富 紹信**. 【最新の消化器癌術前術後化学療法】肝細胞癌 消化器外科 (0387-2645)37 巻 4 号 Page447-455(2014.04)
- ##### 2. 学会発表
- (1) Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Yosuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, **Akinobu Taketomi**. Fatty Acid Binding Protein 5 Indicates Poor Prognosis Through Epithelial-Mesenchymal Transition In Hepatocellular Carcinoma International Liver Cancer Association 8th Annual Conference, Kyoto Japan, September 5-7, 2014
 - (2) Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, **Akinobu Taketomi**. Clinical significance of Fatty Acid Binding Protein 5 in hepatocellular carcinoma The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Yokohama, Japan, September 25-27, 2014
 - (3) Takanori Ohata, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Kenji Wakayama, Tatsuya Orimo, Tatsuhiko Kakisaka, Yosuke Tsuruga, Hirofumi Kamachi, **Akinobu Taketomi**. Fatty Acid Binding Protein 5 promotes

tumor progression through epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma AASLD2014, Boston USA, November7-11, 2014

- (4) **武富紹信**：「肝臓に対するこれからの外科治療」。県北肝疾患研究会、2014年2月18日、福島、特別講演（第一三共）
- (5) **武富紹信**：「肝細胞癌に対する分子標的治療～外科医はどう使いこなすか～」。第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、京都、ランチョンセミナー（バイエル薬品）。
- (6) 大畑多嘉宣、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、**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回日本外科学会定期学術集会、京都 4月3-5日、2014
- (7) **武富紹信**：「HCCに対する肝移植後管理」。第26回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2014年6月11日、和歌山、教育セミナー。
- (8) **武富紹信**：「データベース報告：NCDデータに基づいた肝切除術におけるリスク評価」。第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日、郡山、パネルディスカッション。

- (9) **武富紹信**：「肝胆膵がん」。第52回日本癌治療学会総会、2014年8月28日、横浜、Meet in PAL.
- (10) **武富紹信**：「肝胆膵癌の標準治療」。第52回日本癌治療学会総会、2014年8月29日、横浜、教育セッション。
- (11) **武富紹信**：「急性肝不全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大会、2014年10月19日、札幌、教育講演。
- (12) 大畑多嘉宣、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、**武富紹信** 「FABP5はEMTを介し肝細胞癌の進展を促進する」第25回日本消化器癌発生学会総会/第8回国際消化器癌発生会議、福岡 11月13-14日、2014

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

厚生労働科学研究委託事業（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））
委託業務成果報告（業務項目）

ゲノム網羅的解析による B 型肝炎ウイルス感染の病態関連遺伝子の同定と新規診断法の開発

業務項目：ウイルス因子の解析

担当責任者：脇田隆字 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長

研究協力者：杉山真也 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター 主任研究員

研究協力者：新井 理 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター 客員研究員

研究要旨：B型肝炎ウイルス感染に起因する各種の病態形成に関わる宿主因子を同定し、新たな診断法や治療法の開発に寄与することにある。そのため、全国規模で収集した詳細な臨床情報を伴う検体を用いて、大規模なゲノム多型・変異解析を実施する。また HLA-DP について大規模な関連解析を実施すると共に、HLA 分子および新規標的分子に対して、機能解析とともに、大規模化合物ライブラリーを用いた創薬シーズの探索を実施する。更にウイルスゲノムの解析を実施し、宿主遺伝要因とウイルス因子間の相互作用についても解析する。このなかでウイルス因子の解析を実施する。

A. 研究目的

HBV 感染による病態の進展には、ある特定の HLA-DP 型が関連していることが明らかとなっている。複数の施設から、慢性肝炎の発症や肝発癌との関連が報告されているが、そのオッズ比は 2 倍前後であるため、臨床応用には至っていない。

そこで、特定の HLA-DP 型が認識する相手である HBV 側の抗原配列を同定し、HLA 型と抗原配列の組み合わせを考えることによって、病態発症や進展の予測精度を向上させることを最終的な目的とする。

病態発症機序は様々な仮説をたてることができるが、HLA に結合するペプチド配列が、体内でメジャーな集団を形成するウイルス配列を認識する、もしくは認識できないことで病態発症する可能性が考えられる。また、マイナー集団を形成するウイルス配列であっても、HLA が認識もしくは、非認識となることで病態発症へと至る可能性がある。

これらの機序を検討するために、まずは各病態に特有なアミノ酸変異もしくは、ペ

プチド配列を明らかとする必要がある。それにより、HLA とアミノ酸変異を組み合わせることで、より精度の高い予後予測を目指す。

B. 研究方法

HLA-DPB1*02:01 をホモで持つ患者検体を抽出し、それらを慢性肝炎群 (CH) と肝癌群 (HCC) に分類した。各群について 11 例で、年齢を中央値で有意差がない二群を取り出した。HBV のシークエンスのために、PreS1, S2, S をカバーするプライマーセットで PCR 増幅を行った。その後、得られた産物を GS Jr. でディープシークエンスを実施した。シークエンスデータについては、アライメントまでを BWA-mem で実施し、その後のアミノ酸変換は、in house の解析システムの構築を行った。得られた多数のアミノ酸配列について、ケース (HCC) とコントロール (CH) でそれぞれにデータを一つに集約した上で、比較解析を行い、各病態に特有のアミノ酸を抽出した。