

〔研究紹介〕 腫瘍内科学教室 (その2) — 肝癌発症, 肝不全死の抑止をめざして —

横須賀 收 今 関 文 夫 深 井 健 一
神 田 達 郎 税 所 宏 光

はじめに

本教室には, 旧第一内科時代, 三輪, 奥田, 大藤の三教授を通して培われた肝疾患の臨床と研究の伝統が今も引き継がれている。特にウイルス性肝炎の分野では, 分子生物学的な手法により, 肝病態の進行抑制, 肝発癌防止を視野にとらえた新たな研究が展開しているので, 前の紹介記事に引き続きご紹介申し上げたい。

本邦における肝疾患死亡の大多数はウイルス性肝疾患に起因し, その約7-8割はC型肝炎, 1-2割はB型肝炎が占めると考えられている。その死亡原因の多くは肝癌に, 一部は肝硬変の進行による慢性肝不全, あるいは劇症肝炎による急性肝不全によるものである。従って, 如何に肝癌の発症を防ぐか, 肝不全死を防ぐかが重要であることから, これらを研究の主要テーマとして臨床的・基礎的研究を行っている。

1) C型肝炎

C型慢性肝炎は本邦における肝細胞癌, 肝不全の最大の原因である。C型肝炎は急性肝炎から高率に慢性化し, その多くが30年から40年の長い経過で肝硬変から肝細胞癌に至る疾患である。本邦では平成4年に抗ウイルス剤であるインターフェロン(IFN)が保険認可され, IFN治療が開始された。当教室でも, 平成10年までに355例の患者にIFNを投与し, その33%においてC型肝炎ウイルス(HCV)の排除に成功している。同時期にIFNを投与しなかった104例とこれらの症例を約

7年間経過観察したところ, IFN投与群では非投与群に比べ累積肝発癌率の低下が認められた。特にウイルス排除群では多変量解析でリスク比0.26と有意に肝癌の発症が抑制された。また, 生命予後についてもIFN投与群では非投与群に比べ肝癌, 肝不全などによる肝臓関連死のリスク比が0.21に低下した。なかでもウイルス排除群は全死亡のリスク比を0.22, 肝臓関連死のリスク比を0.03に低下させ, 標準化死亡比も一般人の集団と変わらないことから, 肝臓病の無い人と同等の生命予後が期待できることを示した[1]。

平成13年12月から内服の抗ウイルス剤であるリバビリンをIFNに併用する6ヶ月治療が始まった。当教室の成績では約100例の治療患者のうち, 全体では43%にウイルス排除が見られ, 難治と考えられている1型高ウイルス例でも従来のIFN単剤による約5%程度のウイルス排除率が併用治療では23%に向上した。平成16年12月からは新しいIFN製剤であるペグイントロンとリバビリン併用療法(12ヶ月投与)が始まり, 今後はC型肝炎患者全体の60~70%の症例が治癒すると期待される。当教室ではさらに, 肝硬変など進展例で治療が困難な患者における成績の向上をめざしてIFNの長期投与などについても検討中である。

しかしながら, 1型高ウイルス例ではなお約半数がIFNとリバビリン併用治療でもウイルス駆除ができない。そこで治療抵抗性HCVの特徴を検討し, より効果的な治療に結びつけるために, IFNとリバビリン併用治療の有効例, 無効例にお

けるHCVの全塩基配列を解析した。その結果、治療無効群では治療中および治療前のHCV-RNA変異の出現頻度が、再燃群、持続陰性化群に比べて少ないことが明らかになった(表1)。治療抵抗例では、特にHCVのNS5A領域の変異が少ないことから、薬剤に抵抗性を有するHCVが存在することが示唆されるが、生体側のHCV排除能が減弱していることも否定できない。今後はC型慢性肝炎患者約500例から集めた末梢血DNAを用いて治療効果に関連する遺伝子のSNP解析などを行い、生体側因子について検討する予定である。

表1 治療前期間/治療期間における全長配列の変異率

| | 反応例 | 不応例 | |
|-------------------------------|----------|----------|-----------|
| 核酸変異 (10^3 nt/site/year) | | | |
| 治療前期間 | 16.8±5.7 | 10.7±3.9 | * P=ns |
| 治療期間 | 23.6±4.2 | 14.7±6.8 | ** P<0.05 |
| アミノ酸変異 (10^3 aa/site/year) | | | |
| 治療前期間 | 14.0±4.8 | 10.1±5.2 | * P=ns |
| 治療期間 | 18.8±3.6 | 10.3±4.6 | ** P<0.05 |

Mann-Whitney's U test, Wilcoxon signed-ranks test

また、C型慢性肝炎のIFN治療効果や病期の進行に肝臓の脂肪化が関係するという報告や、HCV感染とインスリン抵抗性が関連するという実験動物モデルの報告がある。現在、C型慢性肝炎患者、無症候性キャリア、ウイルス駆除患者における糖尿病の有病率、インスリン抵抗性などを調査し、糖尿病などの生活習慣病とC型肝炎との接点について検討中である。

近年、肝炎ウイルスの基礎研究分野ではいくつかの大きなブレイクスルーが見られている。その一つは、HCVレプリコンシステムの登場である。今までHCVは培養細胞での増殖は困難であったが、HCVレプリコンはNS5A領域に変異を導入することにより、ヒト肝癌細胞Huh-7にて効率よく増殖することが判明した。我々は、米国ロックフェラー大学Rice教授からレプリコンプラスミドの供与を受け、独自にC13-3細胞というHCVレプリコン/Huh-7細胞株を樹立し、HCVの病態解明、薬剤の作用機序解明に努めている[2,3]。

この実験系を用いてインターフェロン、リバビリン併用療法はHCV遺伝子の変異率を上昇させること、HCVの増殖によって、NF-kBおよびAP-1シグナルの活性化が増幅されることを明らかにした。現在、治療有効例・無効例にみられた変異をHCVレプリコン遺伝子に導入し、治療耐性のメカニズムを解明しようと考えている。

2) B型肝炎

B型肝炎は不完全二本鎖DNAウイルスであるヒトB型肝炎ウイルス(HBV)による感染症で、母子感染などに引き続き持続感染が成立したHBVキャリアと、一過性の感染であるB型急性肝炎とがある。本邦においては1986年に母子感染防止事業がスタートし、新たなHBVキャリアの発生予防策が講じられているものの、まだ約150万人のHBVキャリアが存在すると推定される。HBVは、それ自身では肝細胞障害は起こさないが、ウイルス蛋白により惹起誘導された細胞障害型T細胞により肝細胞壊死がおり肝炎が発症すると考えられている。

B型慢性肝炎に対し、2000年より核酸アナログであるラミブジンが治療薬として認可され、その強力な抗ウイルス効果によりHBVが減少し、肝炎も沈静化することが認められている。しかしながら、治療中止後にほとんどの症例で肝炎が再燃することが明らかになってきた。我々はHBVのcovalently closed circular DNAが治療にもかかわらず残存し、ウイルスが再増殖することが、その原因であることを示してきた。もうひとつの問題としてラミブジンの長期投与に伴う耐性ウイルスの出現が高頻度(年率約20%)にみられることが挙げられる。ラミブジンに対する耐性はウイルスのポリメラーゼ蛋白の重要なモチーフであるYMDDの変異が関与している。我々は、投与前のGPT値が高値の症例では、変異株の出現は低く(年率5%弱)、ラミブジン治療の効果が長期に期待されることを示している。また、抗ウイルス剤に加えて、HBVワクチンを投与し免疫能を増強することで、長期の肝炎の沈静化が得られるか、倫理審査委員会の承認を得て検討中である。最近、ラミブジン以外にもいくつかの核酸アナログが開発され、ラミブジン耐性ウイルスの出現例に対するアデフォビルの有効性・安全性が証明さ

れ、使用可能となった。さらには我々も臨床治験に参加しているエンテカビルも、近い将来使用可能となると考えられる。我々は、B型肝炎の自然史を踏まえて、このような状況に対応した最適な治療法を検討中である。

これまでに我々は無症候性キャリアから慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌までの各病態、あるいは劇症肝炎における感染HBVの全塩基配列およびアミノ酸配列との関連につき検討してきた。その結果、HBVのコア蛋白における特定領域の変異が慢性肝炎の活動性と密接に関連し、この領域が受動免疫の重要な標的となる可能性を指摘してきた。またHBVの転写調節領域であるエンハンサー-2・コアプロモーター領域内の変異が肝炎の進展と関連することを示した。さらにHBVの全塩基配列を検討することで、ラミブジンに対する治療反応性の違いがウイルス側の因子で説明できないか検討し、HBVのポリメラーゼ領域の変異が反応性と関わっているという成績が得られている。

HBVは現在8つのgenotypeに分類されているが、我々はgenotypeとB型肝炎の各病態との関連について検討し、本邦ではgenotype BとCが大多数を占め、このうちgenotype Bがより強い急性肝障害を惹起することについて[4]、またgenotype BとCにおける肝発癌様式の違いについて報告してきた[5]。

HBVはヒト遺伝子に組み込まれる（integration）という性質を有しており、肝機能正常例からも肝発癌例がみられ、単純に炎症を抑えるのみでは発癌を抑制しえない症例も存在する。HBV integrationと肝発癌に関しては未だ不明な点も多く、今後さらに検討が必要と考えられる。

3) A型肝炎

A型肝炎は、近年、本邦では大流行こそみられないが、今なお急性肝炎の主要な原因であり、また劇症肝炎の約2割を占めている。我々は、A型肝炎ウイルス（HAV）が想像以上に長く血中で検出しうることを、また劇症肝炎・重症肝炎では通常の急性肝炎に比べて、ウイルスの5'非コード領域の変異が少ないことを示した[6]。現在、この違いがウイルス増殖能に影響を与え、重症化と結びつか検討している。

最近、RNA干渉（RNA interference; RNAi）により細胞内の遺伝子を特異的に抑制することが可能となった。この方法は他の遺伝子には殆ど影響がみられないことから、副作用のない創薬という意味でも有用と考えられる。A型肝炎ウイルスは一本鎖RNAでありRNAi現象の絶好のターゲットと考えられる。独国リューベック大学Gauss-Müller教授らとの共同研究により、HAVレプリコン、また、独自に開発したHAV IRES reporterを用いて、RNAiがHAVの増殖、翻訳抑制に極めて有効なことを証明した[7]。我々はまた、インフルエンザに有効なアマンタジンがHAVの翻訳抑制に極めて有効であることを明らかにした[8]。HAVワクチンが開発された現在でも、劇症肝炎の原因に占めるHAVの割合は減少していないとされ、これらの薬剤が治療に少しでも貢献することができればと考えている。

4) E型肝炎

E型肝炎は非A非B非C型肝炎の原因の一つと考えられているが、本邦においては輸入感染症であり、多数は存在しないと考えられていた。我々は当科の非A非B非C型肝炎急性肝炎患者106名の血清を検索し、非A非B非C型肝炎患者の約6%がE型肝炎によるものであること、また亜熱帯地方にみられるHEV株と異なることを示している。

5) 自己免疫性肝疾患

自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変は少数例ではあるが、難治性の肝疾患に指定され、肝炎発症の生体側因子の鍵を握る重要な疾患である。我々は自己免疫性肝炎や原発性胆汁性肝硬変患者のSNP解析を行い、自己免疫性肝炎の遺伝子背景として、Apoptosisに関与するFas遺伝子に、有意に相違がみられることを明らかにした[9]。

6) 劇症肝炎

劇症肝炎はウイルス、薬剤などの原因により、急激に肝細胞の破壊がおり、肝性脳症を呈し、高頻度に死亡する疾患である。これまで、劇症肝炎の治療として、血液浄化療法をはじめとする集学的治療により、予後の改善がみられている。

我々は、B型慢性肝炎の劇症化例に関しては、抗ウイルス剤であるラミブジンの早期投与が有用であること、ステロイド剤の初期大量投与が有用

であることを報告してきた[10]。また劇症肝炎の最大の原因は非A非B非C型、ついでB型やA型であり、HCVによる劇症肝炎は極めて少ないことを示してきた。さらにB型劇症肝炎のウイルス側の要因として、HBVのprecore変異ウイルスがその原因の多くを占めることや非A非B非C型の一部の症例にいわゆるoccult HBVが関与していることを示してきた。

しかしながら、肝組織の破壊が非常に広範である場合には、なお生命予後の改善には限界があり、現在、その治療は肝移植を抜きにしては語ることが出来ない。また劇症肝炎の適切な治療には肝細胞死や肝細胞再生のメカニズムの解明が重要と考えられる。劇症肝炎時の肝細胞死のメカニズムとして、チトクロームCを定量したところ、通常の急性肝炎に比べ劇症肝炎では有意に増加がみられ、アポトーシスの関与が重要と考えられた。現在、肝炎におけるアポトーシスのメカニズムについて、基礎的研究を行っているところである。

また、肝再生が十分に行われないことが、生命予後の改善につながらない一つの原因と考えられる。従って、どのような治療を行えば、肝の再生を促進しうるのかが、重要な課題と考えられる。我々は肝再生に関わる遺伝子を探るために、マウス肝再生モデルを用いて、遺伝子の網羅的な検討を行い、肝再生にオステオポンチンなどの遺伝子が関与していることを示してきた[11]。また現在、どのような肝の幹細胞が肝再生に働くかについて、再生医学の専門研究者と協力して取り組んでいる。

7) 遺伝子異常からみた肝発癌抑制の試み

肝疾患からの肝癌の発生のメカニズムの詳細は不明な点が多く、それが進行肝癌治療のウィークポイントになっている。我々は、肝癌発生における、epigeneticな変化に着目し、各種肝癌細胞株に脱メチル化剤である5 Aza-C処理を行い、発現回復のみられる遺伝子を網羅的に探索した(図1)。その結果、肝細胞増殖因子に関連したHAI2などが、メチル化により発現を抑制されており、これらの遺伝子が肝癌の発症に関与する可能性が示された[12,13]。なお、同様の手法を用い、他の消化管癌において、発癌に関与する遺伝子を探索し、Divaなど、apoptosisに関連した遺伝子が、

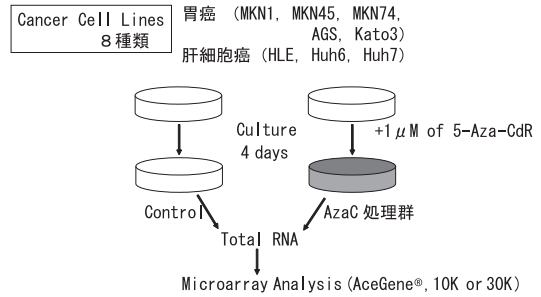


図1 メチル化により抑制されている遺伝子の網羅的探索法の模式図

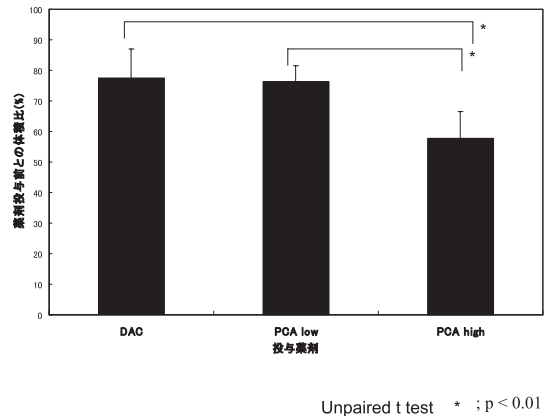


図2 5-Aza-C (DAC), プロカイン (PCA) 投与による抗腫瘍効果 (in vivo)

胃がんの発症に関与していることを明らかにしている。またprocaineやprocainamideが5 Aza-Cと同様に脱メチル化作用を有することから、これらの薬剤を用いて、in vitroおよびin vivoの実験を行い、肝癌細胞の縮小効果がみられることを明らかにした(図2)。

おわりに

これまでの成果から肝癌発症を抑止する最良の方法は肝炎ウイルス感染を断ち切ることと考えられる。そのためにはウイルス持続感染に関連したウイルス側因子、生体側因子を解明することが効率的な肝炎ウイルスの排除につながると考えられる。また、有効な肝癌予防や治療に結びつけるためには、肝癌の発症に関わる遺伝子を明らかにし、如何にその発現を調節するかが重要と思われる。その意味でこれまで明らかにしてきた肝発癌

に關与する遺伝子探索の結果を、治療法の開発に結び付けたいと考えている。また、劇症肝炎による肝不全に対する対策として、肝再生にかかわる遺伝子、幹細胞を明らかにすることが重要と思われる。これらを明らかにし、肝癌、肝不全を抑止するという夢に向けて、今後も着実に研究を継続して行きたいと願ってやまない。

稿を終えるに際し、日頃よりご指導を賜っております諸先生方に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Imazeki F, Yokosuka O, Fukai K, Saisho H. Favorable prognosis of chronic hepatitis C after interferon therapy by long-term cohort study. *Hepatology* 2003; 38: 493-502.
- 2) Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, Tanaka M, Shino Y, Shimada H, Tomonaga T, Nomura F, Nagao K, Ochiai T, Saisho H. Inhibition of subgenomic hepatitis C virus (HCV) RNA in Huh-7 cells: ribavirin induces mutagenesis in HCV RNA. *J Viral Hepat* 2004; 11: 479-87.
- 3) Kanda T, Yokosuka O, Nagao K, Saisho H. State of hepatitis C viral replication enhances activation of NF- κ B- and AP-1-signaling induced by hepatitis B virus X. *Cancer Lett* 2005; (in press).
- 4) Imamura T, Yokosuka O, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Imazeki F, Saisho H. Distribution of hepatitis B viral genotypes and mutations in the core promoter and precore regions in acute forms of liver disease in patients from Chiba, Japan. *Gut* 2003; 52: 1630-7.
- 5) Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 19-26.
- 6) Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Saisho H, Sato S, Saotome N, Suzuki K, Okita K, Kiyosawa k, Omata M. Association between severity of type A hepatitis and nucleotide variations in 5' nontranslated region of hepatitis A virus RNA: strains from fluminant hepatitis have fewer nucleotide substitutions. *Gut* 2002; 51: 82-8.
- 7) Kanda T, Zhang B, Kusov Y, Yokosuka O, Gauss-Müller V. Suppression of hepatitis A virus genome translation and replication by siRNAs targeting the internal ribosomal entry site. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1217-23.
- 8) Kanda T, Yokosuka O, Imazeki F, Fujiwara K, Nagao K, Saisho H. Amantadine inhibits hepatitis A virus internal ribosomal entry site-mediated translation in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 621-9.
- 9) Hiraide A, Imazeki F, Yokosuka O, Kanda T, Kojima H, Fukai K, Saisho H, Suzuki Y, Hata A. Fas polymorphisms influence susceptibility to autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1322-9.
- 10) Fujiwara K, Yokosuka O, Kojima H, Kanda T, Saisho H, Hirasawa H, Suzuki H. Importance of adequate immunosuppressive therapy for the recovery of patients with "life-threatening" severe exacerbation of chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1109-14.
- 11) Arai M, Yokosuka O, Chiba T, Imazeki F, Kato M, Hashida J, Ueda Y, Sugano S, Hashimoto K, Saisho H, Takiguchi M, Seki N. Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiology of mouse liver regeneration. *J Biol Chem* 2003; 278: 29813-8.
- 12) Fukai K, Yokosuka O, Chiba T, Hirasawa Y, Tada M, Imazeki F, Kataoka H, Saisho H. Hepatocyte growth factor activator inhibitor 2/placental bikunin (HAI-2/PB) gene is frequently hypermethylated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 8674-9.
- 13) Chiba T, Yokosuka O, Arai M, Tada M, Fukai K, Imazeki F, Kato M, Seki N, Saisho H. Identification of genes up-regulated by histone deacetylase inhibition with cDNA microarray and exploration of epigenetic alterations on hepatoma cells. *J Hepatol*. 2004; 41: 436-45.