トピックス

V．肝炎ウイルスの持続感染と肝発癌
1．ウイルス性肝炎に伴う肝発癌のメカニズム

本多　政夫　　金子　周一

要　旨

我が国の肝細胞癌は慢性肝炎，それも肝硬変のような進行した肝病変を発生母地とすることが大半であり，その成因の 90% がウイルス性慢性肝炎である．ウイルス学的には全く異なるB型肝炎ウイルス（HBV）及びC型肝炎ウイルス（HCV）は同じように慢性肝炎・肝硬変，更には肝細胞癌を引き起こす．病理学的には両肝炎の差異は認め難いものの，cDNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析による分子生物学的手法により両肝炎に起こる細胞内情報伝達機構の違いが明らかとなった．B型及びC型慢性肝炎から肝発癌への臨床像も多数症例の経験より明らかになっている．慢性肝炎から肝発癌へ至る分子機序を明らかにすることによって，肝疾患治療の新たなストラテジーの構築が可能になる．

〔日内会誌　97：82～91，2008〕

Key words：ウイルス性肝炎，肝細胞癌，cDNAマイクロアレイ

はじめに

本邦における肝細胞癌死亡数は年間およそ 3 万 5 千人を越え，増加傾向を示している．我が国の肝細胞癌は慢性肝炎，それも肝硬変のような進行した肝病変を発生母地とすることが大半であり，その成因の 90% がウイルス性慢性肝炎である．肝細胞癌症例におけるB型肝炎ウイルス（HBV）感染が約 30%，C型肝炎ウイルス（HCV）感染が約 60% を占めている．HBVとHCVはウイルス学的に全く異なる種に属するウイルスであるが，同じように肝細胞に持続感染し，慢性肝炎・肝硬変，更には肝細胞癌発症の主因となる．両肝炎ウイルスが発見され，HBVが約 40 年，HCVが約 20 年と経過した．分子生物学的・免疫学的アプローチに加え多くの臨床知見から，B型及びC型慢性肝炎から肝発癌へ至る分子機序も明らかになりつつある．

1．B型及びC型慢性肝炎から肝細胞癌へ至る臨床背景

当科において，予後追跡が可能であったB型及びC型肝硬変例の肝細胞癌進展についてKaplan-Meier法を用いた肝細胞癌累積進展率の成績を示す（図 1）．肝細胞癌への進展はB型肝硬変で年率約 5.5%，C型肝硬変約 7.5% であり，C型肝硬変例で高い傾向にあった．またアルコール性肝硬変からの肝発癌は症例数が十分ではないもののウイルス性肝炎に比し低い傾向が認められる（図 1）．

肝細胞癌累積進展率がB型肝硬変よりもC型肝

ほんだ　まさお：金沢大学大学院医学系研究科先端医療技術学
かねこ　しゅういち：同　恒常性制御学

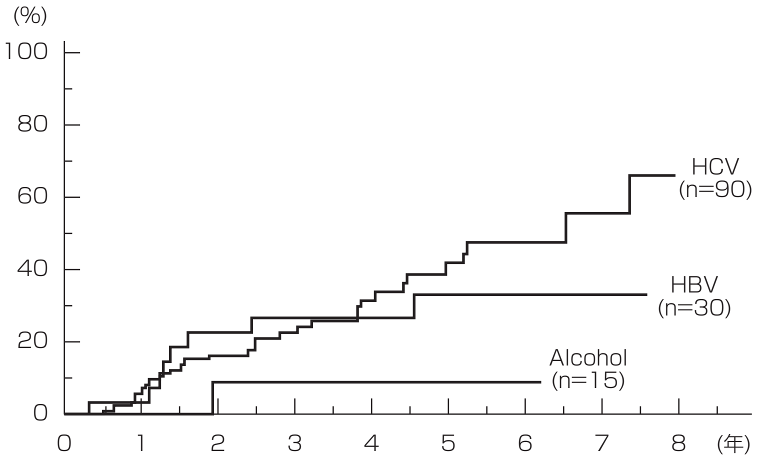


図 1. 肝硬変からの肝細胞癌累積発生率（金沢大学消化器内科）

表 1. 肝細胞癌における成因別背景因子

		HBs 抗原陽性 (n = 37)	HCV 抗体陽性 (n = 133)	p 値
年齢		58.6±10.2	62.6±8.4	＜0.01
男女比		28：9	91：42	NS
輸血歴		10 (27%)	61 (46%)	NS
アルコール歴		13 (35%)	48 (36%)	NS
背景肝	肝硬変	33 (89%)	125 (93%)	NS
	慢性肝炎	4 (11%)	8 (6%)	
臨床病期	1	24 (65%)	78 (59%)	
	2	8 (22%)	47 (35%)	
	3	5 (14%)	8 (6%)	
肝癌の肉眼的進行程度	Ⅰ	8 (22%)	37 (28%)	
	Ⅱ	9 (24%)	40 (30%)	
	Ⅲ	4 (11%)	10 (7.5%)	
	Ⅳ-A	7 (19%)	41 (31%)	
	Ⅳ-B	9 (24%)	5 (3.8%)	
画像診断による門脈浸潤	Vp0	23 (62%)	106 (81%)	
	Vp1	2 (5.4%)	9 (6.9%)	
	Vp2	3 (8.1%)	4 (3.1%)	
	Vp3	9 (24%)	12 (9.2%)	
	(不明)		1	

原発性肝癌取り扱い規約に準じる

硬変例で高い理由として，B型肝硬変例の場合，HBe抗体陰性から陽性にminor-seroconversionした症例があり，そういった症例では肝炎の活動性が沈静化し肝発癌率が低下すると考えられるのに対し，C型慢性肝炎では，肝硬変に至ってからも炎症が持続し，高率に肝細胞癌を発症してくることが一因と考えられる．

表 1 に肝細胞癌における成因別背景因子を示した．HBV関連肝細胞癌例はHCV関連肝細胞癌例に比し比較的若年であり，肝硬変に至っていない慢性肝炎からの発癌も多い．また診断時には比較的進行例で発見されることも多い．その

表 2.　SAGE ライブラリー

Normal liver	30,982 tags	8,596 unique tags
Chronic hepatitis C	30,543 tags	10,284 unique tags
Hepatocellular carcinoma C	31,381 tags	10,174 unique tags
Chronic hepatitis B	32,726 tags	11,178 unique tags
Hepatocellular carcinoma B	32,217 tags	13,372 unique tags
Normal liver pooled	97,150 tags	27,622 unique tags
Chronic hepatitis C pooled	69,322 tags	18,564 unique tags
Hepatocellular carcinoma C pooled	59,795 tags	16,689 unique tags
Chronic hepatitis B pooled	70,824 tags	19,413 unique tags
Hepatocellular carcinoma B pooled	47,009 tags	20,532 unique tags
Total	501,949 tags	156,424 unique tags

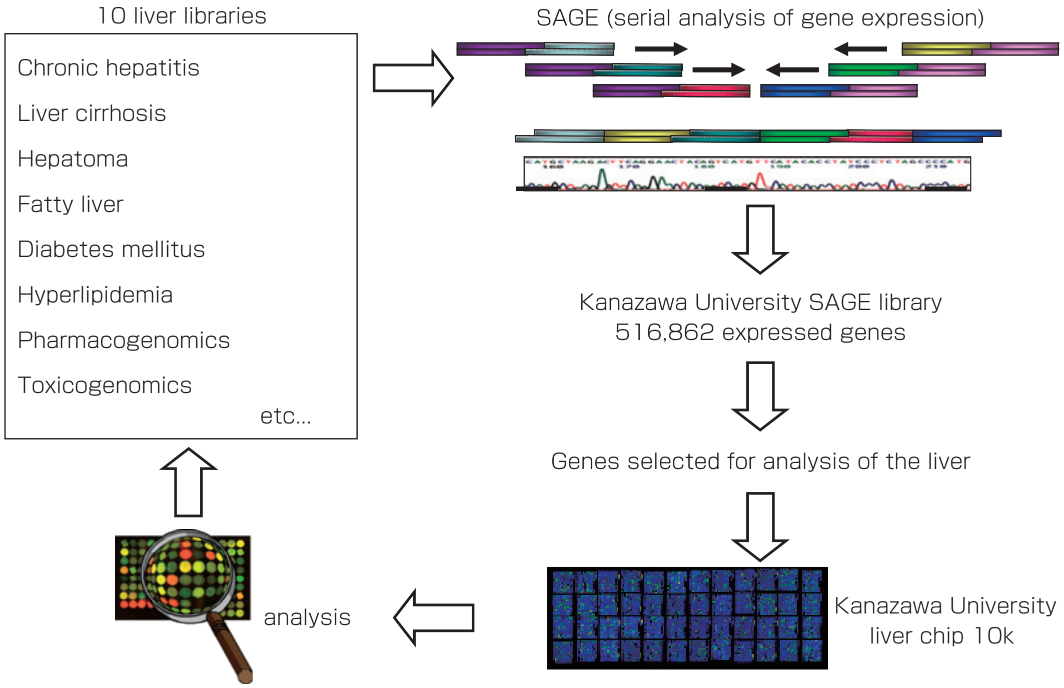


図 2.　Kanazawa Univ. in house cDNA microarray

理由としてminor-seroconversion後，定期的経過観察がなされない症例も存在するからであろう．肝硬変ではなく比較的沈静化した慢性肝炎の状態からも突然と発癌してくる症例があることがHBV関連肝細胞癌の特徴である．したがってB型肝炎ではトランスアミナーゼが正常化している症例でも発癌の可能性を念頭において経過観察を行うことが必要である．

一方HCV関連肝細胞癌は線維化の進行，肝機能の低下と共に肝発癌が増加する[1]．また肝炎を沈静化させることで肝発癌を抑制できる可能性がある[2]．

2.　B型及びC型慢性肝炎組織のトランスクリプトーム解析

前述のごとく肝細胞癌は正常肝より発生することは極めて少なく，慢性肝炎や肝硬変といっ

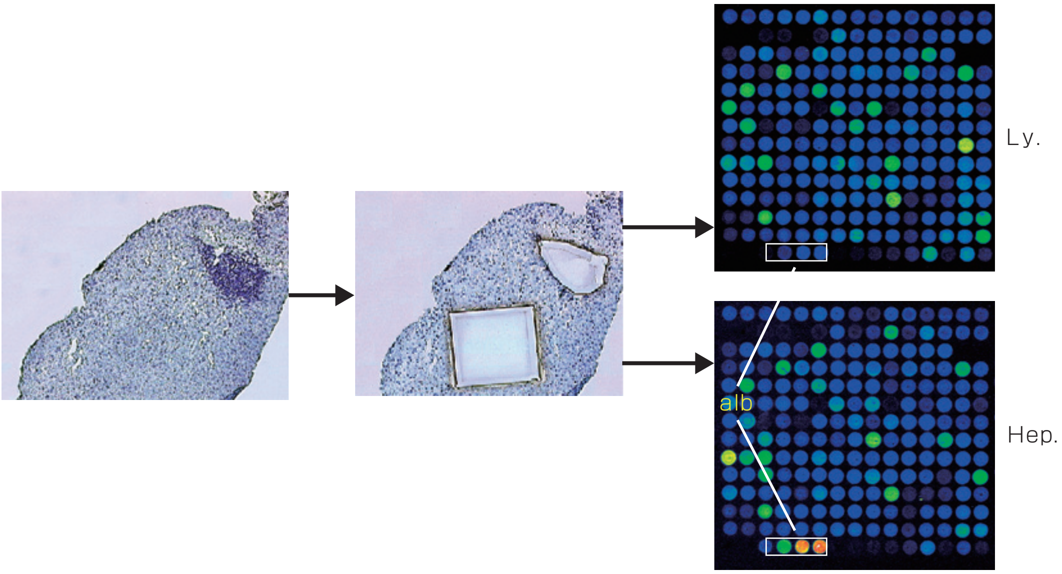


図３．　LCM 解析例

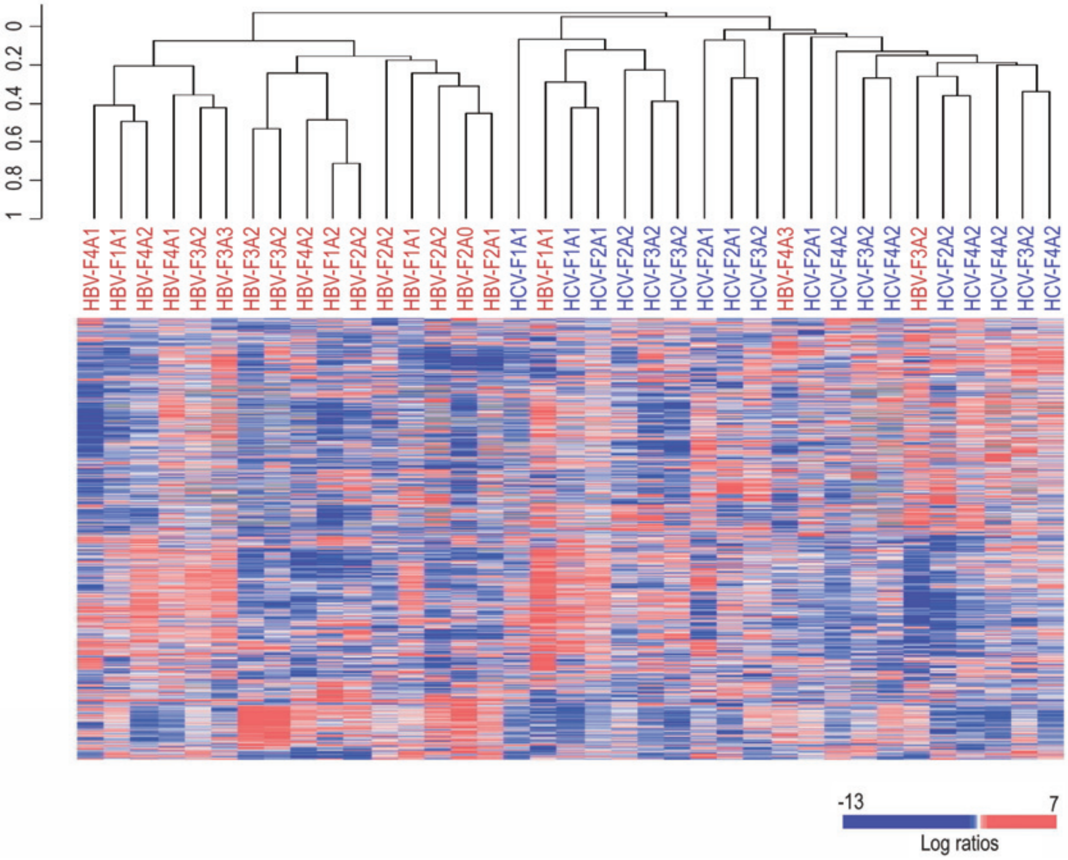


図４．　B 型慢性肝炎と C 型慢性肝炎のクラスター解析

表 3. 教師付き学習法によるクラス分類（support vector machine による）

分類カテゴリー		例数	分類決定遺伝子数 (p ＜ 0.002)	誤分類	Cross validation Permutation p-value
HBV or HCV	**HBV**	**19**	**160**	**1**	**＜ 0.001**
	HCV	**18**		**3**	
組織進行度	F1F2	17	55	10	0.402
	F3F4	20		7	
組織活動性	A0A1	13	106	6	0.173
	A2A3	24		6	
年齢	≧ 50	22	39	9	0.298
	＜ 50	15		6	
ALT 値	≧ 80	14	21	7	0.200
	＜ 80	23		6	

表 4. MetaCore を用いた B 型慢性肝炎，C 型慢性肝炎のパスウェイ解析

Frequent pathway process			Frequent pathway process		
	Whole liver tissue in CHB (n = 19)	p-value		Whole liver tissue in CHC (n = 20)	p-value
1	Caspase activation via cytochrome c	7.04E-11	1	Defense response	3.27E-06
2	Regulation of transcription, DNA-dependent	1.66E-12	2	Antigen presentation, endogenous antigen	6.79E-06
3	Intermediate filament-based process	1.24E-07	3	Golgi vesicle transport	5.22E-07
4	Calcium ion transport	9.08E-08	4	Lipid catabolism	6.61E-06
5	Regulation of blood pressure	2.94E-07	5	Regulation of cell cycle	2.43E-08
6	Protein amino acid phosphorylation	4.04E-07	6	Regulation of cholesterol absorption	1.02E-05
7	Regulation of angiogenesis	5.35E-09	7	EGF receptor signaling pathway	1.59E-09
8	TGF beta receptor signaling pathway	8.08E-11	8	Ubiquitin cycle	4.71E-05

た進行した肝病態から発生する．したがって発癌メカニズムの解明には肝細胞癌そのものの遺伝子変化に加え，その発生母地である肝炎組織における遺伝子変化の解析も重要である．我々は，SAGE（serial analysis of gene expression）法やcDNAマイクロアレイ法（表 2，図 2）により多数例のB型及びC型慢性肝炎組織の網羅的遺伝子発現解析を行い，肝発癌の分子機序を解析している[3〜6]．

SAGE法は遺伝子の発現量をヒットするtag配列の頻度で算定するため，各遺伝子の発現頻度を知ることが可能である．これまでに正常肝，B型慢性肝炎，C型肝炎慢性，B型肝癌，C型肝癌よりSEGEライブラリーを作成し，約 50 万tagシークエンスを有する世界最大規模の肝臓SEGEライブラリーを作成している（表 2）[3, 4]．

一方，SAGE法による解析は，症例数が限られるため，疾患特異的遺伝子発現パターンの同定には多数例を用いた解析が必要である．我々はSEGEライブラリーから得られた遺伝子発現情報を基にin house-DNAマイクロアレイ法を作成し，遺伝子発現解析を行っている（図 2）．

また肝生検組織サンプルからlaser capture micro-dissection（LCM）法を用いた超微量サンプルの解析を行い，肝小葉細胞，門脈域浸潤細胞を分けて採取しそれぞれの遺伝子解析を行っている（図 3）．肝炎に於いては免疫担当細胞の浸潤が顕著に認められるため，全肝組織を用いた解析は必ずしも肝細胞における遺伝子発現変化を反映していない可能性もある．LCMを用い

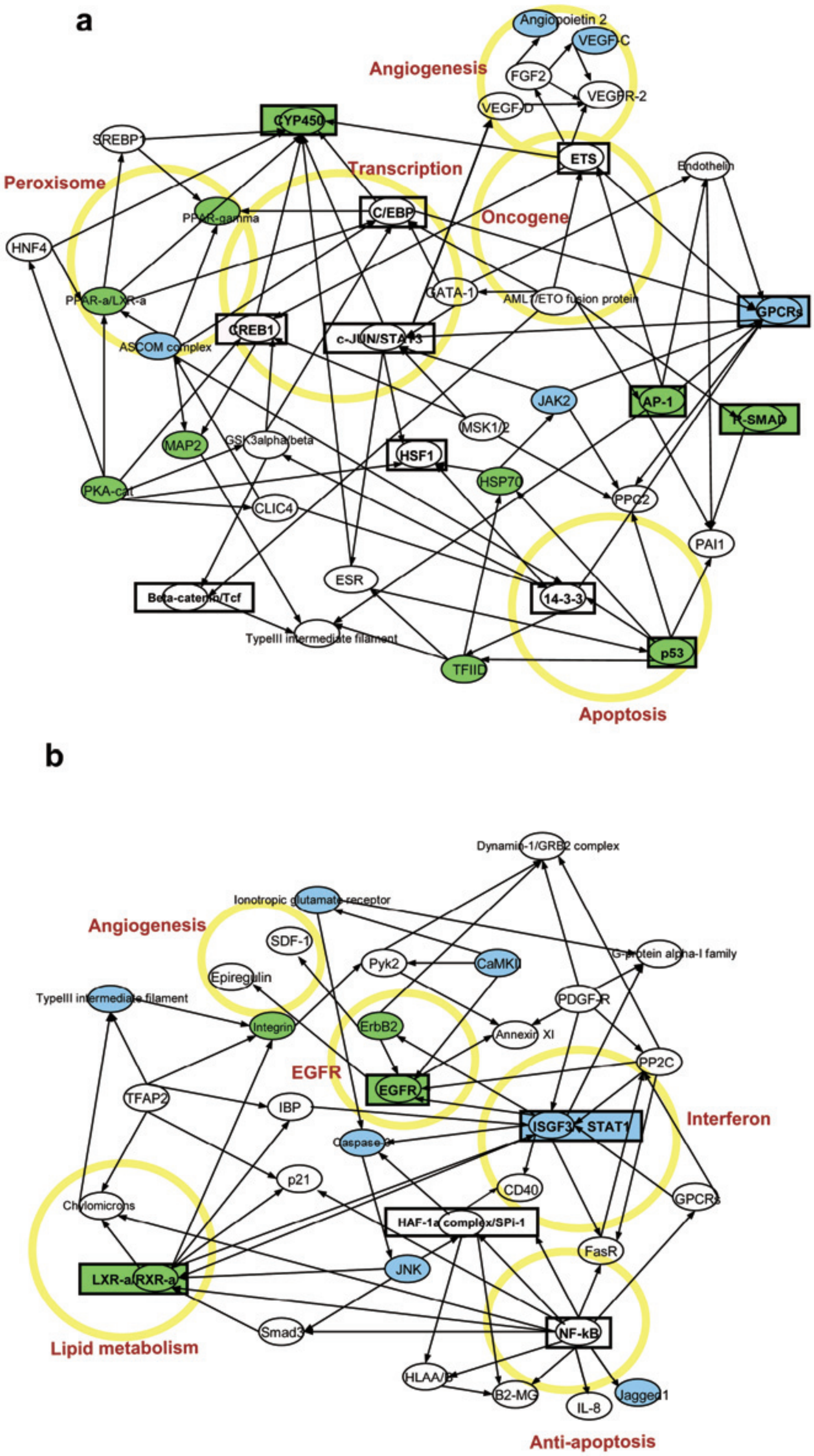


図５. Ｂ型慢性肝炎とＣ型慢性肝炎のパスウェイ解析

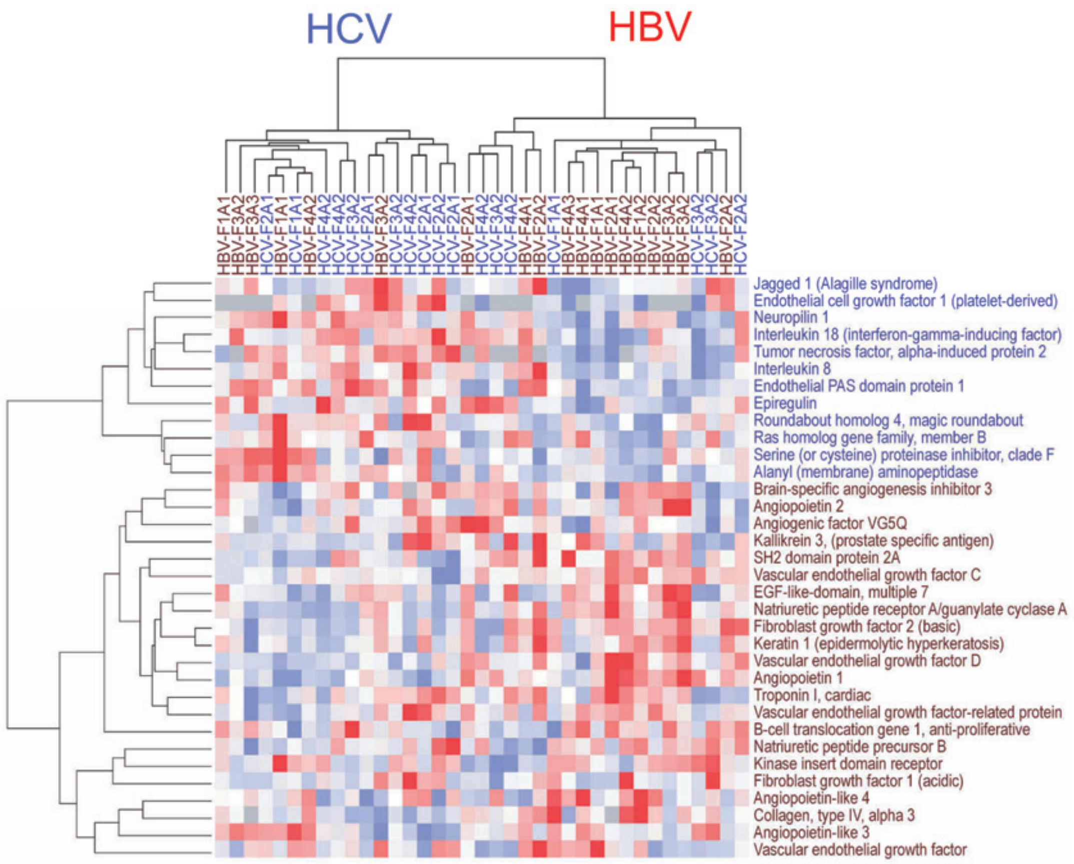
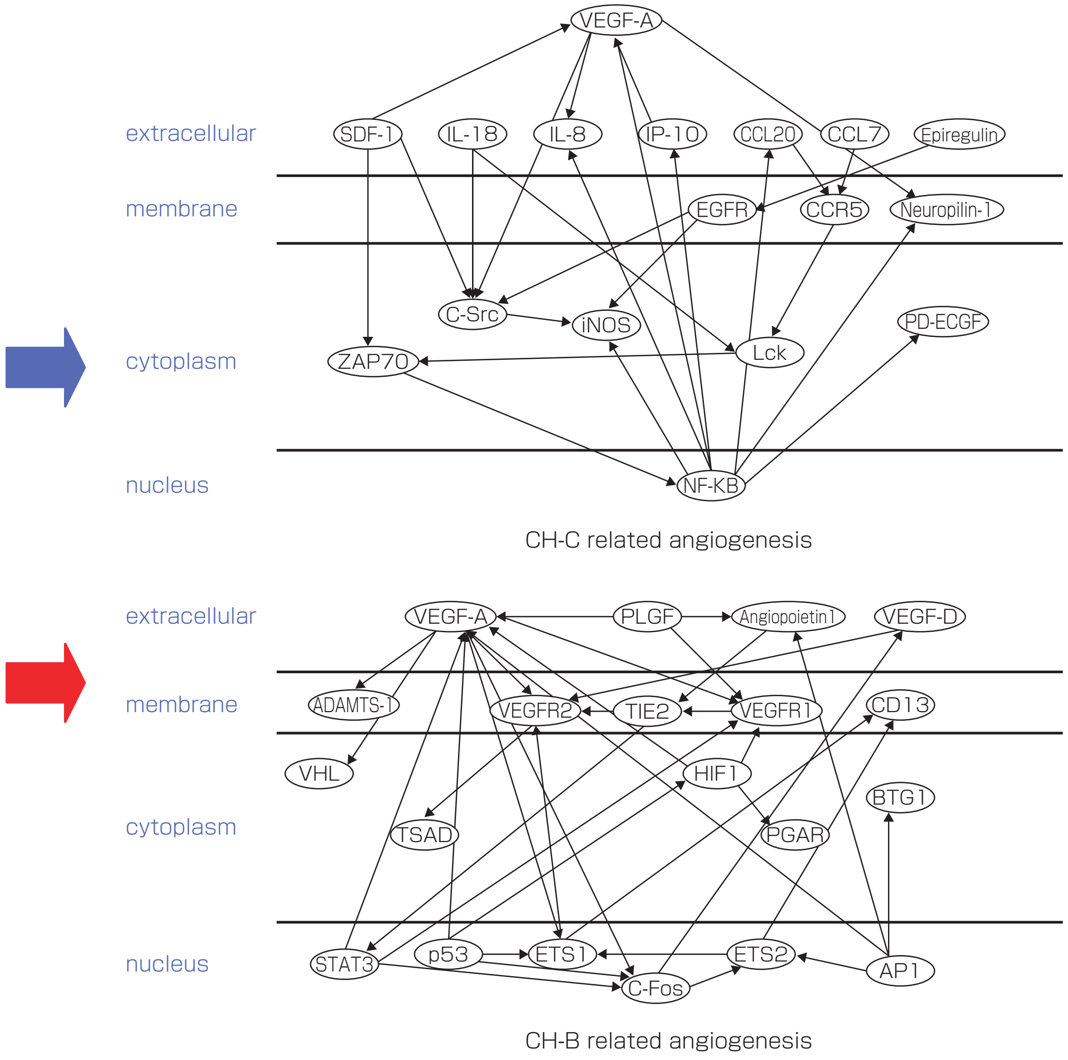


図 6. B 型慢性肝炎と C 型慢性

た組織領域特異的解析によりB型慢性肝炎，C型慢性肝炎における肝細胞での遺伝子発現変化，肝浸潤リンパ球の違いを解析することが可能になった．

B型慢性肝炎例 19 例，C型慢性肝炎例 18 例の生検肝組織を用いて両肝炎における遺伝子発現パターンを解析した．クラスター解析の結果，興味深いことに，B型慢性肝炎症例とC型慢性肝炎症例は大きく群別され，両肝炎は遺伝子発現パターンによって大きく分けられることが明らかとなった（図 4）[5, 6]．

発現パターンを分ける臨床パラメーターを教師付き学習法により検定すると組織進行度，活動性，年齢，ALT（alanine aminotransferase）値はいずれも有意ではなく，HBV感染かHCV感染かの違いが遺伝子発現パターンを分けていた（表 3）．MetaCore™（GeneGo社）を用いて遺伝子パスウェイ/ネットワーク解析を行い，両肝炎における遺伝子パスウェイの違いを検討した（表 4）[6]．B型慢性肝炎ではアポトーシス誘導や血管新生に関わるパスウェイの亢進が認められるのに対し，C型慢性肝炎では免疫応答，脂質代謝，細胞周期



肝炎で発現する血管新生因子の違い

の亢進に関するパスウェイの亢進が認められた．SAGE法で5tag以上の発現変化を認める遺伝子約1,200個とマイクロアレイで違いが認められた遺伝子約400個を用いて，MetaCore™を用いて両肝炎のシグナルパスウェイの構築を試みた（図5）[6]．B型肝炎ではアポトーシス誘導，転写因子，癌遺伝子の活性化，ペルオキシソームの活性化が認められた．一方C型肝炎ではインターフェロン誘導，抗アポトーシス，脂質代謝，EGF（epidermal growth factor）レセプターパスウェイの亢進が認められた．

このような両肝炎における遺伝子発現の違いが，異なる発癌メカニズムに繋がる可能性が示唆される．そこで，肝細胞癌で極めて重要な発癌機構の一つと考えられる血管新生に関わる遺伝子の発現について検討した．興味深いことにB型慢性肝炎とC型慢性肝炎では血管新生因子の発現パターンが大きく異なることが明らかになった（図6）．B型慢性肝炎ではVEGF（vascular endothelial growth factor）やangiopoietinの発現亢進が認められるのに対し，C型慢性肝炎ではIL（interleukin)-8，EGFレセプター，PDGF

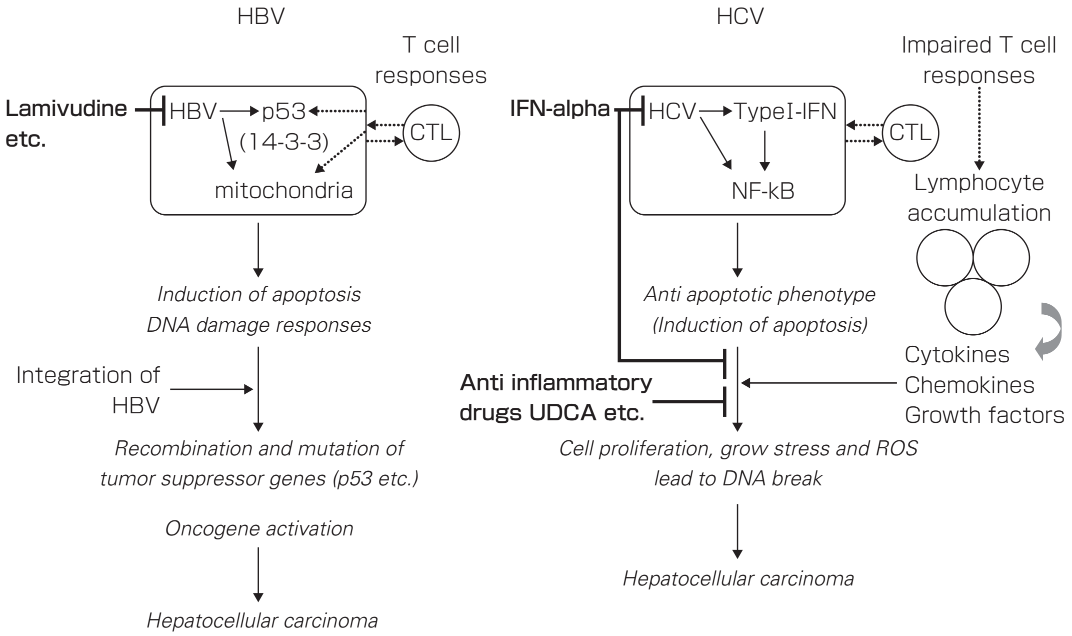


図７．Ｂ型慢性肝炎とＣ型慢性肝炎の肝発癌機序の違い

(platelet-derived growth factor）などのケモカインや炎症によって誘導される血管新生因子の発現亢進が認められた．

3．B型及びC型慢性肝炎から肝細胞癌へ至るパスウェイの違いと両肝炎に対する治療のストラテジー

これまでに我々が行ってきたB型及びC型慢性肝炎の網羅的遺伝子発現解析から推定される肝発癌の機序を図７にまとめた．これまでに，両肝炎ウイルスによる発癌機構は培養細胞や各種マウスモデルを用いて，様々な方面から解析されている．しかしながら実際の慢性肝炎肝組織に於いて如何なるシグナルパスウェイが活性化しているかを実証した報告は我々が初めてである．

B型慢性肝炎では肝細胞におけるp53を中心としたアポトーシスシグナルが顕著であった．また浸潤リンパ球では強いT細胞反応遺伝子の発現が認められ，HBV感染肝細胞に対する免疫応答も強いものと考えられる．それらに良く呼応してDNA損傷のシグナルの活性化も認められた．またHBV自身の宿主ゲノムDNAへの組み込みや宿主ゲノムDNA自身の組換え促進により，癌遺伝子の活性化が起こるものと考えられる．さらにHBVのXタンパクによる癌抑制遺伝子p53の不活化や，転写因子の活性化がアポトーシスの回避を誘導し発癌へと向かうものと考えられる．事実B型慢性肝炎組織では転写因子の活性化・癌遺伝子の活性化が認められ，これらはHBVゲノムのXタンパクやPre-S領域の作用としても報告されている．したがってB型慢性肝炎からの発癌は炎症に伴う遺伝子変化に加えウイルスそのものが有する発癌作用も極めて重要であると言える．発癌阻止を目的とした治療の観点からは，ラミブジンやエンテカビルなどの抗ウイルス薬が極めて有効と考えられる．

一方，C型慢性肝炎はタイプ１インターフェロンシグナルの活性化が顕著であり，B型慢性肝炎に比べNF-kBを中心とした抗アポトーシスパスウェイが顕著であった．これはNF-kBを中心とし

た肝再生シグナルを反映しているのかもしれない．また肝浸潤リンパ球の遺伝子発現においてもT細胞反応が阻害され，併せて肝細胞死が回避されているものと考えられた．その一方で，肝組織の門脈域に浸潤するリンパ球はC型慢性肝炎でむしろ顕著であり，それらは多くのサイトカイン・ケモカイン・増殖因子を発現していた．最近，酸化ストレスの存在が無くても増殖因子による細胞回転の亢進（増殖ストレス）のみによってDNA損傷が起こり，癌化の誘引になることも報告されている[7]．C型慢性肝炎では持続する炎症と肝細胞の再生，サイトカインや増殖因子による増殖ストレスが誘引となり発癌へ向かうものと考えられる．もちろんHCVコアやNS5Aなどのウイルスタンパクが発癌のポテンシャルを挙げている可能性はあるが，HBVほどその作用は強くないものと考えられる．炎症の存在下でそれらはより活性化される可能性がある．

したがってC型慢性肝炎からの発癌阻止を目的とした治療の観点からは，インターフェロンによる抗ウイルス療法に加え，ウルソデオキシコール酸をはじめとした抗炎症薬の投与が発癌阻止に極めて有効と考えられる．

おわりに

B型及びC型慢性肝炎から肝細胞癌発症に至る機序に関してトランスクリプトーム解析結果を中心に述べた．肝細胞癌の分子機構は未だ不明な点が多く，今後トランスクリプトーム解析に加え，ゲノム解析・プロテオーム解析を通して明らかになるものと考えられる．遺伝子発現と肝病態との関係が更に明らかとなり，肝疾患治療の新たなストラテジーの構築が可能になることが期待される．

文　献

1）Shiratori Y, et al : Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C- viral infection in Japan. Hepatology 22 : 1027–1033, 1995.
2）Tarao K, et al : Association between high serum alanine aminotransferase levels and more rapid development and higher rate of incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis. Cancer 86 : 589–595, 1999.
3）Yamashita T, et al : Comprehensive gene expression profile of a normal human liver. Biochem Biophys Res Commun 269 : 110–116, 2000.
4）Yamashita T, et al : Serial analysis of gene expression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 282 : 647–654, 2001.
5）Honda M, et al : Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. Gastroenterology 120 : 955–966, 2001.
6）Honda M, et al : Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. Hepatology 44 : 1122–1138, 2006.
7）Gorgoulis VG, et al : Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. Nature 14 : 907–913, 2005.