

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 25 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22590749

研究課題名（和文）ウイルス消失例からの肝癌発症の臨床病態と発がん予測因子の同定

研究課題名（英文）Clinical manifestations of the development of HCC and identification of predictors of carcinogenesis in patients with a VR

研究代表者

西口 修平（NISHIGUCHI SHUHEI）

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：10192246

研究成果の概要（和文）：C型慢性肝疾患へのIFN治療によってSVR例は光顕上の組織学的改善が顕著であるが、電顕での検討ではミトコンドリア(MT)の異常が残存していた。さらに、肝線維化の進行例、脂肪肝の合併や飲酒例、肝癌が発症した症例の非癌部肝組織では、電顕上MTや粗面小胞体の異常が顕著であった。次に、MT-DNAの塩基変異数ミトコンドリアの形態異常と正の相関性を認めた。IFN投与によって、MT-DNAの変異数は全例で減少した。

研究成果の概要（英文）：Before and after IFN therapy, liver biopsy tissue was collected from patients with chronic hepatitis C. Analysis of these specimens indicated that patients with an SVR had marked histological improvement according to light microscopy. Electron microscopy (EM) indicated residual defects in mitochondria (MT) in almost of the patients, even if they had an SVR. Moreover, abnormal findings in EM were readily apparent for patients with severe hepatic fibrosis, heavy drinker, fatty liver, and noncancerous liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma. The number of base mutations in MT-DNA was determined primarily in the D-loop. The number of base mutations was found to be correlated with morphological defects in MT. As a result of IFN administration, the number of mutations in MT-DNA decreased in all patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：内科、臨床、癌、感染症、病理学

1. 研究開始当初の背景

C型慢性肝炎・肝硬変に対してIFN治療を行い、SVRが得られても一定頻度で肝発がんが生じることが臨床上的重要な問題として認識されるようになった。しかし、どのような機序で、どのような特徴を有する症例に発がん

が見られるのかは、まったく解明されていなかった。

2. 研究の目的

C型慢性肝炎にIFNを投与しウイルスが完全に消失したSVR例では肝癌発症が抑制さ

れる。しかし、一部の症例では SVR に至っても肝癌が発症することが臨床的に問題となっている。現時点では、肝癌の発症リスクを評価する臨床的な指標が存在しないため、SVR 例全例を対象に長期間の経過観察を余儀なくされている。我々は SVR を達成した症例の肝組織において、発がん例と非発がん例の比較を行う事により、臨床的な発がんリスクを評価する指標を確立し、「発がんの高危険群」の囲い込みを目指す。さらに、ウイルス消失後に存在する肝発がんの要因を明確にし、それに対する対処法を工夫することで、臨床的な発がん抑制療法の構築を目指している。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子同意の得られた検体の採取

C 型慢性肝炎の IFN 治療例について、治療前と治療後 3 年目の肝組織を引き続き収集する。治療後の組織は、HCV が消失した SVR 例と消失していない non-SVR 例に分けて検討する。これらの症例には、遺伝子検索と電子顕微鏡による観察の同意を得る。これらの検体を用いてミトコンドリア DNA の塩基配列と組織の光顕および電顕観察を引き続き行う。サンプル収集を継続しなければいけない理由として、当初計画より発がん症例が少なく、現時点ではほとんどの症例が非発がん例となっており、解析症例数の増加と経過観察期間の延長が必要となったためである。

(2) 病理学的検討

通常病理学的観察において、SVR 例であっても一部は、肝細胞の脂肪化が残存し、炎症所見が残存している。炎症所見も消失し、脂肪化も見られない症例と臨床的な背景因子の差異について検討する。さらに、電顕像にどのような所見として反映されるのかもあわせて解析する。さらに、今年度はミトコンドリアの電顕的形態異常の定量評価法の確立に努める。また、ミトコンドリアの形態異常は粗面小胞体の異常を伴っており、このような細胞では ER stress の状況に陥っていると推測している。ER stress のマーカーを組織染色にて検討する。

(3) 分子生物学的検討

既に、平成 24 年度の研究結果から、ミトコンドリア DNA の変異数とミトコンドリアの形態異常は相関することが推測された。SVR 後にも残存する発がん要因についてミトコンドリアや ER stress に関連する遺伝子を中心に網羅的検索を行い、候補遺伝子を搭載した専用チップの作成を目指す。

4. 研究成果

C 型慢性肝炎における IFN 治療前後の肝組織におけるミトコンドリアの変異数の検討を行うと、IFN 投与前後で不変が 10 例、1 塩基減少 10 例、2 塩基減少 4 例であった。特に、投与前のミトコンドリア変異数が 3 塩基以上 (D-loop 領域) の症例では IFN によって変異数の減少が 14 例中 10 例に認められた (図 1)。

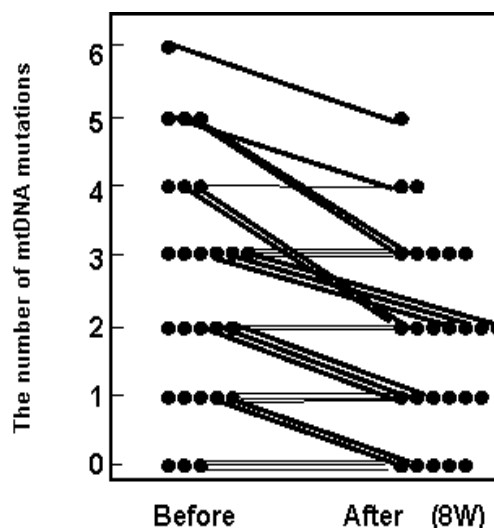


図 1 C 型慢性肝炎症例の IFN 治療前後の肝組織における mtDNA の塩基変異数

C 型慢性肝炎への IFN 投与によって SVR が得られると肝癌発症率は大幅に低下するが、それでも年率約 0.5% で発がんが認められる。我々は C 型慢性肝炎症例において肝発がんと mtDNA 変異蓄積との関連性をすでに報告しているが、SVR が得られた症例についても肝癌発症例と非発症例とで、組織学的所見と mtDNA 変異について比較・検討を行った。IFN によって SVR が得られたが、肝癌を発症した 2 例について、組織学的に検討した。入院時肝機能所見は AST 21 IU, ALT 27 IU, 非癌部の肝組織も光顕レベルでは、Stage 2 Grade 0 であり、炎症所見は皆無であり、肝細胞の軽度の腫大を認めるのみであった (図 2)。しかし、電顕像では、ミトコンドリアの増生と粗面小胞体の膨化が認められた (図 3)。

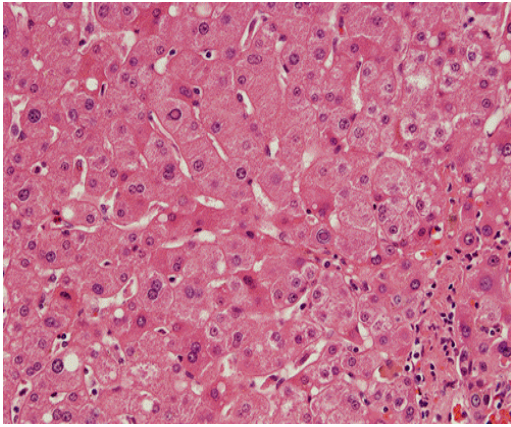


図2：症例1 光顕像

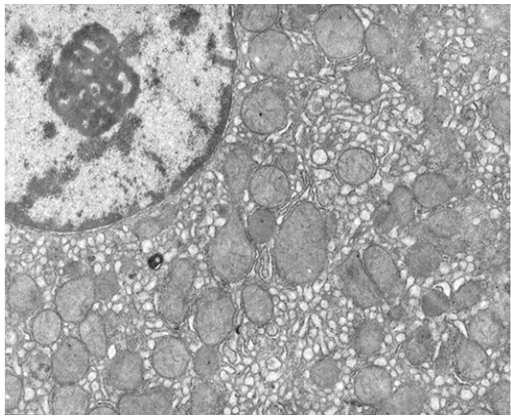


図3： 症例1 電顕像

症例2の組織所見は光顕レベルでは Stage 1 Grade 0:であり、炎症所見は皆無であるが、肝細胞の軽度の腫大と脂肪滴が認められた。電顕像では、ミトコンドリアの増生と形態異常が認められ、粗面小胞体の膨化と脂肪滴が存在した。これら2つのSVRからの発癌例では、光顕レベルでの形態的な異常はわずかであっても電顕レベルでの異常は持続していた。そこでSVRが得られた症例について、肝癌発症例の非癌部組織と、非発癌例の組織との電顕像について比較した。方法としては先に述べたように電顕像について教室の研究員3名によってblindで評価し、小胞体膨化は0~3点、ミトコンドリアの形態異常の程度は0~10点で点数化した。小胞体膨化は1点未満を軽度、2点未満を中等度、2点以上を高度と判定した。またミトコンドリア形態異常の点数では全体の分布を基に1.66点未満を軽度、1.66点以上4点未満を中等度、4点以上を高度と判定した。

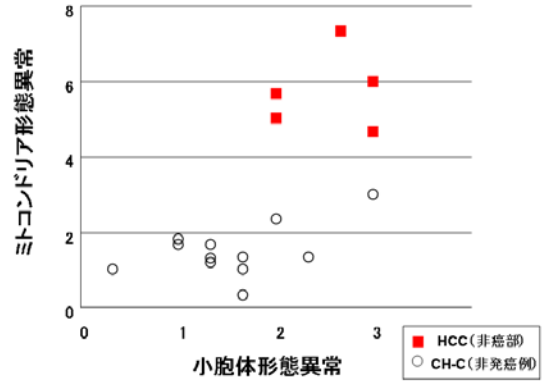


図4：肝癌合併のないC型慢性肝炎症例の肝組織と、肝癌症例の非癌部肝組織の電顕での形態異常

図4に示すように、非発癌例での小胞体の膨化は、多くは中等度以下であるが、一部は高度異常の例も含まれていた。一方ミトコンドリアの形態異常に関しては、全例中等度以下であった。それに対して発癌症例の非癌部では、小胞体の膨化は全例中等度以上であり、またミトコンドリアの形態異常も全例中等度以上であった。すなわち発癌症例では小胞体の異常に加えて、ミトコンドリアの形態異常を強く認めるという特徴があった。次いでこのミトコンドリアの形態異常と遺伝子変異(D-loopの変異数)との関係について検討した。するとD-loop領域の遺伝子変異が2個以上の異常例では、ほとんどが高度な形態異常を伴っていた。すなわちD-loopの異常と形態的な異常との相関が推測された。したがってmtDNAの塩基異常は電顕レベルでの形態異常と相関し、発癌のリスクを反映することが示唆された(図5)。

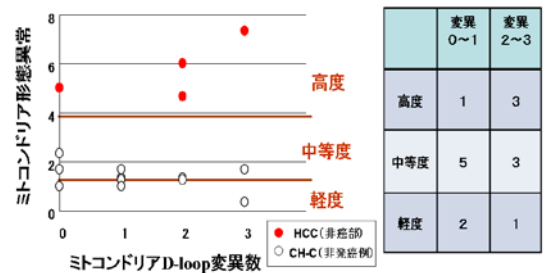


図5：ミトコンドリアの形態異常とDNA変異との相関

以上の結果から、ミトコンドリアの形態異常は発癌リスクと関係すること、さらにこの形態異常の程度はmtDNAの変異数を測定する

ことによってある程度の推察が可能であると判明した。次に SVR 症例からの肝発がんの危険因子とされている、脂肪肝の有、インシュリン抵抗性有、65 歳以上の高齢者、肝組織 F3/F4 は、それぞれの低リスク群とミトコンドリア DNA の変異数を比較すると、すべて有意に高値であった。今後症例数が増え経過観察時間が長期になり、発がん症例数が増えれば、ミトコンドリア変異数を指標とした定量的な発がん予測が可能になると考えられる。

D 考察

今回の検討で、慢性肝炎の時期において既に mtDNA に変異が存在し、特に発癌症例では、組織学的所見が軽度であっても非癌部において mtDNA の異常が多数蓄積していることが示された。また慢性肝炎の段階で生じた変異に加え、さらに肝癌組織では悪性度が増すと mtDNA 変異が増加する事も示された。一方組織学的検討から、IFN の著効例においては、光顕レベルでは改善が得られるものの電顕レベルではミトコンドリアや粗面小胞体の異常が存在することが判明した。そして SVR 症例であっても、肝癌を合併した症例の非癌部の組織では、粗面小胞体の膨化に加えて、硝子様封入体や空胞形成といったミトコンドリアの形態異常が顕著であった。以上の結果より、mtDNA の変異蓄積は高癌化状態と密接に関連することが示唆される。さらに電顕で認められたミトコンドリアや ER の微細形態の異常の意義を明らかにし、加えて電顕以外の評価法に繋げたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Enomoto H, Inoue SI, Matsuhisa A, Aizaawa N, Imanishi H, Saito M, Iwata Y, Tanaka H, Ikeda N, Sakai Y, Takashima T, Shimomura S, Iijima H, Nakamura H, Nishiguchi S, Development of a new in situ hybridization method for the detection of global bacterial DNA to provide early evidence of a bacterial infection in spontaneous bacterial peritonitis, *J Hepatol*, 査読有、56 巻、2012、85-94 DOI:21835139 10.1016/jhep.2011.06.025 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835139>

- ② Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsunami H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Genome-wide association study identified ITPA/DDR1G1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C, 査読有、20 巻、2011、3507-16

- ③ Shimomura S, Ikeda N, Saito M, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Yoshikawa S, Aizawa N, Tanaka H, Iwata Y, Enomoto H, Imanishi H, Yamamoto T, Jomura H, Nakamura H, Iijima H, Nishiguchi S, Long-term interferon therapy after radiofrequency ablation is effective in treating patients with HCV-associated hepatocellular carcinoma, *Hepatol Int*, 査読有、5 巻、2011、559-66 DOI:2144205310.1007/s12072-010-9214-2 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3034002/>

- ④ Enomoto H, Nakamura H, Nishiguchi S, The role of hepatoma-derived growth factor (HDGF) in cancer development and progression, *Curr. Res. in Gastroenterology & Hepatology*, 査読有、5 巻、2011、11-25

- ⑤ 會澤信弘、岩田一也、榎本平之、西口修平、C型慢性肝炎におけるミトコンドリア遺伝子異常とインスリン抵抗性、*消化器内科雑誌*、査読無、52 (3) 巻、2011、314-21

- ⑥ Aizawa N, Nishiguchi S, Splenectomy before antiviral therapy for patients with chronic hepatitis C with thrombocytopenia, *Nihon Rinsho*, 査読無、69 巻、2011、201-5

[学会発表] (計 6 件)

- ① 會澤 信弘、PEG-IFN a-2a/RBV 併用療法における Response-Guided Therapy の有効性の検討: IL28 との関連性を踏まえて、第 39 回日本肝臓学会西部回 (シンポジウム)、2011、12、9、岡山

②Nobuhiro Aizawa , Relationship between the mitochondria gene abnormality in liver tissues in patients with chronic viral hepatitis C and the insulin resistance, THE 62ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASE 、 2011,11,4,SANFRANCISCO,CALIFORNIA ,AMERIKA

③會澤 信弘 C型慢性肝炎組織に生じるミトコンドリア遺伝子異常と発癌に関する検討、第19回日本消化器関連学会週間(シンポジウム)、2011、10、21、福岡

④會澤 信弘 C型肝硬変に対するPEG-IFN/Ribavirin併用療法の治療成績、第19回日本消化器関連学会週間(シンポジウム)、2011、10、21、福岡

⑤會澤 信弘 慢性肝疾患組織におけるミトコンドリア遺伝子異常と肝発癌、第97回日本消化器病学会総会、2011、5、14、東京

[図書] (計1件)

①西口 修平、医薬ジャーナル社、肝硬変のマネジメント(改定版)、2011、197

6. 研究組織

(1)研究代表者

西口 修平 (NISHIGUCHI SHUHEI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：10192246

(2)研究分担者

辻村 亨 (TUJIMURA TORU)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：20227408

