

## 5. HCV と肝癌

大塚 基之, 加藤 直也, 吉田 英雄, 吉田 晴彦,  
白鳥 康史, 小俣 政男

### 1. 臨床的な見地から

#### 1-1 C型肝がんの疫学

厚生省の人口動態統計によると、日本では1998年に約90万人(936,484人)が死亡したが、そのうち肝細胞癌による死者は3万人を超えている(33,433人)。癌による死亡者内訳では、男性では肺がん・胃がんについて3位で、女性では胃がん・大腸がん・肺がんについて第4位をしめた。しかもその数は年々増えており1975年には約1万人に過ぎなかったことから、このわずか20余年で約3倍にも増加したことになる。

第14回全国原発性肝癌調査報告によると原発性肝癌の95%は肝細胞癌であるが、その最大の原因となっているのがC型肝炎ウイルス(HCV)である。東京大学消化器内科における1992-96年までの肝細胞癌患者300例についてのウイルスの内訳をみると、C型肝炎感染者が84%、B型肝炎感染者が11%だった。日本でのB型とC型のウイルス感染者数は推定150万人ずつと考えられているが、肝癌に関しては8:1ということになると、C型肝炎ウイルスがいかに癌をつくっているかということが明らかであり、さらに年々C型の肝癌の比重は増加しているため、C型肝炎ウイルスと肝癌の研究はますます重要なものとなってきていると言える<sup>1)</sup>。

#### 1-2 慢性肝炎から肝がんへの階段状モデル

C型肝炎から肝がんへの道程については、ほほどこのデ

ータも同じく、感染から約35年と推定されている。肝炎の進行に伴い肝臓は線維化が進み、ついには肝硬変に至るわけであるが、この線維化の程度と発がんとの関係を調べるため、線維化の程度を軽い線維化(F1)・中ぐらいの線維化(F2)・やや重い線維化(F3)・肝硬変(F4)に分けて発がんの程度を検討したところ、F1では年一万人当たり457人で、年発がん率に直すと0.46%だった。ところがF3ではこの年発がん率が3%、F4では7%であり、肝硬変に近いほど癌になりやすいということが明確になった<sup>1)</sup>。この点はB型肝炎ウイルスからの発がんが必ずしも線維化の進んだ肝臓から発生するのではないという特徴と極めてコントラストをなしており、発がんメカニズムそのものが異なっている可能性が高いとも言える。

C型肝炎ウイルスに対しては1992年からインターフェロン療法が開始され、これまでに20万人程度の方が投与をうけそのうち30%くらいの方のウイルスが駆除された。このC型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス療法は発がんにどのような効果をもたらしたであろうか。その点を明らかにすべく、治療により発がんリスクがどう変わったかについての多施設共同研究が行われた。それによると、大きく治療群と非治療群で区分した場合、治療群では非治療群に比べ発がんのリスクは半分(0.5)になっていた。さらに治療群の中で、「治療をうけてウイルスが駆除できた群」に限ると発がんリスクは0.2となった。一方、「治療をうけてウイルスは駆除できなかったけれどもトランスアミナーゼの変動がなくなった(すなわち肝の炎症が沈静化した)群」でも発がんのリスクは0.2となっており(図1)、このデータからは炎症を起こさないウイルスは癌を発生させないとも考えられる<sup>2)</sup>。

ちなみにこの癌の減少が線維化の程度と関連があるかどうかを検討した報告では、自然経過では先のF1からF4までの線維化が年間+0.1(すなわち10年たつとF1のひとはF2に、F3のひとはF4になることを示す)であるのに対して、インターフェロン治療によりウイルスが消失した群ではその係数が年間-0.28となり、従来改善しないと考えられていた肝臓の線維化もウイルス駆除により改善

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 消化器内科学  
(〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1)  
HCV-related hepatocellular carcinoma  
Motoyuki Otsuka, Naoya Kato, Hideo Yoshida, Haruhiko  
Yoshida, Yasushi Shiratori, Masao Omata  
Department of Gastroenterology Graduate School of  
Medicine University of Tokyo  
7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan  
TEL: 03-5800-6524  
FAX: 03-3814-0021

インターフェロン非投与群	1.000
インターフェロン投与群全体	0.516
ウイルス駆除群	0.197
ウイルス非駆除群かつALT正常化群	0.214
ウイルス非駆除群かつALT異常群	
ALT軽度上昇	0.358
ALT高度上昇	0.910

ウイルス駆除と発がんリスクの減少 (n=2890)

図1 インターフェロン投与による発がんリスクの減少 (吉田晴彦: Ann Int Med 131: 174, 1999より引用) インターフェロン非投与群の発がんリスクを1.0とした場合の、インターフェロン投与効果に応じた肝発がんリスクの減少をしめす

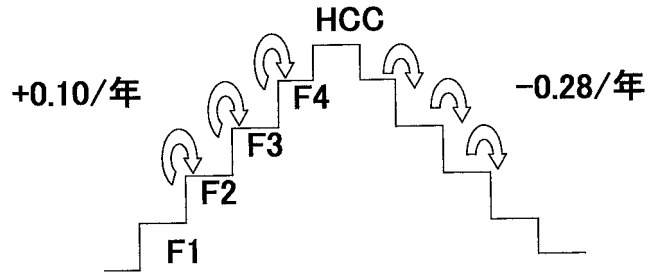


図2 線維化進行と線維化寛解の速度 (白鳥康史 Ann Int Med 132: 517, 2000より引用) C型肝炎の自然死による肝線維化の進展速度とインターフェロン投与によるウイルス駆除に伴う線維化寛解の速度をしめす。線維化速度は+0.1/年なので、たとえばF1からF2への進行はおよそ10年かかると言える

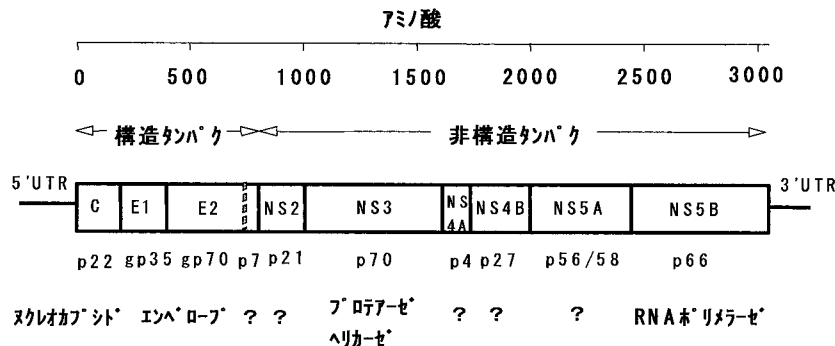


図3 C型肝炎ウイルスの構造

する (すなわち発がんのリスクを下げる可以降低) ということが明らかとなった (図2)<sup>3)</sup>。

1-3 臨床からみた肝発がんのメカニズム

以上のような臨床的な見地からC型肝炎ウイルス発がんを展望すると、C型肝炎ウイルスは肝臓の炎症を惹起し、その炎症の結果、長い年月を経て肝臓の線維化を進め、線維化の進んだ肝臓、とくに肝硬変から肝臓がんが発生してくるという図式が浮かんでくる。すなわちHCV感染に伴う長期にわたる炎症反応の結果、肝細胞の破壊と再生が繰り返されるあいだに宿主の遺伝子変異を誘発し発がんを招いているとも考えられる。しかしいっぽうで、炎症の進展だけでがんが起きるか考えると、同じように肝臓に炎症をおこす自己免疫性肝炎などのウイルス以外の慢性肝炎では癌は少なく、単純に炎症反応の結果のみでがんが発生してくるとも言い切れない。そこで、多くの癌ウイルスがそうであるように、C型肝炎ウイルスが産生するウイルス蛋白も発がんになんらかの形で寄与しているのではないかと見地からの基礎研究が数年来精力的に進められてきた。

2. 基礎的な見地から

2-1 C型肝炎ウイルスコア蛋白の作用

発がんウイルスには遺伝子が染色体に組み込まれて宿主細胞を癌化する直接的な発がん機構を持つものもあるが、HCVは一本鎖RNAウイルスであり、ヒト肝細胞の宿主DNAに組み込まれるという報告はない。HCVが属すると考えられるフラビウイルスやペスチウイルスが宿主遺伝子に組み込まれていたという報告もなく、HCV自体が組み込まれ発がんに寄与している可能性は低いと思われる。

いっぽう、HCVが複製する蛋白質は感染細胞内で多彩な生理活性を呈することが知られており、肝発がんに直接あるいは間接的に関与する可能性がある。

現在同定されている限りでHCVの蛋白質には10種類あり、ウイルスゲノムの5'末端からCore, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5BがゲノムRNAにコードされている (図3)。この中で炎症・発がんという観点では特にコア蛋白に関する研究が注目されてきた。Moriyaらは、HBVの転写調節領域の下流にHCV core遺伝子を連結したtransgenic mouseを作製し検討したと

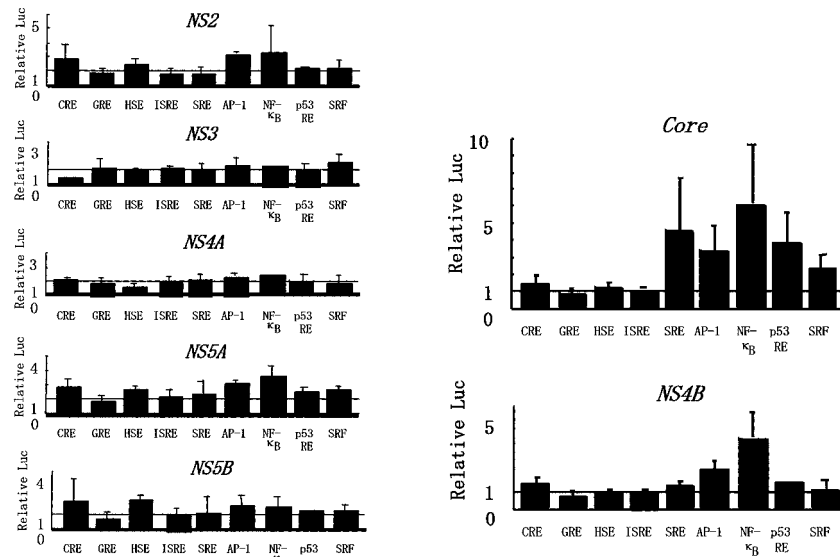


図4 C型肝炎ウイルス各蛋白の発現による各種転写因子の活性化  
各種転写因子の活性化をそれぞれの responsive element に luciferase gene の連なった reporter を用いて luciferase assay を行った結果を示す。Core と NS4B がいくつかの転写活性に影響を与えた。

ころ、このマウスでは生後16ヵ月後から肝内に脂肪滴を含んだ腺腫が発生し、さらにその一部から低分化の肝細胞癌が発生したことを報告した<sup>4)</sup>。このマウスでは生来持つ蛋白に対する免疫寛容のためか炎症は生じない。炎症がないにも関わらずがんができるということは、先に述べた臨床的に観察されるC型肝炎ウイルス発がんとは異なるモデルとも言えるが、炎症がなくともコア蛋白の発現により癌ができたという事実は、ウイルス蛋白による直接の癌化作用もありうることを示しているとも考えられる。

## 2-2 コア蛋白が惹起する細胞内シグナル伝達

コア蛋白の oncogenic potential を示す *in vitro* のデータとしては様々なものがある。コア蛋白を H-ras と共発現することで細胞を transform することができたという報告<sup>5)</sup>から、コア蛋白は NFκB 経路の活性化などを介して抗アポトーシス作用を持つこと<sup>6)</sup>や MAPK の経路を活性化して細胞増殖に寄与すること<sup>7)</sup>なども報告されており、まだその詳細は不明な点もあるが、HCV 関連肝がんの病態に関与している可能性がある。

我々のグループもこのコア蛋白による細胞内情報伝達についてこの数年、検討を加えてきた。Kato らはレポーターアッセイを用いて、HCV の産生する各蛋白が細胞内の情報伝達系 (cyclic AMP responsive element (CRE), serum responsive element (SRE), activator protein-1 (AP-1), serum response factor (SRF), nuclear factor κB (NFκB), p53 pathway) にどのような影響を与えるのかについて検討した。その結果、HCV の各蛋白のなかでコ

ア蛋白が最も細胞内シグナル伝達に影響を及ぼし、NFκB, SRE, AP-1, p53 の各シグナル伝達経路を3~6倍程度に活性化した(図4)。特に炎症やアポトーシスに関わる NFκB pathway は強く活性化され、この pathway を介して炎症性ケモカインである IL8 や IL-1β などの産生が高まり、C型肝炎の病態に大きく関与しているであろうことを示した<sup>8)</sup>。Yoshida らはこのコア蛋白による NFκB pathway の活性化機構を検討し、TRAF2/6・IKKβ を介する活性化であることを明らかにした<sup>9)</sup>。さらにコア蛋白は、細胞の生存シグナルに関わる MAPK-SRE pathway も活性化するが、この経路を介して BclxL の転写を高め(図5) Fas 刺激による肝細胞のアポトーシスを抑制することも明らかにした<sup>10)</sup>(最近 STAT3 をコア蛋白が活性化し BclxL の転写を高めるという報告も別のグループからなされた<sup>11)</sup>)。

加えて、我々はコア蛋白がこれらの生存シグナルを細胞に入れるだけでなく、細胞の増殖を止める方向に働く p53 機能を増強することも示した(図6)<sup>12)</sup>。現在、我々はこれらの知見に基づき次のようなモデルを提唱している。すなわち、コア蛋白は細胞の増殖生存に関わる NFκB, SRE, AP-1 の各 pathway を活性化するいっぽうで、細胞周期を停止させる p53 の働きも増強しており、これらの相反する働きにより感染肝細胞の増殖を微妙に調節しているのではないか。したがってコア蛋白が発現しても細胞の増殖が一気に進むのではなく(実際、我々の検討ではコア蛋白発現細胞でも細胞回転が速くなるわけではない)、このバランスが慢性炎症の過程で何らかの機序で崩れると、たとえ

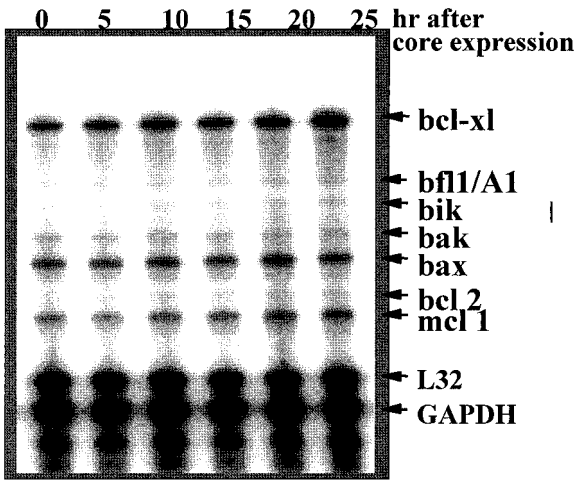


図5 コア蛋白による bcl-xl mRNA の発現増強  
RNase protection assay によりコア蛋白発現後の経時的なアポトーシス関連の mRNA の発現量の変化を示す。

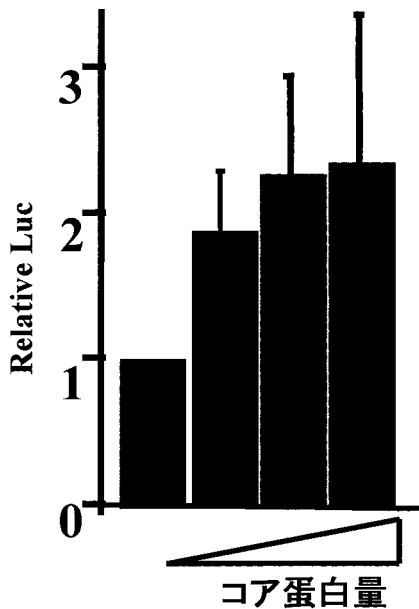


図6 コア蛋白による p53機能の増強  
コア蛋白発現量に応じて p53 responsive element からの転写が活性化される

ば p53機能の不全などの要因が加わることにより，細胞は増殖の方向に進みだし，長期にわたる慢性感染を経てからの肝発がんのメカニズムのひとつとなっているのではないかと考えている (図7)。

2-3 コア蛋白と活性酸素

もう一点最近注目されているのは Reactive Oxygen Species (ROS) の関与である。コア蛋白発現 transgenic mouse でも肝内の ROS の産生が増えており，コア蛋白の発現をテトラサイクリン制御下に置いた細胞株での検討でも

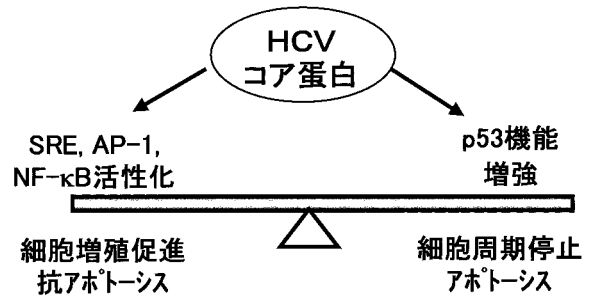


図7 コア蛋白による肝細胞増殖の制御 (仮説)  
コア蛋白が様々なシグナルをいれて細胞の増殖を微妙にコントロールしている可能性を示す

ROS の産生が増えることが報告されている<sup>13)</sup>。このコア蛋白発現誘導細胞株を用いて GeneChip での宿主細胞の遺伝子発現変化を見ると，抗酸化機能をもつ遺伝子の発現が増えていることから，コア蛋白が酸化ストレスを誘導した結果，細胞はこれに対抗するために抗酸化機能をもつ遺伝子の発現を増やすという流れが考えられている<sup>14)</sup>。このような酸化ストレスがDNA damage を引き起こし長い年月のあいだにその障害が蓄積し癌化するのではないかと推測するグループもある<sup>15)</sup>。

コア蛋白と宿主細胞の情報伝達をめぐる報告はその他にも大変多くのもがあり，なかには用いた細胞株の違いや導入方法の違い，検出方法の違いなどにより相反する結果も多く混沌としている。しかしながら，コア蛋白が細胞内の情報伝達，ひいては発がんにおいてなんらかの役割を果たしていることは間違いなさそうである。

2-4 コア蛋白以外の HCV 蛋白が惹起するシグナル伝達

コア蛋白の発がんにおける役割が注目されるいっぽうで，コア蛋白以外の HCV 蛋白でも oncogenic potential を有するもの (NS 3, NS 4 B, NS 5 A) が報告されている<sup>16-18)</sup>。特に NS 5 A はインターフェロン抵抗性と関係があるとされている<sup>19)</sup>だけでなく，転写活性化能を有していたり<sup>20)</sup>，p53と結合しその機能を阻害する<sup>21)</sup>などの多彩な機能を持つことが報告されている。

今後は HCV 全長蛋白発現 stable cell line<sup>22)</sup>や最近樹立された HCV 全長 genome の replicon system<sup>23)</sup>などを用いて，これらウイルス蛋白の包括的な機能解析はもちろんのこと，replicon system が樹立される前<sup>24)</sup>までは不可能であった *in vitro* における HCV-RNA の複製に伴う細胞内シグナルの修飾などについての研究を進めていくことで，発がんとの関連でも新たな知見が得られるかもしれない。

3. C 型肝炎の transcriptome

マイクロアレイ技術をはじめとする近年の包括的な遺伝子発現解析の展開に伴い，HCV 感染肝臓の遺伝子発現

profileに関する報告も散見されるようになった。その多くは癌部と非癌部の比較や悪性度と関連する遺伝子を抽出したもののだが、Okabeら<sup>25)</sup>やDelpuechら<sup>26)</sup>やIizukaら<sup>27)</sup>はB型肝炎ウイルス感染肝臓からの癌とC型肝炎感染肝臓からの癌で対比的な発現をしめす遺伝子群があることをそれぞれ報告している。同じ肝細胞癌であってもそのetiologyにより癌での発現遺伝子が異なっているということは、その発がん機構も異なることが反映されているのかもしれない。抽出された遺伝子が報告により一致しないなどのアレイの再現性にまつわる問題点もあるかと思われるが、今後はこのようなアプローチを用いて、C型肝炎の肝臓においてF分類の進行に応じてどのような遺伝子発現変化が生じるのか、HCVが駆除された場合にそのような遺伝子変化が元に戻るのかなどの検討を進めることでC型肝炎ウイルス発がんに関わる因子の同定が望まれる。

#### 4. おわりに

現在、HCVに伴う肝発がんへの経過は臨床例の検討から明らかになった。C型肝炎ウイルスの持続感染に続く肝発がんの機構の解明は、臨床的な観点から見れば持続炎症からの発がん機構の解明と言えるが、その過程における肝炎ウイルスの直接あるいは間接的な作用をより明確にすることが今後の課題である。

#### 文 献

- 1) 小俣政男：肝癌を視野に入れた肝炎の日常診療（日本メディカルセンター），p 1-103, 1995.
- 2) Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M, Yano M, Arakawa Y, Yokosuka O, Kuroki T, Nishiguchi S, Sata M, Yamada G, Fujiyama S, Yoshida H, Omata M. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med* 2000 ; **132**(7) : 517-524
- 3) Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, Arakawa Y, Ide T, Sata M, Inoue O, Yano M, Tanaka M, Fujiyama S, Nishiguchi S, Kuroki T, Imazeki F, Yokosuka O, Kinoyama S, Yamada G, Omata M. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma : national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy. *Ann Intern Med* 1999 ; **131**(3) : 174-181
- 4) Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998 ; **4**(9) : 1065-1067
- 5) Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996 ; **70**(7) : 4438-4443
- 6) Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas-and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol* 1999 ; **73**(6) : 4713-4720
- 7) Hayashi J, Aoki H, Kajino K, Moriyama M, Arakawa Y, Hino O. Hepatitis C virus core protein activates the MAPK/ERK cascade synergistically with tumor promoter TPA, but not with epidermal growth factor or transforming growth factor alpha. *Hepatology* 2000 ; **32**(5) : 958-961
- 8) Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S, Kato J, Goto T, Otsuka M, Lan K, Matsushima K, Shiratori Y, Omata M. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses : C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000 ; **32**(2) : 405-412
- 9) Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Otsuka M, Maeda S, Kato J, Omata M. Hepatitis C virus core protein activates nuclear factor kappa B-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. *J Biol Chem* 2001 ; **276**(19) : 16399-16405
- 10) Otsuka M, Kato N, Taniguchi H, Yoshida H, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein inhibits apoptosis via enhanced Bcl-xL expression. *Virology* 2002 ; **296**(1) : 84-93
- 11) Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, Yoshimura A. Activation of STAT 3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med* 2002 ; **196**(5) : 641-653
- 12) Otsuka M, Kato N, Lan K, Yoshida H, Kato J, Goto T, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus core protein enhances p53 function through augmentation of DNA binding affinity and transcriptional ability. *J Biol Chem* 2000 ; **275**(44) : 34122-34130
- 13) Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, Weinman SA. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 2002 ; **122**(2) : 366-375
- 14) Li K, Prow T, Lemon SM, Beard MR. Cellular response to conditional expression of hepatitis C virus core protein in Huh 7 cultured human hepatoma cells. *Hepatology* 2002 ; **35**(5) : 1237-1246
- 15) Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Todoroki T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001 ; **61**(11) : 4365-4370
- 16) Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS 3 transforms NIH 3 T 3 cells. *J Virol* 1995 ; **69**(6) : 3893-3896
- 17) Park JS, Yang JM, Min MK. Hepatitis C virus nonstructural protein NS 4 B transforms NIH 3 T 3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 ; **267**(2) : 581-587.
- 18) Ghosh AK, Steele R, Meyer K, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus NS 5 A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999 ; **80**(Pt 5) : 1179-1183
- 19) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Mu-

- rakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5 A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1 b infection. *N Engl J Med* 1996 ; **334**(2) : 77-81
- 20) Kato N, Lan KH, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus nonstructural region 5 A protein is a potent transcriptional activator. *J Virol* 1997 ; **71**(11) : 8856-8859
- 21) Lan KH, Sheu ML, Hwang SJ, Yen SH, Chen SY, Wu JC, Wang YJ, Kato N, Omata M, Chang FY, Lee SD. HCV NS 5 A interacts with p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 2002 ; **21**(31) : 4801-4811
- 22) Aizaki H, Harada T, Otsuka M, Seki N, Matsuda M, Li YW, Kawakami H, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame. *Hepatology* 2002 ; **36**(6) : 1431-1438
- 23) Pietschmann T, Lohmann V, Kaul A, Krieger N, Rinck G, Rutter G, Strand D, Bartenschlager R. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 2002 ; **76**(8) : 4008-4021
- 24) Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999 ; **285**(5424) : 110-113
- 25) Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000 ; **290**(5498) : 1972-1974
- 26) Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray : identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res* 2001 ; **61**(5) : 2129-2137
- 27) Delpuech O, Trabut JB, Carnot F, Feuillard J, Brechot C, Kremsdorf D. Identification, using cDNA macroarray analysis, of distinct gene expression profiles associated with pathological and virological features of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2002 ; **21**(18) : 2926-2937
- 28) Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, Tangoku A, Hamada K, Nakayama H, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y. Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. *Cancer Res* 2002 ; **62**(14) : 3939-3944