

学位論文題名

肝細胞癌におけるC型肝炎ウイルス遺伝子型の解析

Analysis of Hepatitis C Virus(HCV) Genotypes in Hepatocellular Carcinoma.

学位論文内容の要旨

I. 目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、現在のところ輸血後あるいは特発性のnon-A、non-B肝炎の大きな原因であることが知られている。HCVによる急性肝炎の約50%は引き続き慢性肝炎に進展し、そのうちかなりの症例が肝硬変に、さらに肝癌を発症する。我が国ではB型肝炎ウイルス感染のない肝細胞癌の94%の症例にHCV感染が存在することが明らかになった。それに対し他の地域、たとえば米国などでは、HCVの感染率は同様に高いのに対し、肝細胞癌は比較的少ない傾向にある。現在のところ肝細胞癌の病理学的発癌機構は不明な点が多く、未だ解明されていないが、このことは、宿主および遺伝的背景、感染様式、ウイルスの遺伝子型などのウイルス側の要因が関与しているものと思われる。肝細胞癌発症症例においてはgenotype 1bの占める率が高いのではないかとの報告があるが、いずれも母集団が少なく、解析の煩雑さもありいまだ明確な結論が得られていない。本研究では、今迄ウイルスの変異などのため増幅が困難であった非構造領域(nonstructural:NS5)で、比較的高率に増幅できるプライマーを作製し、reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法にてウイルス遺伝子を増幅し、その配列を決定した。得られた結果をphylogenetic analysisの手段によって肝癌に関連するHCVウイルス型について、今までに報告されている他の地域あるいは各国の臨床家による集積結果と比較検討した。

II. 方法

1. 対象症例 1993年1月から12月までの間に北海道大学医学部第一外科で肝細胞癌の診断で入院し肝切除を行った症例のうちHCV抗体陽性であった11例を対象とした。また、1994年3月から10月までの間にMemorial Sloan Kettering Cancer Center (New York)に肝癌の診断で入院した12症例の血清を5'側非翻訳領域(5' un-translated region: 5'UTR)によるRT-PCRで検索しHCV陽性であることが判明した計4例を対象として解析した。

2. RNAの分離 RNAは、血清および切除肝より抽出しpelletとして回収。75%エタノールにて2回洗浄後真空乾燥し、最終的に25 μ lの滅菌し核酸酵素を除去した水に溶解した。

3. RT-PCRによるcDNAの合成

抽出された25 μ lのRNA溶液のうち5 μ lをRT-PCRを用いcDNAを合成した。

4. 5'UTR、NS5及びE2/NS1超可変領域のPCRによる増幅 HCV RNAの逆転写反応により得られたcDNAを特異的なprimerを用い、nested-PCRを施行した。最終的なPCR産物(10 μ l)はethidium bromideを含む1%のagarose gel上で電気泳動し、UV fluorescenceのもとで判定した。

5. Nucleotide sequenceによる解析 PCR産物を電気泳動し、DNA 精製キット (Wizard PCR Preps, Promega)により精製し40 μ lの核酸酵素を除去した水に溶解した。精製後のPCR産物をさらにPCR-Script TM SK(+)cloning Kit (STRATAGENE)によりクローニングした後、精製し、エタノール沈殿してえられた 900ngのplasmid DNAをM13 primer 及び KS primer (Operon Technologies)を用い、Applied Biosystems Model 373 DNA Stretch Sequencer (Perkin Elmer) により塩基配列を決定した。

6. Phylogenetic analysisによるHCV genotype の判定 得られたHCV遺伝子断片をすでに報告されているsequence と共にSaitou and Nei (1987)によるneighbor-joining methodでClustal V program を用いて解析した。計18例のUTR及び急性肝炎症例、慢性肝炎症例の癌部、非癌部を含む計15例のNS5領域の増幅産物をすでに報告されているUTR 20例、NS5 39例と比較検討した。

III. 結 果

RT-PCR法により増幅されたHCVの5'UTRのシーケンスを従来の報告から確立されている分子系統樹にあてはめて比較解析したところ、肝癌 9 症例はtype 1に属し、残り2例はtype 2に属していた。また、4 例の米国の肝癌症例はいずれもtype 1であった。NS5領域に関しては、変異の存在を考慮して作製したprimerを使用することにより比較的効率のよい増幅産物を得ることができた。5'UTRにくらべると効率は低いが、日本の症例で11例中7例、米国の症例で4例中1 例が増幅可能であった。NS5によるデータは5'UTRによる分析と良く相関し、NS5領域が増幅可能であった症例は、1 例を除き genotype 1b に細分類することができた。以上のより、肝細胞癌症例において、HCVのタイプはtype 1ないしgenotype 1bが優位であると思われた。E2/NS1の超可変領域の増幅は極めて困難であったが、米国の急性肝炎及び慢性肝炎の増幅が可能となるprimerを新たに設定し全症例に試みたところ、急性肝炎例と慢性肝炎例では増幅されたが、急性例ではprototypeに比べいくつかの塩基置換がみられ、慢性肝炎例ではさらに多くの塩基置換がみられた。しかし肝癌症例では全例増幅されなかった。癌部と非癌部から抽出したHCVについて5'UTRのシーケンスを比較したが、塩基配列に変化は認められなかった。NS5領域では両組織を採取できた6 例中、両者ともに増幅された5 例で、わずかの塩基配列の違いが認められたが、homologyが高いことがわかった。

IV. 考 察

最近、ウイルスのgenotypeが肝疾患の悪性化及び肝癌への進展に関連する重要な因子の1つであることが示唆されているが本研究において米国と日本共にHCV肝炎に併発した肝細胞癌症例では、type 1ないしはgenotype 1bが優位であることが判明した。近年、約47%の肝癌合併C型肝炎症例がgenotype 1bに感染しているとされているとの報告があるが、今回の研究では、genotype 1bの感染率はさらに高値を示した。以上より肝癌の発症及び進展にはHCV genotype 1bが強く関与していることは確実と思われる。E2/NS1 超可変領域は、ウイルスのsurface glycoproteinをコードしており、ウイルスの中和抗体の存在が示唆されているが、今回の研究では肝癌患者からの肝組織、血清いずれからも増幅されなかった。この原因は不明であるが、急性あるいは慢性肝炎では増幅されたこと、急性例、慢性例を比較すると、慢性例に塩基の変異が多いことなどを考慮すると、長期にわたる感染がウイルスの塩基配列の変化を誘発し駆逐されなかったとも考えられる。悪性化の機構はいまだ解明されていないが、ある特定のウイルスの長期感染がより重篤な肝疾患あるいは持続的な炎症を誘発し肝硬変に移行する可能性がある。本研究により、ウイルスのgenotypeによる分類がHCV感染患者の診断、治療に重要であることが示唆された。HCV genotype 1bによる感染が判明した際には、肝細胞癌の発症がすくなく予測されるので、血清AFPの測定、超音波などにより

定期的な検索を行い、長期にわたる経過観察が必要であると思われた。

V. 結 語

1. 5'UTRの分子系統樹による検索では、日本の肝細胞癌症例11例中9例がtype 1、2例がtype 2であり、米国症例は4例ともにtype 1であった。

2. NS5領域は本邦症例7例、米国症例1例のみが増幅され、分子系統樹による検索では、すべてgenotype 1bであった。

3. E2/NS1領域に関しては、肝細胞癌症例に対しては全例、増幅されなかった。このことは、HCV感染が長期化した症例ではウイルスの塩基配列に変異が蓄積されていることが示唆された。

以上よりgenotype 1あるいはgenotype 1bは肝細胞癌症例において優勢なウイルス型の可能性が示唆され、ウイルスのgenotype による分類がHCV感染患者の診断、治療上、重要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 内 野 純 一

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 長 嶋 和 郎

学 位 論 文 題 名

肝細胞癌におけるC型肝炎ウイルス遺伝子型の解析

Analysis of Hepatitis C Virus(HCV) Genotypes in Hepatocellular Carcinoma.

C型肝炎ウイルスは、輸血後あるいは特発性のnon-A、non-B肝炎の主要な原因であることが知られており、HCVによる急性肝炎の約50%は引き続き慢性肝炎さらに肝硬変、肝癌を発症する。我が国ではHBsAg陰性の肝細胞癌の94%の症例にHCV感染が存在するが、現在のところ肝細胞癌の病理学的発癌機構は不明な点が多く、未だ解明されていない。

本研究では、1993年1月から12月までの間に北海道大学医学部第一外科で肝細胞癌の診断で入院し肝切除を行った症例のうちHCV抗体陽性、かつHCV5'側非翻訳領域のRT-PCRでHCV陽性であることが判明した11例および1994年3月から10月までの間にMemorial Sloan Kettering Cancer Centerに肝癌の診断で入院した12症例の血清を5'UTRによるRT-PCRで検索しHCV陽性であることが判明した計4例を対象として解析した。これらの肝細胞癌症例において、5'UTR、E2/NS1を増幅、さらにNS5領域を比較的高率に増幅できるdegenerated primerを作製し、RT-PCR法にてウイルス遺伝子を増幅し、直接塩基配列を決定した。得られた結果は分子系統樹により解析し、諸家によるC型慢性肝炎、HCV抗体陽性症例の集積結果と比較し、肝細胞癌に関わるHCVの遺伝子型について検討した。

その結果、本邦肝癌9症例はtype 1に属し、残り2例はtype 2に属していた。また、4例の米国の肝癌症例はいずれもtype 1であった。NS5領域に関しては、本邦例で11例中7例、米国の症例で4例中1例が増幅可能であり、5'UTRによる分析と良く相関し、NS5領域が増幅可能であった症例は、1例を除き genotype 1b に細分類することができた。以上より、C型肝炎関連肝癌症例では、HCV type 1ないし genotype 1bが優位であると思われた。また、肝癌症例において、E2/NS1の超可変領域は全例増幅されなかった。5'UTRの塩基配列は癌部、非癌部共に変化を認めなかった。NS5領域では両組織を採取できた6例中、両者ともに増幅された5例で、わずかの塩基配列の違いが認められた。

本研究によってHCV肝炎に併発した肝細胞癌症例では米国と日本共に、type 1ないし genotype 1bが優位であることが判明した。わが国ではC型慢性肝炎の60から70%が1b型といわれているが、対象を肝癌にするとより1bの占める率は高値を示した。以上より肝病変の悪化および肝癌の発症あるいは進展にはHCV genotype 1bが強く関与しているものと思われる。E2/NS1超可変領域には、ウイルスの中和抗体の存在が示唆されているが、今回の研究では肝癌患者からの肝組織、血清いずれからも増幅されなかった。この原因は不明であるが、急性あるいは慢性肝炎では増幅されたこと、急性例、慢性例を比較すると、慢性例

に塩基の変異が多いことなどを考慮すると、長期にわたる感染がウイルスの塩基配列の変化を誘発し駆逐されなかったとも考えられる。悪性化の機構はいまだ解明されていないが、あるgenotype、あるいは変異株の長期感染がより重篤な肝疾患あるいは持続的な炎症を誘発し肝硬変に移行する可能性があると思われる。本研究により、ウイルスのgenotypeによる分類がHCV感染患者の診断、治療に重要であることが示唆された。ことにHCV genotype 1bはインターフェロンによる治療に抵抗するため、C型肝炎患者にたいしては肝病変の予測をすべく積極的に遺伝子型を同定しHCV genotype 1bによる感染が判明した際には、肝細胞癌の発症を念頭において、血清AFPの測定、超音波などにより定期的な検索を行い、長期にわたる経過観察が必要であると思われる。

審査にあたり、浅香教授より、血清、肝組織における癌部、非癌部のウイルス塩基配列の差異、米国症例の民族的背景、米国とわが国のHCV遺伝子型の比率、各遺伝子型におけるインターフェロンの有効性に関しての質問があり、また発癌に関与していると考えられるHCVの領域について意見を求められた。次いで長嶋教授よりHCVquasispeciesの問題、NS5領域に関するPCR条件、胆管細胞癌とHCVに関する最近の知見についての質問があり、申請者は、血清と肝組織ではquasispeciesのpopulationに差異は認められないこと、本邦の慢性肝炎例でHCV genotype 1bが約70%であるのに対し、米国では20-30%であるが民族的背景が複雑であり比較は困難であること、胆管細胞癌及び肝細胞癌、胆管細胞癌合併例でHCV抗体陽性率が高いことが指摘されており、今後検討が必要と思われること、また長期感染の成立および変異の蓄積の観点よりenvelope領域が発癌に関与している可能性が高いと思われるなど独自の意見をまじえながら明解に回答した。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院過程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。