原著

PCNAと変異型p53の免疫組織学的所見からみた 原発性肝癌における癌部と非癌部の特徴について

岐阜大学第2外科

高橋 禎 雅 若原 正 幸 梅本 敬 夫
深田 代 造 佐治 重 豊

Immunohistochemical Significances of PCNA and Mutant p53 in Hepatocellular Carcinoma between Inside and Outside of Cancer Area

Yoshinori TAKAHASHI, Masayuki WAKAHARA, Takao UMEMOTO,
Daizou FUKADA and Shigetoyo SAJI

Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

原発性肝癌症例で、術前TAEによる腫瘍壊死部が比較的軽度な43例を対象に、癌部と非癌部におけるproliferating cell nuclear antigen (PCNA)と変異型p53蛋白(p53)を免疫組織学的に検索し、臨床病理学的因子や予後との関連を比較検討した。その結果、1)HCV陽性者でアルコール過飲歴有り群は無し群に比べ有意に硬変併存率が低く、腫瘍最大径が大きく、PIVKA2陽性率が高かった。2)PCNA labeling index (LI)値は癌部が非癌部に比べ有意に高く、非癌部ではアルコール過飲歴有り群は無し群に比べ有意の低値を示した。3)変異型p53蛋白は癌部で27.9%が陽性で、非癌部では全例陰性であった。4)癌部でp53陽性例のLI値は陰性例に比べ高値を示し、HCV陽性例は陰性例に比べ有意に予後不良であった。以上の結果、肝癌症例に対しPCNAやp53蛋白発現の有無を検索することは、残肝再発や予後予測に有用である可能性が示唆された。

索引用語：変異型p53(mutant p53)、PCNA(PCNA)、原発性肝癌(hepatocellular carcinoma)、HCV(HCV)、アルコール過飲歴(drinking excessive alcohol)

はじめに

原発性肝癌は、本邦ではHB型あるいはHCV型肝炎ウイルスに端を発する肝硬変からの発癌が主因で¹⁾²⁾、これに、アルコールの過飲³⁾、薬物⁴⁾などが関連因子として関与する可能性が指摘されている。この中で、non-A, non-B型肝炎、HCVがChooら⁵⁾により1989年にクローニングされ、原因ウイルスとして注目されている。すなわち、HBs抗原陽性者からの発癌頻度は横這い状態にあるが、HCV抗原陽性者からの発癌が近年急増しているところにある⁶⁾。また、原発性肝癌は異時性に多中

心性発癌を示す症例が多いため、転移との関連で外科療法時の切除範囲決定要因で論議されている⁷⁾。そこで著者らは、当科で切除した原発性肝癌の癌部と非癌部でproliferating cell nuclear antigen(以下PCNA)⁸⁾と変異型p53蛋白(以下p53)⁹⁾を免疫組織学的に染色し、その染色程度を臨床病理学的因子や予後との関連で比較検討することにより、非癌部での発癌要因の可能性を推察した。

対象と方法

1. 研究対象

1989年から8年間の間に教室で切除した原発性肝癌95例（男性76例，女性19例，平均年齢 61.1 ± 9.1 歳）中，術前のtransarterial embolization（以下TAE）による腫瘍壊死部が比較的軽度で，組織学的検索が可能であった43例を対象に，PCNAとp53蛋白発現の有無を免疫組織学的に検索し，臨床病理学的所見および予後との関連で比較検討した。なお，対照群として硬変併存肝癌で術前TAE非施行の5例と転移性肝癌5例を比較検討に用いた。

2. 研究方法

1) 臨床病理学的所見の検索法

原発性肝癌取扱い規約（以下取扱い規約）¹⁰⁾による各病期規定因子，および全国原発性肝癌追跡調査報告（以下全国報告）¹¹⁾でのアルコール過飲歴の有無，ウイルス性肝炎罹患の有無，腫瘍マーカー，腫瘍最大径，被膜形成および浸潤の有無を評価項目として検討に用いた。

2) 組織標本の作製法

手術時採取したホルマリ固定パラフィン包埋ブロックから，癌部および非癌部で4 μ mの薄層切片を作製し，脱パラフィン後0.3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼを不活化し，2分間5回のマイクロウェーブ処理後，以下の染色を行った。なお，癌部ではTAEによる壊死が比較的軽度な腫瘍辺縁部を中心に検索した。

3) 免疫組織染色の方法

PCNA：薄層切片上に抗PCNAモノクローナル抗体enhanced polymer one-step staining（以下EPOS）-PCNA（PC10，DAKO社）を滴下し，室温にて60分間反応させた後，3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride（以下DAB）で発色させ，ヘマトキシリンにて核染色し封入・検鏡した。判定は，光学顕微鏡下で細胞核が茶色に染色されたものを陽性とし，細胞1,000個中の陽性細胞数を百分率で算定しlabeling in dex（LI）として表示した（Fig.1-a）。

p53：1%正常馬血清添加抗p53モノクローナル抗体（DO-7，DAKO社，Working dilution 1：100）を滴下し，4℃にて12時間反応させ，ビオチン化マウス2次抗体，avidine-biotinylated peroxidase complex（以下ABC，Vector社）法にて

染色後，DABにて発色させヘマトキシリンにて核染色し封入検鏡した。判定は，10%以上の細胞核がDABにより茶色に染色されたものを陽性とした（Fig.1-b）。

4) 統計学的検討の解析法

得られた測定値はmean $\pm$ standard deviation（SD）で表示し，Student's t-testにて検定した。また，順位のないカテゴリー変数による分析は χ^2 乗検定を用い，累積生存率はKaplan-Meier法にて算出した。いずれも危険率5%未満を統計学的有意差ありと判定した。

結 果

1. 臨床病理学的所見の特徴

1) 背景因子からの検討結果

43例の臨床病期はIが24例，IIが15例，IIIが2例。内視鏡的食道静脈瘤が8例にみられ，肉眼的進行程度はStage Iが6例，IIが26例，IIIが11例，IVが0例であった（Table. 1）。全国統計と比べ腫

Fig. 1 The microscopic findings of positive expression of PCNA (a) and mutant type p53 (b) protein by immunohistochemical stain ($\times 200$)

瘍の占居部位, 存在範囲, 漿膜浸潤, リンパ節転移, 血管浸潤, 胆管侵襲などには差はみられなかった。また, 全国報告と比べ自験例はアルコール過飲者が多く (34.9% vs 29.7%), HCV陽性率 (80.0% vs 76.4%) と硬変併存頻度 (88.4% vs 67.2%) が高く, 逆にHB陽性率 (11.6% vs 16.8%) が低く, 腫瘍最大径 (33.5mm vs 49.0 mm) が小さかったが各群間で有意差はみられなかった。なお, 腫瘍マーカー (AFP, PIVKA2, CEA) 陽性率は全国報告との間に差がみられなかった (Table. 2)。

2) HCV感染歴とアルコール過飲歴との関連
HCV陽性29例を過飲歴の有無で, 有り6例と無し23例に分けると, 前者は後者に比べ硬変併存頻度が有意に低く (66.7 vs 95.7%, $p=0.038$), 臨床病理学的所見で腫瘍最大径が有意に大きく (41.8% vs 25.1mm, $p=0.035$), PIVKA2陽

Table. 1 Back ground factors of patients with hepato-cellular carcinoma and metastatic liver tumor

	hepato-cellular carcinoma		metastatic liver tumor
	with TAE	without TAE	
cases	43	5	5
age(mean±SD)	61.0±9.1	63.0±3.5	60.0±3.4
male/female	36/7(83.7%)	4/1(80.0%)	5/0
clinical stage			
I	24	5	NI*
II	15	0	NI
III	2	0	NI
Stage			
I	6	0	NI
II	26	3	NI
III	11	2	NI
IV	0	0	NI

TAE : transarterial embolization

* : not indicated

Table. 2 Comparison of the clinico-pathological findings between our department and nation wide study on hepato-cellular carcinoma

	our department	nation wide study
number of case	43	14522
sex		
male(%)	36(83.7%)	1162(80.0%)
alcohol drink		
yes	15(34.9%)	3474(29.7%)
no	28(65.1%)	8234(70.3%)
viral hepatitis		
HB(+)	5(11.6%)	2125(16.8%)
HCV(+)	28(80.0%)	9591(76.4%)
cirrhosis		
yes	38(88.4%)	10933(67.2%)
no	5(11.6%)	3589(32.8%)
tumor marker		
AFP(+)	27(64.3)	8632(67.8%)
PIVKA2(+)	17(44.7%)	4433(48.1%)
CEA(+)	9(20.9%)	1844(26.4%)
max. diameter	33.5mm	49.0mm
fc*(+)	35(81.4%)	NI **
fc-inf(+)	22(51.2%)	NI

* : formation of the capsule, ** : not indicated

Table. 3 Effects of drinking excessive alcohol in HCV positive patients according to clinico-pathological findings

alcohol	with	without	p value
number of patients	6	23	
cirrhosis yes/no	4/2	22/1	$p=0.038$
average diameter(mm)	41.8±7.7	25.1±13.3	$p=0.035$
tumor marker (+)/(-)			
AFP	3/3	16/7	$p=0.369$
PIVKA2	4/1	8/14	$p=0.076$
CEA	1/5	5/18	$p=0.785$

Table. 4 Comparison of PCNA labeling index (LI) between inside and outside of the cancer areas

a) effect of TAE			
cancer areas	inside	outside	
labeling index	78.1±16.4	52.1±16.4	$p<0.001$
without TAE(n=5)	83.5±14.1	48.5±14.9	$p=0.037$
metastatic liver	NI *	47.5±13.9	

* : not indicated

b) effect of drinking excessive alcohol		
cancer area	inside	outside
with alcohol	71.2±16.6	49.7±17.7
without	81.9±15.3	53.5±15.3
	$p=0.040$	$p=0.479$

性率が高くなる傾向 (80.0 vs 36.4%, $p=0.076$) を示した (Table. 3)。

2. 免疫組織染色所見の結果

1) PCNA LI値

LI値は, 癌部 (78.1±16.4) が非癌部 (52.1±16.4) に比べ有意 ($p<0.001$) の高値を示し, 硬変併存肝癌で術前TAE非施行例の癌部 (83.5±14.1) は非癌部 (48.5±14.9) に比べ有意 ($p=0.037$) の高値を示した。一方, 非癌部でのLI値はTAE施行例がTAE非施行例および転移性肝癌での非癌部 (47.5±13.9) に比べ最も高い値を示したが, 各群間で有意差はみられなかった (Table. 4a)。

アルコール過飲歴との関連で, 癌部では過飲歴有り群のLI値 (71.2±16.6) は無し群 (81.9±15.3) に比べ有意 ($p=0.040$) の低値を示した。非癌部でも前者は後者に比べ若干低値を示したが, 有意差はみられなかった (Table. 4b)。

2) 変異型p53蛋白

p53は非癌部では全例陰性であったが癌部では12例, 27.91%が陽性であった。臨床病理学的所見との関連で, 陽性例は陰性例に比べ腫瘍の最大径が有意に大きく (48.3±24.4mm, $p=0.005$), 硬変併存率が低くなる傾向がみられた

(75.0 vs 93.5%, $p=0.089$)。また、腫瘍マーカーはAFPが有意($p=0.032$)に陽性で、PIVKA2が陽性となる傾向($p=0.053$)がみられ、組織所見で隔壁形成(以下fc)と隔壁浸潤(以下fc-inf)が陽性となる傾向がみられた($p=0.051$ と $p=0.052$) (Table. 5)。

なお、検索した他の臨床病理学的所見との間に有意の関連はみられなかった。

3) p53とPCNAとの関連

癌部では、p53陽性例のPCNA LIは 80.5 ± 13.7

と陰性例の 77.2 ± 17.4 に比べ高値を示したが、有意差はみられなかった。一方、非癌部ではp53は全例陰性で比較不能であった (Table. 6)。

3. 予後との関連

腫瘍の最大径が2 cm以上群(12例)と未満群(20例)、PCNA LI値が78.1以上の高値群(27例)と未満の低値群(16例)、p53陽性群(12例)と陰性群(31例)の各群間に生存曲線で差はみられなかった (Fig. 2)。肝炎ウイルスとの関連では、HCV陽性例は陰性例に比べ有意($p=0.045$)に予後不良であった (Fig. 3)。腫瘍マーカーとの関連では、CEA陽性群は陰性群に比べ($p=0.176$)、PIVKA2陽性群は陰性群に比べ($p=0.271$) 何れも若干予後不良であったが、AFP陽性群と陰性群との間に

Table. 5 The positive expression of mutant p53 in the cancer area

		positive p53	negative p53	
expression of p53		12(27.9%)	31(72.1%)	
cirrhosis	yes/no	9/3	29/2	$p=0.089$
HB	P/N *	1/11	4/27	$p=0.675$
HCV	P/N	8/3	20/4	$p=0.467$
alcohol	yes/no	4/8	11/20	$p=0.894$
AFP	P/N	10/1	17/14	$p=0.032$
PIVKA2	P/N	6/2	11/19	$p=0.053$
CEA	P/N	1/11	8/23	$p=0.207$
fc	P/N	12/0	23/8	$p=0.051$
fc-inf	P/N	9/3	13/18	$p=0.052$

* : positive/negative

There was no positive expression of p53 in the region out side of cancer

Table. 6 The value of PCNA labeling index according to the positive and negative p53 expression inside of cancer area

	positive p53	negative p53	
inside of cancer area	80.5 ± 13.7	77.2 ± 17.4	$p=0.568$

Maximum diameter	PCNA LI
mutant p53	

Fig. 2 The comparison of survival curves between maximum diameter less than 2cm and over 2cm (a), high PCNA LI and low LI (b), positive p53 and negative one (c).

差はみられなかった (Fig. 4)。

考 察

本邦における原発性肝臓は、肝細胞癌が96.1%と最も多く、大部分が肝炎ウイルス由来の慢性肝炎あるいは肝硬変を併存している¹⁾²⁾。また、肝臓患者のHBs抗原陽性率は17.8%で低下傾向にあるが、HCV抗原陽性率は逆に68.9%と増加してい

る⁶⁾¹²⁾。一方、HCV感染者の年率発癌率はchronic persistent hepatitis (CPH) で0.5%, chronic active hepatitis (CAH) -2Aで1.5%, CHA-2Bで3.0%, LCで7.0%と肝の線維化が進むとともに増大する傾向が示唆されている¹³⁾。

肝臓は、病理組織学的には腺腫様過形成、異形腺腫様過形成、早期肝細胞癌、高分化型肝臓、中分化型肝臓、低分化型肝臓へと多段階発癌の過程をへて増殖・進展することが判明している。すなわち、HBs肝炎の場合はX遺伝子がコードするX蛋白がprotein kinase Cを介する細胞シグナル伝達系により核内遺伝子Jun-Fosを活性化し転写を促進するため¹⁴⁾、あるいはセリンプロテアーゼ阻害蛋白と相同性を持つことから、プロテアーゼとの相互作用を示し¹⁵⁾、X蛋白がc-mycあるいはN-myc遺伝子の上流調節領域にトランスして活性化したり¹⁶⁾、p53の転写制御機能を打ち消す作用などが考えられている¹⁷⁾。これに対し、HCV肝炎ウイルスの場合は発癌機序の解明は未解決で、疫学的要因によるウイルス感染と発癌率の研究が主体である¹²⁾。

Fig. 3 The comparison of survival curves between positive HCV and negative HCV

Fig. 4 The comparison of survival curves between positive tumor marker and negative one; CEA (a), PIVKA2 (b), AFP (c)

CEA	PIVKA2
AFP	

臨床面でも、肝癌は肝硬変をベースとして多中心性に発癌する頻度が高いため、初回治療で根治性を得ることは困難との考えから、肝切除術、経皮的エタノール注入療法(PEI)、TAE、肝動注療法、電磁波凝固術、凍結手術など多彩な治療が複合的に用いられている⁷⁾。

そこで、著者らは先ず教室で経験した原発性肝癌症例を対象に、癌部と非癌部での細胞増殖脳をPCNA LIから推察し、変異型p53蛋白発現の有無から発癌過程を推察し、臨床病理学的諸因子との関連で比較検討し、本症の特徴と非癌部での多中心性発癌の可能性を推察せんと試みたわけである。なお、全例に術前TAEが施行されており、腫瘍中心部は壊死が著明のため、癌周辺部から採取した切片を用いて免疫組織染色を行った。

先ず、著者らの対象症例は全国集計¹¹⁾と比べ癌の占居部位、存在範囲、漿膜浸潤、リンパ節転移、血管侵襲、胆管侵襲などで差はみられず、腫瘍マーカー陽性率も著差なく、一応の基準を満たす症例群と思われる。しかし、アルコール過飲者、HCV陽性率、肝硬変併存率が若干高く、腫瘍最大径が若干小さかったが各項目で有意差はみられていない。

アルコール過飲歴との関連

HCV陽性29例を対象にアルコール過飲歴との関連をみると、過飲歴有り群は硬変併存頻度が有意に低く、腫瘍最大径が有意に大きく、PIVKA2陽性率が高くなる傾向がみられた。一般に、ウイルス感染とアルコール過飲は共に肝硬変へのリスクファクターで、両者が相加されると硬変化へのプロセスが加速されると考えられている³⁾¹⁸⁾。また、Yamauchiら¹⁹⁾は、HCV陰性のアルコール性肝硬変例の5年と10年の累積肝癌合併率は共に8.3%であったが、HCV陽性で大酒家の肝硬変例では41.3%と8.07%と有意に高率で、非飲酒家のHCV陽性肝硬変例は23.1%と56.5%と両者の中間値を示したと報告している。この結果は、HCV非感染者のアルコール性肝硬変例は肝癌の発生頻度が低い、HCV陽性者で長期間飲酒した肝硬変例は発癌促進的に作用する可能性を示唆するものと考えられる²⁰⁾。しかし、今回の検索では過飲歴あり群の硬変併存率は過飲歴なし群に比べ低率であ

ったが、腫瘍径は逆に有意の高値を示した。本邦は欧米に比べアルコール過飲者の頻度が少ないため、統計上硬変併存率が低かったが、腫瘍径は有意に増大しており、アルコールによる発癌促進の可能性を示唆する結果と趣を同じくする所見と考えている。

癌部と非癌部での細胞増殖について

PCNA LI値から評価した細胞増殖脳⁸⁾は、癌部が非癌部に比べ有意の高値を示し癌部における増殖亢進が示唆された。この結果はTAE非施行例でも同様で、癌部は非癌部に比べ有意の高値を示した。癌部でのTAEの影響は施行群が非施行群に比べLI値が低値で治療効果が示唆されたが、非癌部ではTAE施行例が最も高く、転移性肝癌症例で最も低値を示した。アルコール過飲歴との関連では、癌部、非癌部ともLI値は過飲歴有り群が無し群に比べ低値を示した。この理由の説明は困難であるが、アルコール過飲により促進された細胞増殖部分がTAEにより効率的に壊死に陥った可能性を推察している。

変異型p53蛋白⁹⁾は、癌部で約30%に発現がみられたが、非癌部では全例陰性であった。また、p53陽性例は陰性例に比べ、腫瘍最大径が有意に大きく、腫瘍マーカーでAFP陽性率が有意に高く、組織所見でfc(+), fc-inf(+)¹⁾例が多く、臨床病理学的に悪性度が高くなる傾向がみられた。一方細胞増殖程度も、陽性例は陰性例に比べPCNA LIが高値を示し、p53遺伝子変異が細胞増殖を促進する可能性が示唆された。一般にp53遺伝子変異は、骨肉腫、乳癌、大腸癌など多くのヒト癌で検出されているが²¹⁾、細胞周期と深く関係し、転写装置の基本的な構成要素であるTATA結合蛋白やTAFと相互作用を示すと考えられている²²⁾。また、p53はDNA結合能を有する転写調節因子として作用し細胞周期を負に調節しているが²³⁾、c-fosやc-junの発現を抑制し細胞の癌化に関与していると推察されている¹⁴⁾、一方、肝癌との関連ではp53の転写制御機能をX遺伝子産物が打ち消す作用が知られており、X遺伝子による発癌誘導作用の時点ではp53の変異を要しない可能性が推察される¹⁵⁾。著者らは多中心性発癌を非癌部での遺伝子変異や細胞増殖能から推察せんと試みたが、p53蛋白の発現

は癌部で約30%みられたが、非癌部では観察されなかった。一般にp53遺伝子変異は、腺腫から癌腫へ移行する段階に生じると考えられているが²⁴⁾、原発性肝癌ではp53変異は発癌初期には必ずしも必要ないため、非癌部での発癌の可能性を検索するパラメーターとしては適切でないと思われた。

予後との関連

HCV陽性群は陰性群に比べ有意に予後不良で、CEAおよびPIVK2陽性群は陰性群に比べ予後不良であった。しかし、腫瘍最大径、PCNA LI値、p53蛋白発現率との間に生存曲線で有意差はみられなかった。肝癌の予後規定因子として、病理組織学的所見以外に、切除範囲、併用薬物療法の有無、TAEやPEIの回数、併存肝硬変の進行程度、食道静脈瘤の有無、などが影響するため、細胞の悪性度や増殖能のみから一律に評価することは困難である¹²⁾。しかし、各因子間ではp53陽性例は有意に腫瘍増大傾向が高く、AFPなどの腫瘍マーカー陽性率が高く、fc(+), fc-inf(+)|例が多いなどの生物学的悪性度と相関する可能性が示唆され、肝癌症例でPCNA LIやp53蛋白発現の有無を検索する意義は十分存在するものと思われた。

結 語

原発性肝癌で術前TAEによる腫瘍壊死部が比較的軽度な43例を対象に、PCNAとp53蛋白を免疫組織学的に検索し、臨床病理学的所見および予後との関連で比較検討した。その結果、1) HCV陽性者でアルコール過飲歴有り群は無し群に比べ有意に硬変併存率が低く、腫瘍最大径が大きく、PIVKA2陽性率が高かった。2) PCNA LI値は、癌部が非癌部に比べ有意に高く、非癌部ではアルコール過飲歴有り群は無し群に比べ有意の低値を示した。3) 変異型p53蛋白は癌部で27.9%が陽性で、非癌部では全例陰性であった。また、陽性例は陰性例に比べ腫瘍最大径が有意に大きく、硬変併存率が低く、AFP、PIVKA2が陽性で、隔壁形成と隔壁浸潤が陽性となる傾向がみられた。癌部でp53陽性例のPCNA LIは陰性例に比べ高値を示し、HCV陽性例は陰性例に比べ有意に予後不良であった。

以上の結果、ウイルス性肝炎およびアルコール

過飲が、多中心性発癌に関与する可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 小池克郎：HBVと肝発癌。外科治療73：493-501, 1995
- 2) 下田 敦, 養内慶次, 松下栄紀他：HCVと肝発癌。外科治療73：502-504, 1995
- 3) Lieber CS, Garro A, Ito MA, et al : Alcohol and cancer. Hepatology 6 : 1005-1019, 1986
- 4) Ito Y, Kojiro M, Nakashima T, et al : Pathomorphologic characteristics of 102 cases of thorotrast-related hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and hepatic angiosarcoma. Cancer 15 : 1153-1162, 1988
- 5) Kuo G, Choo HJ, Alter HJ, et al : An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. Science 244 : 362-364, 1989
- 6) 鶴浦雅志, 稲垣 豊, 養内慶次他：C型肝炎ウイルス感染と肝癌。診断と治療82：1943-1947, 1994
- 7) 小菅智男, 高山忠利, 山本順司他：肝切除後の残肝再発。外科57：1306-0309, 1995
- 8) Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al : Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . Nature 326 : 515-517, 1987
- 9) Raycroft L, Wu HY, Lozano G : Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 antioncogene. Science 249 : 1049-1050, 1990
- 10) 日本肝癌研究会：原発性肝癌取扱い規約, 改訂第3版。東京, 金原出版, 1992, p16-39
- 11) 日本肝癌研究会：原発性肝癌に関する追跡調査—第11報—。肝癌36：208-218, 1995
- 12) 小俣政男：日本の肝癌。外科治療73：487-492, 1995
- 13) Takano S, Yokosuka O, Imazeki F, et al : Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C : A prospective study of 251 patients. Hepatology 21 : 650-655, 1995
- 14) Liu P, Terradillos O, Renard CA, et al : Hepatocarcinogenesis in woodchuck hepatitis virus/c-myc mice : sustained cell proliferation and biphasic activation of insulin-like growth

- factor II. *Hepatology* 25: 874-883, 1997
- 15) Takada S, Kido H, Fukutomi A, et al: Interaction of hepatitis B virus X protein with a serine protease, trypsin TL2, as an inhibitor. *Oncogene* 9: 341-348, 1994
- 16) Hsu TY, Fourel G, Etiemble J, et al: Integration of hepatitis virus DNA near c-myc in woodchuck hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Jpn* 25: 43-48, 1990
- 17) Takada S, Tsuchida N, Kobayashi M, et al: Disruption of the function of tumor-suppressor gene p53 by the hepatitis B virus X protein and hepatocarcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 121: 593-601, 1995
- 18) Lieber CS: Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 3: 59-84, 1997
- 19) Yamauchi M, Nakahara M, Maezawa Y, et al: Prevalence of hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis and prior exposure to hepatitis C. *Am J Gastroenterology* 88: 39-43, 1993
- 20) 加藤活大, 西村大作, 佐野 博他: アルコール性肝硬変の臨床経過と予後. *最新医* 45: 2413-2419, 1990
- 21) Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ: The p53 proteo-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57: 1083-1093, 1989
- 22) Seto E, Usheva A, Zambetti GP, et al: Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12028-12032, 1992
- 23) el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, et al: Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1: 45-49, 1992
- 24) Fearon E, Vogelstein B: A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990
-