

れた。我が国のC型肝炎患者の多くは1 bおよび2 aのウイルスに感染しているので、遺伝子型内に共通するCTLワクチンの設計が可能になると考えられた。

E. 結論

1. HCVトランスジェニックマウスの肝炎モデルで誘導されるCTLはマウスのH2に関わらずコア蛋白質を認識しなかった。また、すべてのH2でNS2に対するCTLが誘導された。
2. このCTLは同じ遺伝子型1 bの他のHCV株を認識したが、1 a、2 aのHCV株は認識しなかった。
3. 以上の結果はCTLワクチンの開発に重要であると考えられた。

F. 文献

- 1) Wakita T, Taya C, Katsume A, Kato J, Yonekawa H, Kanegae Y, Saito I, Hayashi Y, Koike M, and Kohara M. Efficient conditional transgene expression in hepatitis C virus transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *Journal of Biological Chemistry* 1998 273: 9001-9006.
- 2) Wakita T, Katsume A, Kato J, Taya C, Yonekawa H, Kanegae Y, Saito I, Hayashi Y, Koike M, Miyamoto M, Hiasa Y, Kohara M. A possible role of cytotoxic T cells on acute liver injury in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by Cre/loxP system. *J Med Virol* 2000 62:308-317.
- 3) Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, Sakaki T, Sugano S, Saito I. Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res.* 1995 23:3816-21.
- 4) Wakita T and Wands JR. Specific inhibition of hepatitis C virus expression by antisense oligodeoxynucleotides: In vitro model for selection of target sequence. *Journal of Biological Chemistry* 1994 269:14205-14210
- 5) Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 94: 8738-43.
- 6) Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. Hepatitis C virus: an infectious molecular clone of a second major genotype (2a) and lack of viability of intertypic 1a and 2a chimeras. *Virology.* 1999 262: 250-63.
- 7) Tokushige K, Moradpour D, Wakita T, Geissler M, Hayashi N, Wands JR.

Comparison between cytomegalovirus promoter and elongation factor-1 alpha promoter-driven constructs in the establishment of cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *Journal of Virological Methods* 1997 64:73-80

8) Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*. 1999 10: 439-49.

9) Tokushige K, Wakita T, Pachuk C, Moradpour D, Weiner D, Zurawski Jr V, Wands JR. Expression and Immune Response of HCV-Core DNA Based Vaccine Constructs. *Hepatology* 1996 24:14-20

10) Firat H, Garcia-Pons F, Tourdot S, Pascolo S, Scardino A, Garcia Z, Michel ML, Jack RW, Jung G, Kosmatopoulos K, Mateo L, Suhrbier A, Lemonnier FA, Langlade-Demoyen P. H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol*. 1999 29: 3112-21.

1. 論文発表

Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, Date T, Yasui K, Hiramoto J,

Nagayama K, Tanaka T, Wakita T. Sequence Analysis of Hepatitis C Virus Isolated from a Fulminant Hepatitis Patient. *J Med Virol* 2001 64:334-339.

2. 学会発表

HCV トランスジェニックマウスの肝障害モデルにおける HCV 抗原特異的 CTL の解析 脇田隆字、宮本道子、加藤孝宣、小原道法 第49回日本ウイルス学会 2001年 大阪

C型肝炎ウイルスコア蛋白質のプロセッシングの解析 加藤孝宣、古坂明弘、宮本道子、伊達朋子、脇田隆字 第49回日本ウイルス学会 2001年 大阪

The cells of expressing proteins in the DNA immunization are adherent cells. 趙子江、脇田隆字、保井孝太郎 第49回日本ウイルス学会 2001年 大阪

Wakita T, Kato T, Miyamoto M, Furusaka A, Date T. Regulation of p21 HCV core protein production by its C-terminal sequences. 8th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 2001 Paris.

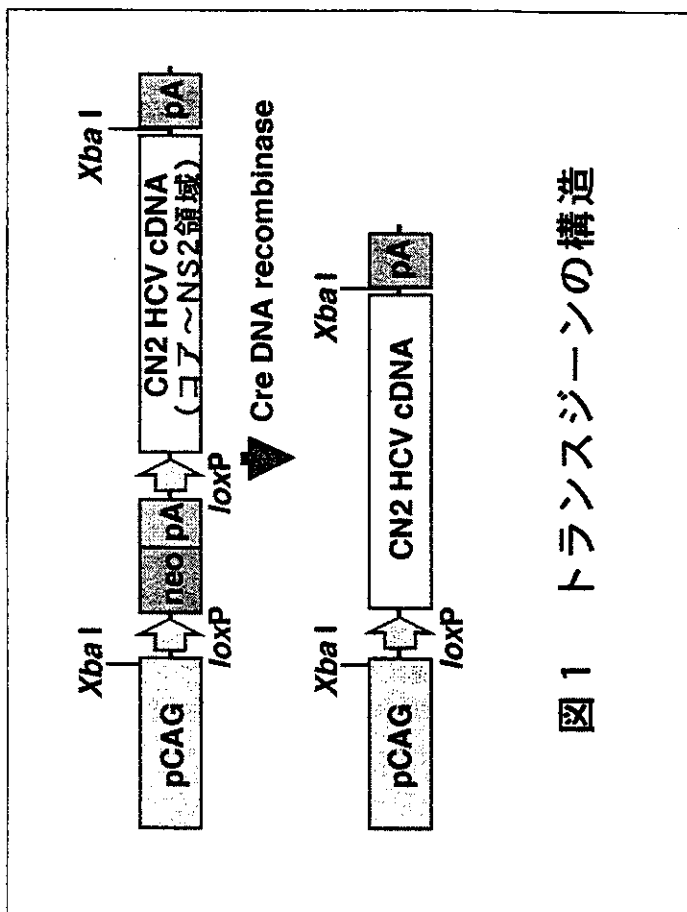


図1 トランスジェンの構造

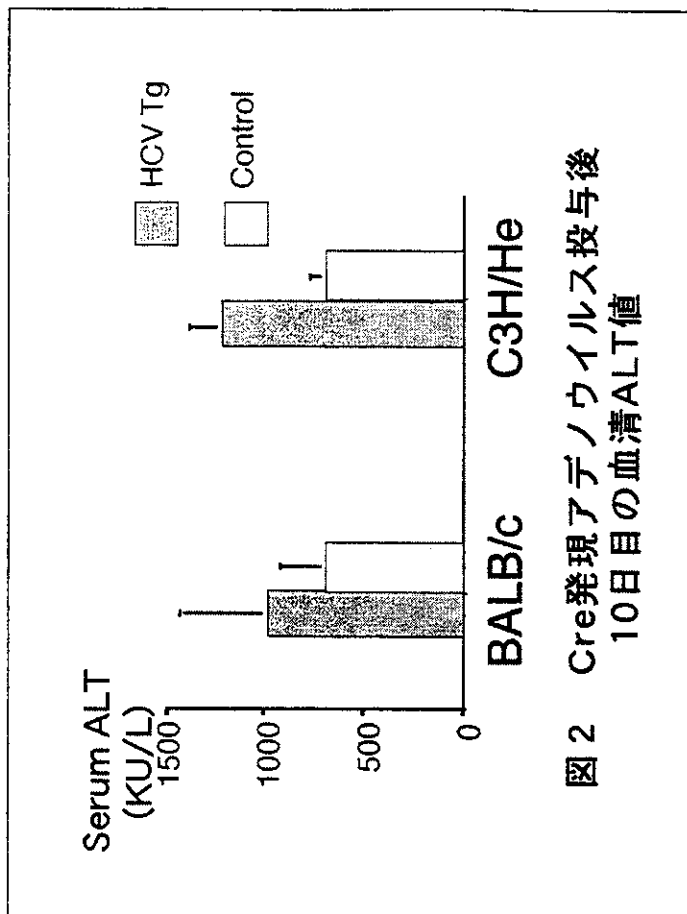


図2 Cre発現アデノウイルス投与後
10日目の血清ALT値

マウスストレイン	Core	E1	E2	NS2
BALB/c	X	○	○	○
C57BL/6	X	○	X	○
C3H/He	X	X	X	○

表1 マウスのストレインによる標的抗原

R 6株とのホモロジー (アミノ酸)	CTL反応性
TH株 (1b) : 91.3%	○
H 7株 (1a) : 82.9%	X
J 6株 (2a) : 67.5%	X

表2 使用したHCV株のアミノ酸の
相同性とCTLの反応性

動物モデルを用いた肝発癌に関する研究

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・助教授

研究要旨：若齢からの肝脂肪化(steatosis)に引き続いて16か月齢以降に肝細胞癌を発生するC型肝炎ウイルス（HCV）コア遺伝子トランスジェニックマウスをモデルとして肝発癌のメカニズムを検討した。コア遺伝子トランスジェニックマウスにおける肝脂肪化は、肝細胞内ミトコンドリアにおける β 酸化の障害がひとつの要因であることが明らかとなった。コア遺伝子トランスジェニックマウス肝では、組織学的な炎症像の不在にもかかわらず活性酸素の増加を認めた。また、抗酸化系の亢進も認められ、これらによるDNA障害が肝発癌の要因となっていることが示唆された。また、活性酸素の発生において、コア蛋白とアルコールとは共同作用をもつことが明らかになった。ヒトC型肝炎におけるアルコールの肝発癌促進作用を説明するものとして重要と考えられる。

A. 研究目的

ヒト慢性C型肝炎における肝発癌の機序はまだ全く不明である。チンパンジー以外にC型肝炎の疾患モデルがないことも、その解明の妨げとなっている。我々はHCVのコア遺伝子がトランスジェニックマウスにおいて肝細胞を誘発することを確認している。このマウスモデルを用いてC型肝炎における病態の解明、肝発癌機序の解明を行なう。

B, C. 方法と結果

HCVのコア遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスを以下のように解析した。

1. 組織学的検討

コア遺伝子トランスジェニックマウスでは、3か月齢から肝において脂肪滴の著明な蓄積を認めた。肝脂肪化はヒト慢性C型肝炎における組織学的特徴のひとつである。コ

ア遺伝子トランスジェニックマウスは、この現象をよく再現しており、脂肪化がC型肝炎における重要な特徴であることを示している。炎症所見は全く認められなかったが、16か月齢以降に肝細胞癌を発生した。肝腫瘍は、脂肪化した正常肝細胞の中から生じ、それを圧排するように存在した。さらに、脂肪化の強い比較的良性的な腫瘍の中から、悪性度の高い肝癌が「結節中結節」の形で発生してきたが、後者にはほとんど脂肪が認められなくなっていた。

2. 肝に蓄積した脂質の分析

コア遺伝子トランスジェニックマウス肝においては、主として中性脂肪が蓄積していたが、これをHPLCで解析したところ、C18単不飽和脂肪酸（C18:1）からなるトリグリセリドが、正常マウスや単純肥満による脂肪肝マウスに比して有意に増加していた。

3. ヒト慢性C型肝炎肝における脂質の分析

同様にHPLCを用いて検討したところ、C18:1脂肪酸はヒト慢性C型肝炎患者の肝においても、B型肝炎患者肝や単純肥満による脂肪肝に比して有意に増加していることが判明した。

4. 活性酸素(ROS, reactive oxygen species)の増加

Chemiluminescence-HPLCを用いて、肝内のphosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamineのhydroperoxide産物を特異的に測定したところ、コア遺伝子トランスジェニックマウス肝では、組織学的な炎症像の不在にもかかわらず活性酸素の増加、抗酸化システムの亢進を認めた。また、活性酸素の発生において、コア蛋白とアルコールとは共同作用をもつことが明らかになった。これらの現象はヒトにおける肝発癌を説明するものとして重要と考えられる。

D. 考察

HCVコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては初期より脂肪肝が発生し、ヒトC型肝炎における肝細胞癌と同様に、マウスの寿命の後半において肝細胞癌が発生した。HCVが肝発癌に直接的に関与していることを示している。コア蛋白の発現によって、脂肪化と相まって肝内における活性酸素の発生が増強されていた。活性酸素の発生は、コア遺伝子トランスジェニックマウスにおける肝発癌の少なくとも一部には関与していると考えられる。重要なことに、この活性酸素発生は組織学的な炎症像

無しに起こっていた。つまり、組織学的な炎症が存在しなくても、HCVが存在することで「生化学的な炎症」が存在しうることを示していると思われる。さらに、アルコールや炎症が活性酸素の発生において、コア蛋白と共同作用を示したことは重要である。HCV存在下における炎症は、他の肝炎における炎症に比して高度の活性酸素発生作用をもつことが示唆される。現在、さらに電子伝達系、呼吸鎖の経路とコア蛋白との関わり、また核内受容体との関わりから肝発癌機序の解明を進めている。

F. 論文発表

- 1) Moriya K, Todoroki T, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Miyoshi H, Ishibashi K, Takayama T, Makuuchi M, Watanabe K, Miyamura T, Kimura S, Koike K. Increase of carbon 18 mono-unsaturated fatty acids in the liver of hepatitis C: Analysis in transgenic mice and humans. *Biophys Biochem Res Commun* 281:1207-1212, 2001.
- 2) Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Iino S, Kimura S, Koike K. Hepatitis B virus Genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Gastroenterology* 120:1564-1565, 2001.
- 3) Koike K. Hepatitis viruses update. *Internal Medicine* 40:173-175, 2001.
- 4) Koike K. The role of hepatitis viruses in multistep hepatocarcinogenesis. *Dig Liver Diseases* 33:2-6, 2001.
- 5) Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M,

Kimura S, Koike K. Frequent β -catenin aberration in human hepatocellular carcinoma.

Hepatol Res 20:39-51, 2001.

6) Moriya K, Nakagawa K, Santa T, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Miyazawa T, Ishibashi K, Horie T, Imai K, Miyamura T, Kimura S, Koike K. Oxidative stress in the absence of inflammation in the liver of a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma.

Cancer Res 61: 4365-4370, 2001.

7) Yotsuyanagi H, Yasuda K, Shintani Y, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Shimoda K, Hino K, Iino S, Koike K. Frequent presence of hepatitis B virus in the sera from HBs antigen-negative, anti-HBc-positive blood donors.

Transfusion 9:1093-1099, 2001.

8) Hirayama M, Maruyama T, Mitsui H, Maekawa H, Yamada H, Hashimoto N, Koike K, Kimura S, Yasuda K, Iino S, Green J. IgG1 anti-P2 as a marker of response to interferon in patients with chronic hepatitis C.

Clin Exp Immunology 126:92-100, 2001.

9) Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K. Role of hepatitis viruses in hepatocarcinogenesis.

Oncology 62: 29-37, 2002.

10) Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Topilco, Samson-Bouna M-E, Chretien Y, Pessayre D, Koike K, Chapman J, Barba G, Brechot C. Hepatitis C virus core protein

inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis

FASEB J. 16: 185-194, 2002.

C型肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変及び肝がんの病態解明に関する研究
分担研究者 森脇久隆 岐阜大学医学部第一内科教授

【研究要旨】 教室で開発した非環式レチノイド（ビタミン A 誘導体）は肝細胞癌にアポトーシスを誘導し肝発癌を抑制するが、天然レチノイドは無効であり肝癌はレチノイド不応性となっている。肝癌のレチノイド不応性の機序として、ヒト肝癌組織およびヒト肝癌細胞株（HuH7）においてレチノイド X レセプター（RXR α ）が Erk によりセリン 260/スレオニン 82 にリン酸化を受け、転写活性が低下し、かつ分解が遅延して dominant negative に作用する知見を得た。この Erk による RXR α リン酸化は正常肝細胞ではレチノイン酸により負の制御を受けたが、肝癌細胞では制御を免れ、RXR α は恒常的なリン酸化を受けていた。以上より、リン酸化 RXR α は転写機能を喪失しており dominant negative に作用するため、正常なレチノイドの細胞増殖抑制作用を阻害し、肝発癌の一機序であると考えられた。

A. 研究目的

我々は、肝発癌にレチノイドの局所的欠乏や代謝異常が関与していることを明らかにしてきた。さらに本研究では、核レセプター側の異常を明らかにする目的で、nuclear receptor superfamily の一員であるレチノイドレセプターの機能不全と肝発癌の関連について解明を進めた。

B. 研究方法

ヒト肝癌手術組織標本やヒト肝癌細胞株（HuH7）を用い、レチノイドレセプターの一つである RXR α の遺伝子変異（direct sequencing による遺伝子解析）や蛋白レベルでの修飾（immunoprecipitation-Western blot 法、³²P を用いた metabolic labeling 法）について検討を加えた。修飾（リン酸化）RXR α の機能を調べる目的で、リン酸化型・非リン酸化型 RXR α mutant cDNA を作製し、細胞に導入して転写活性（luciferase reporter assay）や細胞増殖に及ぼす影響をみた。（倫理面への配慮）ご協力いただいた患者さんには、研究内容を説明し、インフォームドコンセントを頂いた。

C. 研究結果

ヒト肝癌組織・肝癌細胞株では RXR α は分解を免れ蓄積していた。この RXR α 遺伝子には変異はみられず、蛋白レベルでのリン酸化による修飾が観察された。このリン酸化は特異的 kinase 阻害剤を用いた培養細胞での実験より、MAP kinase 系によるものであることが明らかとなった。実際、肝癌組織標本でも RXR α は、MAP kinase の基質となるセリン・スレオニン残基がリン酸化を受けており、生体での MAP kinase によるリン酸化が示唆された。

RXR α 分子中で MAP kinase の標的アミノ酸となりうるのはセリン 260 とスレオニン 82 である

ことから、これらのアミノ酸をアスパラギン酸（リン酸化型）やアラニン（非リン酸化型）に点変異させた mutant RXR α を作製した。リン酸化型 RXR α を肝癌細胞に導入すると、転写活性を有さず、分解を免れ蓄積するため dominant negative に働くこと、さらにはリン酸化型 RXR α は細胞増殖を亢進させることが示された。一方、非リン酸化型 RXR α は転写活性、分解とも回復し、細胞増殖を抑制した。

D. 考察

レチノイドは、細胞増殖を抑制し分化を誘導する作用を有する。例えば、急性前骨髄性白血病では、天然レチノイン酸の投与により白血病細胞が正常好中球に分化誘導され、レチノイン酸療法が治療の第一選択となっている。しかし、肝癌細胞は天然レチノイドに対し不応性となっており、レチノイン酸をそのまま治療に用いることは出来ない。今回の研究結果より、その原因の一端は、核レセプター（RXR α ）のリン酸化による機能不全であることが明らかとなった。更に、リン酸化 RXR α は肝癌細胞内での分解を免れ蓄積することで、正常な RXR α に対して dominant negative に作用することも推定される。現在、この分解の遅延は、リン酸化 RXR α のユビキチン/プロテアソーム分解系からの回避であることも突き止めている。今後の課題として、RXR α の機能が停止するとどのような下流の遺伝子の働きが失われ、細胞増殖に抑制がかからなくなるのかを明らかにする必要がある。一方、我々が開発した合成レチノイド（非環式レチノイド）は、肝癌細胞に apoptosis を誘導し、臨床でも肝発癌を抑制する。この非環式レチノイドは、RXR α のリン酸化を抑制し、機能を回復することを明らかにしつつあるが、その分子メカニズムについても解明を進めている。

E. 結論

肝癌の天然レチノイド不応性の機序として、ヒト肝癌組織およびヒト肝癌細胞株において RXR α が Erk によりセリン 260/スレオニン 82 にリン酸化を受け、転写活性が低下し、かつ分解が遅延して dominant negative に作用する知見を得た。このような機序により、レチノイドによる細胞増殖の抑制から逸脱することが、肝発癌の一因となっていることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsushima-Nishiwaki R, Okuno M, Adachi S, Sano T, Akita K, Moriwaki H, Friedman SL, Kijima S. Phosphorylation of retinoid X receptor α at serine 260 impairs its metabolism and function in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, 61: 7675-7682, 2001.
2. Adachi S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Takano Y, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Okano Y. Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35, 2002 (in press)
3. Okuno M, Kojima S, Akita K, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Sano T, Takano Y, Takai K, Obora A, Yasuda I, Shiratori Y, Okano Y, Shimada J, Suzuki Y, Muto Y, Moriwaki H. Retinoids in liver fibrosis and cancer. *Front. Biosci.* 7: d204-d218, 2002.
4. Okuno M, Kojima S, Moriwaki H. Chemoprevention of hepatocellular carcinoma – concept, progress and perspectives. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16: 1329-1335, 2001.
5. Okuno M, Sano T, Matsushima-Nishiwaki R, Adachi S, Akita K, Okano Y, Kojima S, Moriwaki H. Apoptosis induction by acyclic retinoid: A molecular basis of ‘clonal deletion’ therapy for hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 31: 359-362, 2001.
6. Okuno M, Moriwaki H, Matsushima-Nishiwaki R, Sano T, Adachi S, Akita K, Kojima S. Retinoid-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma: A molecular basis for ‘clonal deletion’ therapy. In Okita K (ed), *Frontiers in Hepatology: Growth, Proliferation and Apoptosis of Hepatocytes*. Springer-Verlag, Tokyo, pp 33-39, 2002.
7. Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S. Prevention of hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF- β . *Gastroenterology* 120: 1784-1800, 2001
8. Shimizu M, Hara A, Okuno M, Matsuno H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Niwa M, Akita K, Yamada Y, Yoshimi N, Uematsu T, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Mori H. Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: Impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic necrosis. *Hepatology* 33: 569-576, 2001
9. Okuno M, Akita K, Adachi S, Moriwaki H, Kojima S. Protease inhibitors: Suppression of activation of hepatic stellate cells by inhibiting TGF- β generation. In: Asakura H, Aoyagi Y, Nakazawa S (eds), *Trends in Gastroenterology and Hepatology*. Springer-Verlag, Tokyo, pp 361-361, 2001

肝癌における MICA/B の発現とNK細胞感受性の制御

主任研究者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科分子制御治療学

研究要旨：ヒト肝癌細胞における NK 細胞感受性の分子機構について解析した。ヒト肝癌細胞株は HLA class I を高発現しているにもかかわらず、NK 細胞に対して感受性であった。肝癌細胞は NK 細胞の活性化レセプターである NKG2D に対するリガンドである MICA/B を発現しており、この発現が肝癌の NK 感受性を規定していた。現在までに MICA/B の発現を誘導する薬剤については知られていなかったが、我々はレチノイン酸が MICA/B の発現を誘導することを見出した。レチノイン酸で処理した肝癌細胞は NK 細胞をより強く活性化し、NK 細胞に対して感受性となった。この現象は MICA/B の発現をモノクロナル抗体を用いマスクすることにより完全に消失したことから、MICA/B の発現誘導を介していることが示された。

A. 研究目的

肝臓は 10^{10} 個以上の免疫担当細胞を含有する一種の免疫臓器であり、その特色として NK 細胞などの先天免疫に関与する細胞が多いことをあげることができる。慢性肝疾患からの肝癌の発生あるいは初回治療後にみられる肝癌の再発を抑制する一つの方法として、これらの免疫細胞を活性化し微細な肝癌病巣を除去する治療法が期待される。

肝癌細胞がどのようにして NK 細胞に認識され障害されるかは全くわかっていない。従来 NK 細胞は MHC Class I 抗原の表出の低下した細胞を認識して障害することが知られていた (missing self)。最近この分子機構が明らかになり、NK 細胞膜上には複数の抑制性の NK レセプターがあり、標的細胞の HLA class I の発現量を認識して NK 細胞活性を抑制するシグナルを伝えていること

が示された。一方、NK 細胞には NK 細胞を活性化するレセプターの存在も明らかになり、その一つである NKG2D レセプターの標的細胞側のリガンドが non-polymorphic な HLA class I 関連分子である MICA/B であることが 1999 年に初めて明らかにされた。

このような背景から、本研究課題では肝癌細胞の認識・障害機構を肝癌の HLA class I の発現と MICA/B の発現の観点から解析を行い、これらのレセプター・リガンドの関係をターゲットとした肝癌の NK 感受性制御の可能性について検討した。

B. 研究方法

代表的な肝癌細胞株である Huh7、HepG2、Hep3B を使用した。細胞膜上の HLA Class I、MICA/B の発現は FACS にて解析した。NK 細胞は健常者の末梢血より MACS を用いて分離した。NK 細胞による標的細胞の障

害はクロムリリース法により検討した。

C. 研究成果

(1) NK 細胞による肝癌認識機構の解析

Huh7、HepG2、Hep3BはHLA Class Iを高発現していた。これらの細胞はヒトNK細胞に対して感受性であったが、クロムリリースアッセイ時にHLA Class Iモノクロナル抗体を添加しても、NK感受性が変化しなかったことから、肝癌で発現しているHLA Class IはNK細胞の抑制に関与していないことが示唆された。一方、Huh7、HepG2はMICA/Bを高発現、Hep3Bはわずかに発現しており、MICA/Bモノクロナル抗体の添加によりそのNK感受性が低下したことから、肝癌で発現しているMICA/BはNK細胞に対する感受性に重要な役割を持っていることが示された。

(2) レチノイン酸による肝癌におけるMICA/Bの発現誘導

レチノイン酸(ATRA)の投与によりHuh7、HepG2ではMICA/Bの発現が誘導された。この誘導にはMICAおよびMICBのメッセージレベルの増加を伴っていた。ATRAの投与によるMICA/Bの誘導はRAR α の拮抗阻害剤である合成レチノイドの投与により抑制されたことから、レセプターを介した現象であることが示された。

(3) MICA/Bの発現増強によるNK細胞の活性化とNK感受性の増強

レチノイン酸処理した肝癌細胞でNK細胞を刺激すると、レチノイン酸処理していない肝癌細胞に比べ、NK細胞のIFN γ 産生およびK562細胞に対する細胞障害活性が増強した。レチノイン酸処理した肝癌細胞は、非処理の肝癌細胞に比べNK細胞対

してより感受性であり、これはMICA/Bモノクロナル抗体の処理により消失した。

D. 考察

ヒト肝癌細胞におけるNK感受性は、HLA Class Iではなく肝癌において発現しているMICA/Bにより規定されていた。MICA/Bは熱ショックによりその発現が誘導されることが知られているが、この発現を誘導する薬剤については知られていなかった。本研究によりレチノイン酸がMICA/Bの発現を誘導することがはじめて明らかにされた。レチノイン酸は腫瘍細胞のアポトーシス、分化などを誘導し得ることが知られているが、癌細胞のMICA/Bの発現を誘導することによりそのNK感受性を制御するという新規の作用点があることが明らかとなった。肝癌細胞におけるNK感受性の分子機構を解明することは、新たな抗腫瘍免疫治療法の開発につながるものであると考えられる。

E. 結論

肝癌細胞に発現しているMICA/Bは、肝癌細胞のNK細胞感受性に重要な役割を持っている。レチノイン酸は肝癌細胞のMICA/Bの発現を誘導することにより、NK細胞を活性化し、肝癌のNK細胞感受性を亢進させた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katayama K, Kasahara A, Sasaki Y, Kashiwagi T, Naito M, Masuzawa M, Katoh M, Yoshihara H, Kamada T, Mukuda T, Hijioka T, Hori M, Hayashi N.

- Immunological response to interferon- γ priming prior to interferon- α treatment in refractory chronic hepatitis C in relation to viral clearance. **J Viral Hep** 8:180-185, 2001
2. Kitada T, Miyoshi E, Noda K, Higashiyama S, Ihara H, Matsuura N, **Hayashi N**, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N. The addition of bisecting N-acetylglucosamine residues to E-cadherin down-regulates the tyrosine phosphorylation of β -catenin. **J Biol Chem** 276:475-480, 2001
 3. Ito A, Kanto T, Kuzushita N, Tatsumi T, Sugimoto Y, Miyagi T, Takehara T, Katayama K, Mochizuki K, Hiramatsu N, Kasahara A, Yoshiya I, Sasaki Y, Hori M, **Hayashi N**. Generation of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes from healthy individuals with peptide-pulsed dendritic cells. **J Gastro Hepatol** 16:309-316, 2001
 4. Haruna Y, Kanda T, Honda M, Takao T, **Hayashi N**. Detection of hepatitis C virus in the bile and bile duct epithelial cells of hepatitis C virus-infected patients. **Hepatology** 33:977-980, 2001
 5. Ohkawa K, Hiramatsu N, Mochizuki K, Mita E, Iio S, Yoshihara H, Kato M, Masuzawa M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, **Hayashi N**. Significance of serum soluble Fas antigen level in chronic hepatitis C patients treated with interferon: Relationship to the therapeutic response. **J Gastro Hepatol** (in press)
 6. Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Miyagi T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, **Hayashi N**. Administration of interleukin 12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. **Cancer Res** 61:7563-7567, 2001
 7. Sugimoto Y, Kuzushita N, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Miyagi T, Jinushi M, Ohkawa K, Horimoto M, Kasahara A, Hori M, Sasaki Y, **Hayashi N**. A single nucleotide polymorphism of the low molecular mass polypeptide 7 gene influences the interferon response in patients with chronic hepatitis C. **J Viral Hep** (in press)
2. 学会発表
 1. 宮城琢也、巽 智秀、竹原徹郎、笠原彰紀、佐々木裕、林 紀夫. 大腸癌細胞における HLA class I 分子の発現とプロテアソームとの関連についての基礎的検討. 平成13年、4月、第87回日本消化器病学会
 2. 地主将久、巽 智秀、竹原徹郎、宮城琢也、佐々木裕、林 紀夫. all-trans-retinoic acid (ATRA)による肝癌細胞の LAK 細胞感受性の増強. 平成13年5月、横浜、第37回日本肝臓学会総会
 3. 巽 智秀、竹原徹郎、宮城琢也、地主将久、葛下典由、杉本佳子、笠原彰紀、佐々木裕、堀 正二、林 紀夫. Interleukin12 による肝癌樹状細胞療法の増強. 平成13年5月、横浜、第37回日本肝臓学会総会

4. 宮城琢也、竹原徹郎、巽 智秀、地主将久、佐々木裕、林 紀夫. 大腸癌細胞における HLA class I 分子の発現と Proteasome Subunit との関連についての基礎的検討. 平成13年7月、津、第5回基盤的癌免疫研究会総会
 5. 地主将久、巽 智秀、竹原徹郎、宮城琢也、佐々木裕、林 紀夫. NK細胞肝癌認識機構における HLA class I の役割とレチノイド酸による修飾. 平成13年8月、札幌、第38回日本消化器免疫学会総会
 6. 竹原徹郎、高橋 弘、林 紀夫. ヒト肝細胞癌における Bcl-xL の発現とアポトーシスの制御. 平成13年9月、横浜、第60回日本癌学会総会
 7. 地主将久、竹原徹郎、巽 智秀、宮城琢也、杉本佳子、佐々木裕、林 紀夫. NK細胞の肝癌障害機構における MHC class I 関連分子 MICA/B の役割. 平成13年10月、京都、第5回日本肝臓学会大会
 8. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Sasaki Y, Hayashi N. MHC class I-like ligand MICA/B expressed on human hepatoma cells is involved in natural killer cell-mediated killing and upregulated by all-trans retinoic acid. Nov 2001, Dallas (USA), The American Association for the Study of Liver Diseases (52nd Annual Meeting).
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得：なし
 2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
1) K Watashi. (下遠野)	Cytoplasmic Localization Is Important for Transcription Factor Nuclear Factor κ B Activation by Hepatitis C Virus Core Protein through Its Amino Terminal Region.	Virology	286	391-402	2001
2) T Noguchi. (下遠野)	Effects of Mutation in Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A on Interferon Resisitance Mediated by Inhibition of PKR Kinase Activity in Mammalian Cells.	Microbiol. Immunol	45(12)	829-840	2001
3) K Fukuda. (下遠野)	Hepatitis C Virus Core Protein Enhances the Activation of the Transcription Factor, E1kl, in Response to Mitogenic Stimuli.	Hepatology	Vol.33, No.1	159-165	2001
4) N Kato. (加藤)	Molecular Virology of Hepatitis C Virus	Acta Medica Okayama	Vol.55, No.3	133-159	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
5) K Machida. (小原)	Inhibition of Cytochrome c Release in Fas-mediated Signaling Pathway in Transgenic Mice Induced to Express Hepatitis C Viral Proteins.	Journal of Biological Chemistry	Vol.276 No.15	12140- 12146	2001
6) T Ito. (小原)	Acquisition of Susceptibility to Hepatitis C Virus Replication in HepG2 Cells by Fusion With Primary Human Hepatocytes: Establish ment of a Quantitative Assay for Hepatitis C Virus Infectivity in a Cell Culture System.	Hepatology	Vol.34 No.3	566-572	2001
7) T Shibayama. (岡本)	Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in Patients infected with HIV.	AIDS	15	563-570	2001
8) H Okamoto. (岡本)	Heterogeneous Distribution of TT Virus of Distinct Genotypes in Multiple Tissues from Infected Humans.	Virology	288	358-368	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
9) H Okamoto. (岡本)	Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaia and comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates.	Journal of General Virology	82	2041-2050	2001
10) H Okamoto. (岡本)	Analysis of the Complete Genome of Indigenous Swine Hepatitis E Virus Isolated in Japan.	Biochemical and Biophysical Research Communications	289	929-936	2001
11) S Asabe. (岡本)	Phosphorylation of Serine-Rich Protein Encoded by Open Reading Frame 3 of the TT Virus Genome.	Biochemical and Biophysical Research Communications	286	298-304	2001
12) D.H.Muljono (岡本)	Molecular epidemiology of TT virus (TTV) and characterization of two novel TTV genotypes in Indonesia.	Archives of Virology	146	11249-1266	2001
13) Y.H.Peng (岡本)	Analysis of the entire genomes of thirteen TT virus variants classifiable into the fourth and fifth genetic groups, isolated from viremic infants.	Archives of Virology	147	21-41	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
14) M Takahashi. (岡本)	TT Virus Is Distributed in Various Leukocyte Subpopulations at Distinct Levels, with the Highest Viral Load in Granulocytes.	Biochemical and Biophysical Research Communications	290	242-248	2002
15) Y Itoh. (岡上)	Time Course Profile and Cell-Type-Specific Production of Monokine Induced by Interferon- γ in Concanavalin A-Induced Hepatic Injury in Mice: Comparative Study with Interferon-Inducible Protein-10	Scandinavian Journal of Gastroenterology	36(12)	1344-1351	2001
16) Y Itoh. (岡上)	Clinical Significance of elevated serum interferon-inducible protein-10 levels in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum transaminase levels	Journal of Viral Hepatitis	8(5)	341-348	2001
17) K Nishioji. (岡上)	Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes	Clinical Experimental Immunology	123	271-279	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
18) H Uto. (坪内)	Transduction of Antisense Cyclin D1 Using Two-step Gene Transfer Inhibits the Growth of Rat Hepatoma Cells	Cancer Research	61	4779-4783	2001
19) A Ido. (坪内)	Gene Therapy Targeting For Hepatocellular Carcinoma-Selective and Enhanced Suicide Gene Expression Regulated by a Hypoxia-inducible Enhancer Linked to a Human α -Fetoprotein Promoter.	Cancer Research	61	3016-3021	2001
20) T Yamashita. (金子)	Serial Analysis of Gene Expression in Chronic Hepatitis C and Hepatocellular Carcinoma	Biochemical and Biophysical Research Communications	282	647-654	2001
21) Y Shirota. (金子)	Identification of Differentially Expressed Genes in Hepatocellular Carcinoma With cDNA Microarrays	Hepatology	33	832-840	2001
22) M Honda. (金子)	Differential Gene Expression Between Chronic Hepatitis B And C Hepatic Lesion	Gastroenterology	120	955-966	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
23) Hiroshi F. (金子)	α -Fetoprotein- Producing Hepatoma Cell Lines Share Common Expression Profiles of Genes in Various Categories Demonstrated by cDNA Microarray Analysis	Hepatology	33	676-691	2001
24) T Kato. (脇田)	Sequence Analysis of Hepatitis C Virus Isolated From a Fulminant Hepatitis Patient	Journal of Medical Virology	64	334-339	2001
25) K Koike. (脇田)	Molecular Mechanism of Viral Hepatocarcinogenesis	Oncology	62 suppl 1	29-37	2002
26) K Moriya. (小池)	Increase in the Concentration of Carbon 18 Monounsaturated Fatty Acids in the Liver with Hepatitis C: Analysis in Transgenic Mice and Humans	Biochemical and Biophysical Research Communications	281	1207- 1212	2001
27) K Koike. (小池)	Role of hepatitis viruses In multistep hepatocarcinogenesis	Digest Liver Dis	33	2-6	2001
28) K Moriya. (小池)	Oxidative Stress in the Absence of Inflammation in a Mouse Model for Hepatitis C Virus-associated Hepatocarcinogenesis	Cancer Research	61	4365- 4370	2001

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
29) R Matsushima a-Nishiwaki (森脇)	Phosphorylation of Retinoid X Receptor α at Serine 260 Impairs Its Metabolism and Function in Human Hepatocellular Carcinoma	Cancer Research	61	7675- 7682	2001
30) M Okuno. (森脇)	Apoptosis Induction by Acyclic Retinoid: a Molecular Basis of 'Clonal Deletion' Therapy for Hepatocellular Carcinoma	Jpn.J Clin. Oncol	31(8)	359-362	2001
31) T Tatsumi. (林)	Administration of Interleukin-12 Enhances the Therapeutic Efficacy of Dendritic Cell-based Tumor Vaccines in Mouse Hepatocellular Carcinoma	Cancer Research	61	7563- 7567	2001
32) Y Haruna. (林)	Detection of Hepatitis C Virus in the Bile and Bile Duct Epithelial Cells of Hepatitis C Virus-Infected Patients	Hepatology	33	977-980	2001