

6. T Shimakami, M Hijikata, H Luo, Y Y Ma, S Kaneko, K Shimotohno, and S Murakami. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 78(6): 2738-2748, 2004.
7. A Daiba, N Inaba, S Ando, N Kajiyama, H Yatsunami, H Terasaki, A Ito, M Ogasawara, A Abe, J Yoshioka, K Hayashida, S Kaneko, M Kohara, S Ito. A low-density cDNA microarray with a unique reference RNA: pattern recognition analysis for IFN efficacy prediction to HCV as a model. *Biochem Biophys Res Co* 315(4): 1088-1096, 2004.

G. 知的所有権の取得状況
無し

厚生労働肝炎等克服対策研究事業
「B型及びC型肝炎の疫学及び検診を含む肝炎対策に関する研究」
平成16年度分担研究報告書

腫瘍マーカーとしての血中 SHAP-HA 複合体の有用性

分担研究者 各務 伸一 愛知医科大学消化器内科 教授

研究要旨：SHAP (serum-derived hyaluronan associated protein) は血清由来の蛋白質であり、生体内でヒアルロン酸 (HA) と結合して SHAP-HA 複合体 (SHAP-HA) を形成することが知られている。今回我々は SHAP-HA の腫瘍マーカーとしての有用性につき検討した。血中 SHAP-HA 濃度は、B型、C型とも慢性肝炎 (CH) 群、肝硬変 (LC) 群と、病態の進行とともに有意に上昇した。また、B型、C型とも HCC 群では LC 群に比べてさらに有意に増加していた。また、SHAP-HA と HA との相関係数は各病態により異なっており、原因ウイルスの違いや病態の違いが SHAP-HA の合成過程に何らかの影響を及ぼしている可能性があり、更なる検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

SHAP は血清由来の蛋白質であり、生体内でヒアルロン酸 (HA) と結合して SHAP-HA 複合体 (SHAP-HA) を形成することが知られている。これまでに我々は慢性肝疾患患者の血清中の SHAP-HA 値を測定し、線維化マーカーとしての有用性を報告してきたが、その際、肝臓癌 (HCC) を合併した患者において血中 SHAP-HA 濃度が著明に上昇していることを見出した。そこで今回 SHAP-HA の腫瘍マーカーとしての有用性につき検討した。

B. 研究方法

C型慢性肝炎 (C-CH) 101例、C型肝硬変 (C-LC) 105例、C型 HCC (C-HCC) 症例 69例、B型慢性肝炎 (B-CH) 46例、B型肝硬変 (B-LC) 47例、B型 HCC (B-HCC) 症例 24例、健常人コントロール 27例を対象とし、各症例の保存血清を用いて SHAP-HA および HA を測定した。SHAP-HA の測定は我々の開発した sandwich ELISA 法にて行った。HA については市販の ELISA プレートを用いて測定した。

C. 研究結果

今回 SHAP-HA 濃度を測定した全例について、SHAP-HA と HA の相関関係を調べた

ところ、両者は有意な正の相関関係にあった。C-CH、C-LC 群における SHAP-HA 濃度はそれぞれ 5.3 ± 3.7 、 6.5 ± 4.9 (U/ml) であり、CH、LC と病態の進行と共に SHAP-HA 濃度は有意に増加していた ($p < 0.05$)。さらに、C-HCC 群では 9.6 ± 7.6 (U/ml) であり C-LC 群にくらべて有意に高値 ($p < 0.01$) を示した。同様に B-CH、B-LC 群における SHAP-HA 濃度はそれぞれ 3.9 ± 3.8 、 5.8 ± 5.0 (U/ml) であり、CH、LC と病態の進行と共に SHAP-HA 濃度は有意に増加し ($p < 0.05$)、また B-HCC 群においては 10.8 ± 8.4 (U/ml) であり B-LC 群にくらべて有意に高値 ($p < 0.01$) を示した。C-CH、C-LC、C-HCC 群のそれぞれにおいて、SHAP-HA と HA の相関関係を調べたところ、相関係数は C-LC、C-CH、C-HCC の順に高値を示した。一方、B-CH、B-LC、B-HCC 群における相関係数は B-HCC、B-LC、B-CH の順に高値を示した。

D. 考察

これまでの我々の検討から SHAP-HA は P-3-P や IV型コラーゲン 7S などの既知の線維化マーカーと有意な相関関係にあり、肝の線維化のマーカーとして有用であることが確認されていたが、今回の検討では、HCV または HBV のどちらの感染の場合

でも HCC 群では LC 群に比べて約 1.5~2 倍の上昇がみられ、HCC のマーカーとして有用である可能性が示された。また、SHAP-HA と HA との相関係数が各病態により異なっていたことより、原因ウイルスの違いや病態の違いが SHAP-HA の合成過程に何らかの影響を及ぼしている可能性があり、更なる検討が必要であると考えられた。

E. 結論

SHAP-HA は肝細胞癌のマーカーとして有用であると考えられた。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
当該研究に関するものはなし。
2. 学会発表
当該研究に関するものはなし。

H. 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

厚生科学研究費補助金
(分担) 研究報告書

C型慢性肝炎患者樹状細胞のIFN α 反応性低下機序の解析

主任研究者 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科 分子制御治療学教授

研究要旨：C型慢性肝炎患者の樹状細胞は、非感染者に比べてIFN α に対する反応性が低下しており Th1 誘導能の亢進が認められなかった。これには IL-10 産生能の亢進や CD86 発現の低下が関与しており、リバビリン併用により回復する症例が存在した。

A. 研究目的

樹状細胞(DC)は最も強力な抗原提示細胞であり、NK細胞やT細胞の活性化を介してウイルス感染において重要な役割を果たしている。C型慢性肝炎に対するIFN α /リバビリン併用療法において、HCVが排除された例ではTh1型の免疫応答が増強している。本研究では、IFN α とリバビリンがDCのTh1誘導能に及ぼす影響を解析し、その反応性が実際のIFN α /リバビリン併用療法による治療効果と関連する可能性を評価することを目的とした。

B. 研究方法

C型慢性肝炎患者または非感染者の末梢血単球からDCを誘導した。この過程でIFN α 、リバビリンまたは両者を添加した。DCとナイーブCD4 T細胞との共培養の後、ELISAまたは細胞内染色によりCD4 T細胞のIFN γ 産生能を評価することで、DCのTh1誘導能を評価した。IFN α /リバビリンの添加によるDCの表面抗原やサイトカイン産生能の変化を解析し、Th1誘導能との相関を検討した。またその後IFN/リバビリン併用24週療法を受けた患者において、治療前のDC機能の解析結果と、実際のIFN α /リバビリン治療によるHCV排除の成否との関連性を検討した。

(倫理面への配慮)対象者には研究の意義、目的、匿名性の確保につき事前に説明し、同意を得た。

C. 研究結果

非感染者DC(N-DC)ではIFN α によりTh1反応が増強したが、C型慢性肝炎患者DC(HCV-DC)ではIFN α による増強は認めなかった。N-DCはIFN α によりCD86発現の亢進、IL-10産生の低下が認められ、これらの変化率とTh1誘導能は有意な相関を認めた。一方、HCV-DCではIFN α によるCD86、IL-10の変化はいずれもN-DCに比べ軽度で、Th1誘導能と相関しなかった。IFN α /リバビリン24週併用療法が施行されたC型慢性肝炎患者20例のうち、治療前の解析でIFN α /リバビリンによりDCのTh1機能が回復した症例は6例存在し、うち5例はHCVが排除された。

D.E. 考察、結論

C型慢性肝炎患者のDCはIFN α に対する反応性が低下しており、Th1誘導能が低下していた。これにはDCのCD86発現誘導の低下、IL-10産生の持続高値が関与していた。治療前のDC機能は、その後のIFN α /リバビリン治療の効果予測の免疫学的マーカーになる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表：第40回日本肝臓病学会総会(東京、2004年)

G. 知的所有権の取得状況

なし。

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
分担研究報告書

C型肝炎ウイルス感染患者におけるNK細胞レセプターの発現異常とその機能的意義

主任研究者： 林 紀夫 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨：NK細胞の機能は種々の活性化レセプターと抑制レセプターのバランスにより制御されている。C型肝炎患者におけるNK細胞レセプターの発現を検討したところHLA-Eを認識する抑制性レセプターであるCD94/NKG2Aの発現が有意に亢進していた。K562などの古典的なNK感受性株とは異なり検討したすべての肝癌細胞株はHLA-Eが陽性であり、C型肝炎患者のNK細胞はこれらの肝癌細胞株に対して細胞傷害活性が減弱していた。さらに、C型肝炎患者のNK細胞は肝癌細胞の存在下において、樹状細胞の成熟誘導・活性化が減弱していた。これらの異常がCD94/NKG2Aの発現亢進によることがNKG2A抗体を用いたブロック実験により示された。本研究により、C型肝炎ウイルス感染に伴ってNK細胞レセプターの発現に異常があることが明らかとなり、この異常は先天免疫のみならず獲得免疫にも影響を与えることが示唆された。

共同研究者：竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・助教授

A. 研究目的

Natural killer (NK) 細胞はトランスフォームした細胞を非特異的に傷害する活性を指標に定義された細胞集団である。その活性は多様な活性化レセプターと抑制性レセプターのバランスの上に制御されていることが明らかにされている。また、NK細胞は初期免疫に関与する代表的な免疫担当細胞であるが、近年その後の獲得免疫応答形成への影響が注目されている。C型肝炎では

NK細胞活性が抑制されているという報告とこれに否定的な報告があるが、これらはいずれも古典的なNK感受性細胞を標的とした細胞傷害活性を指標とした研究である。今回、我々はC型肝炎におけるNK細胞の機能をNKレセプター発現の観点から解析し、これがNK細胞の活性制御や樹状細胞の機能修飾にどのように関与しているのかを検討した。

B. 研究方法

C型肝炎患者および健常者よりCD56陽性細胞をMACSシステムにより分離した。

K562 あるいは肝癌細胞株に対する傷害活性は4時間のクロムリリース法により測定した。NK 細胞レセプターの発現は FACS により解析した。健常者より単球を分離し、GM-CSF および IL-4 により樹状細胞を分化誘導した。樹状細胞の成熟は CD86 等の表面抗原により解析した。樹状細胞の活性化は同種 CD4 陽性 T 細胞に対する増殖活性で評価した。

(倫理面への配慮)

患者および健常者からの血液サンプルの採取にあたっては、インフォームドコンセントの取得後に行った。

C. 研究成果

C 型肝炎患者の末梢血 CD56 陽性細胞は K562 に対する細胞傷害活性は健常者と差がみられなかったが、Hep3B 等の肝癌細胞に対する傷害活性は有意に低下していた。NK 細胞レセプターの発現を解析すると C 型肝炎患者の NK 細胞は CD94/NKG2A の発現が健常者に比し亢進していた。肝癌細胞株は K562 とは異なり NKG2A のリガンドである HLA-E を発現していたが、HCV 患者の NK 細胞による Hep3B に対する傷害活性は NKG2A をブロックすることにより健常者と同レベルまで上昇した。以上のことより、C 型肝炎患者の NK 細胞は NKG2A の発現亢進を介して、HLA-E 陽性細胞に対する傷害活性が低下していることが示された。

無刺激の NK 細胞は樹状細胞の成熟・活性化を誘導しなかったが、NK 細胞は Hep3B との混合培養により NKG2D を介して活性化され、樹状細胞の成熟、さらには T

細胞の増殖を誘導した。C 型肝炎患者の NK 細胞はこの DC および T 細胞の活性化が低下していたが、これは NKG2A をマスクすることにより健常者と同レベルまで回復した。

D. 考察と結論

NK 細胞は肝癌細胞株の刺激により NKG2D を介して活性化され、液性因子を介して樹状細胞の成熟、T 細胞の増殖を誘導した。C 型肝炎患者では CD94/NKG2A が高発現しているために、肝癌に対する細胞傷害活性とともに樹状細胞の成熟・活性化誘導能が低下していた。一般に微生物由来の微細な構造は樹状細胞に発現する Toll 様レセプターにより免疫系に認識される。一方、細胞のがん化などの異常は NK レセプターにより認識されるが、C 型肝炎患者では抑制系のレセプターが優位になることによりこの機構が負に制御されていると考えられる。

E. 研究発表

論文発表

1. Ohkawa K, Ishida H, Nakanishi F, Hosui A, Ueda K, Takehara T, Hori M, Hayashi N. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. *J Biol Chem* 279: 11719-11726, 2004.
2. Kaimori A, Kanto T, Limn CK, Komada Y, Oki C, Inoue M, Miyatake H, Itose I, Sakakibara M, Yakushijin T, Takehara T, Matsuura Y, Hayashi N. Pseudotype hepatitis C virus enters

- immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin. *Virology* 324: 74-83, 2004.
3. Hiramatsu N, Kasahara A, Nakanishi F, Toyama T, Tsujii M, Tsuji S, Kanto T, Takehara T, Kato M, Yoshihara H, Naito M, Katayama K, Hijioka T, Hagiwara H, Kubota S, Oshita M, Meren H, Masuzawa M, Haruna Y, Mita E, Suzuki K, Hayashi N. The significance of interferon and ribavirin combination therapy followed by interferon monotherapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. *Hepatol Res* 29: 142-147, 2004.
 4. Ishida H, Ohkawa K, Hosui A, Hiramatsu N, Kanto T, Ueda K, Takehara T, Hayashi N. Involvement of p38 signaling pathway in interferon- α -mediated antiviral activity toward hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 722-727, 2004.
 5. Toyama T, Sasaki Y, Horimoto M, Iyoda K, Yakushijin T, Ohkawa K, Takehara T, Kasahara A, Araki T, Hori M, Hayashi N. Ninjurin1 increases p21 expression and induces cellular senescence in human hepatoma cells. *J Hepatol* 41:637-643, 2004.
 6. Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Rucker III EB, Hennighausen L, Jinushi M, Miyagi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* 127: 1189-1197, 2004.
 7. Miyagi T, Takehara T, Tatsumi T, Suzuki T, Jinushi M, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Kanto T, Tsuji S, Hori M, Hayashi N. Concanavarin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an anti-tumor effect in murine liver. *Hepatology* 40: 1190-1196, 2004.
 8. Nakanishi F, Ohkawa K, Ishida H, Hosui A, Sato A, Hiramatsu N, Ueda K, Takehara T, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Alteration in gene expression profile by full-length hepatitis B virus genome. *Intervirology* (in press).
 9. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Kanto T, Miyagi T, Suzuki T, Kanazawa Y, Hiramatsu N, Hayashi N. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 173: 6072-6081, 2004.
 10. Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijin T, Oki C, Itose I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in

chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 190: 1919-1926, 2004.

学会発表

1. Tetsuo Takehara, Tomohide Tatsumi, Takahiro Suzuki, Masahisa Jinushi, Takuya Miyagi, Yoshiyuki Kanazawa, Ohkawa Kazuyoshi, Naoki Hiramatsu, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi A mechanism of hepatocyte apoptosis-mediated liver fibrosis: Production of TGF β through hepatocyte and macrophage engulfment of apoptotic cells. (Oral; #223) The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting) Oct 30~Nov 2, 2004; Boston (USA)
 2. Takuya Miyagi, Tetsuo Takehara, Tomohide Tatsumi, Takahiro Suzuki, Masahisa Jinushi, Yoshiyuki Kanazawa, Naoki Hiramatsu, Tatsuya Kanto, Norio Hayashi. Concanavarin A injection activates liver innate immune cells, NKT cells and NK cells, to provoke an anti-tumor effect in murine liver. (Poster; #1233) The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting) Oct 30~Nov 2, 2004; Boston (USA)
 3. Masahisa Jinushi, Tetsuo Takehara, Tomohide Tasumi, Tatsuya Kanto, Takuya Miyagi, Takahiro Suzuki, Norio hayashi. The critical role of NKG2A inhibitory receptor for NK cell-induced dendritic cell modulation of T cell responses in chronic hepatitis C virus infection. (Poster; #644) The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting) Oct 30~Nov 2, 2004; Boston (USA)
 4. Hiramatsu N, Kasahara A, Yamaguchi S, Ishii S, Miyazaki M, Toyama T, Yasumaru M, Kanto T, Takehara T, Hayashi N. Necessity of early re-treatment for patients with chronic hepatitis C who do not achieve sustained response by interferon monotherapy. (Poster; #383) The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting) Oct 30~Nov 2, 2004; Boston (USA)
 5. Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Housui A, Jinushi M, Tatsumi T, Kanazawa Y, Hayahsi N. Involvement of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA in sustained HBV replication in immunocompromised mice after hydrodynamic injection of a naked plasmid encoding HBV DNA. (Oral; #281) The American Association for the Study of Liver Diseases (55th Annual Meeting) Oct 30~Nov 2, 2004; Boston (USA)
- F. 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

肝癌患者における MAGE 抗原に対する細胞性免疫応答の検討

分担研究者 井廻 道夫 昭和大学医学部第二内科 教授

研究要旨

肝癌患者において癌治療に応用する目的で、MAGE 抗原特異的細胞障害性 T細胞の有効な誘導法を検討するため、末梢リンパ球の MAGE 抗原ペプチドに対する免疫応答を測定した。MAGE 抗原に反応する免疫細胞の frequency は低く、*in vitro* で刺激し増殖させてから、ELISpot 法を施行した方が良いと考えられる。

A. 研究目的

MAGE 抗原は免疫原性の高い癌特異抗原として知られており、肝癌においても約 70% の症例で発現がみられるとの報告がある。今回我々は、治療への応用を目的とした MAGE 抗原特異的細胞障害性 T細胞の有効な誘導法を検討するため、ELISpot 法を用いて、肝癌患者末梢リンパ球の MAGE 抗原ペプチドに対する免疫応答を測定した。

B. 研究方法

MAGE-1 抗原全長を網羅し、10 アミノ酸ずつオーバーラップする 20 アミノ酸のペプチドを計 30 種類作成した。肝癌患者 8 例について計 12 回、肝癌患者末梢リンパ球から CD8 陽性細胞を分離し、 1×10^5 cells/well に $10 \mu\text{g/ml}$ のペプチドを加えて、IFN- γ 産生細胞を算定する ELISpot 法を

施行した。

（倫理面への配慮）

「研究への協力のお願ひ」と題する説明文書を本人に渡し、これをもとに、研究の目的、提供していただく試料、試料の採取方法、試料の使用法、試料の管理と保管、試料提供に伴う利益・不利益、自由意思による同意と同意撤回の自由、研究への参加を断っても診療上の不利益は受けないこと、プライバシーの保護、個人の解析結果は原則的に開示しないこと、倫理性の審査、研究に関わる費用、研究結果の公開、知的財産権、質問の自由、に関して説明し十分納得されたことを確認した後に同意を得る。承諾をいただいた方に同意書 2 通に自著で署名をいただき、一通は本人に渡し、一通は昭和大学第二内科学教室で管理する。

C. 研究結果

1例において、201-220のアミノ酸に相当するペプチドの刺激に対してIFN- γ 産生が認められた。しかし、同一症例のTAE治療後に行ったassayでは、同ペプチドに対して応答は認められなかった。その他の症例ではMAGE-1ペプチドに対して応答は認められなかった。

D. 考察

MAGE抗原に応答する免疫細胞のfrequencyは低く、*in vitro*で刺激し増殖させてから、ELISpot法を施行した方が良いと考えられる。肝癌治療によりMAGE抗原を認識する免疫細胞のfrequencyが変化することも考えられ、今後の検討が必要と考えられる。肝癌細胞におけるMAGE抗原の発現の有無も検討課題である。

E. 結論

肝癌患者のリンパ球を用いて、MAGE抗原特異的細胞障害性T細胞を誘導するには、*in vitro*での刺激が必要と考えられるが、さらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書

コホートをを用いた HCV による肝障害進展機序の解明

分担研究者 坪内博仁、宮崎医科大学第二内科教授

研究主旨

HCV 高侵淫地区住民 HCV 抗体陽性者を対象に、HCV による肝障害進展因子および肝発癌関連因子を明らかにすることが本研究の目的である。本年度は解析対象者をさらに増やして検討を行い、さらにプロテインチップを用いたプロテオーム解析を開始した。207 人の HLA 解析では、DRB1*0101 と DQB1*0501 が HCV 持続感染に強く関与していた。また、2000 年までに 4 回以上検診を受診した HCV 陽性 ALT 持続正常者 162 人から 2001 年以降肝癌は発生せず、肝機能異常者 287 人の肝癌発生 7 人より少なかった。さらに、健康成人、慢性肝炎、肝硬変および肝癌患者の血清を対象として、SELDI プロテインチップを用いたスペクトラム解析を行い、健康成人と比較して C 型慢性肝炎患者と肝癌患者血清に特異的に出現する、あるいは消失するピークを認めた。また、健康成人と肝癌には認めず、肝癌のない慢性肝炎患者のみに出現するピークも存在した。本研究により、HCV 持続感染に関与する DRB1*0101 と DQB1*0501 を同定した。また、HCV による慢性肝炎患者に特異的な可能性のある蛋白の候補を見出した。今後その蛋白同定をすすめたい。

共同研究者

林 克裕	宮崎大学医学部第二内科
宇都浩文	宮崎大学医学部第二内科
楠元寿典	宮崎大学医学部第二内科
上村修司	宮崎大学医学部第二内科

A. 研究目的

本研究の目的は、C 型肝炎ウイルス (HCV) 高侵淫地区住民の追跡調査により、HCV による肝細胞障害進展因子および肝発癌関連因子を明らかにすることである。

B. 研究方法

1) Town C の住民 5571 名の内 1151 名が HCV 抗体陽性で、そのうち 836 名は HCV コア抗原もしくは HCV-RNA を測定した。この 836 名をさらに下記の通り群別した。

① HCV コア抗原もしくは HCV-RNA が陽性の P 群 591 名と両者とも陰性の N 群 245 名。

② P 群の中で、1993 年から 2000 年までに少なくとも 4 回以上検診を受診し、ALT が常に 35IU/L 未満であった肝機能正常群 (P-N 群) 162 名と少なくとも 1 回以上 ALT が 35IU/L 以上であった肝機能異常群 (P-A 群) 286 名。

2) これまでに収集した検査成績や検体を用いて、以下の検討を行った。

① P 群 146 名、N 群 61 名を抽出し、HLA class I, class II を測定し、HCV の持続感染に相関する HLA を昨年度に引き続き検討した。

② P-N 群、P-A 群の臨床的特徴を比較し、それぞれ 71 名と 75 名を抽出し HLA を解析した。

③ P-N 群、P-A 群の中から、血清学的 HCV 群別 1 の住民 (それぞれ 14 名と 15 名) を選択し、HCV core 領域の解析から得られた塩基配列を元にして、遺伝子距離を算出した。HCV RNA は 2002 年度の検診保存血清から抽出し、RT-PCR、サブクローニングを行い、一検体につき各々 10 個の独立したコロニーから DNA を抽出し、遺伝子配列を決定した。

④ Ciphergen Biosystems 社製の SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption / Ionization) プロテインチップシステムを用いて、患者血清のプロテオーム解析を行った。肝癌 4 名、肝癌合併のない肝硬変 4 名、慢性肝炎 4 名、正常者 4 名の血清を用いて検討した。

倫理面の配慮 (昨年度までと同様である)

a. 個人の人権の擁護: 1) 研究内容について充

分な説明を行い、研究への参加は任意であること、研究に参加しない場合でも、従来通り検診を受けることができることを示す。2)参加者は肝疾患について詳細なフォローアップを得ることができる。また、検診終了後、検査結果報告書と担当医への依頼書を手渡し、参加者にはかかりつけ医または地域の中核病院を受診するようにアドバイスするので、参加者の利益となる。3)参加者のデータは、厳重な秘密保持のもとに管理され、本研究のデータが参加者に不利益を及ぼすことはないと考えられる。

- b. 個人情報の管理：1) ID 番号、氏名、住所、電話番号などの個人を特定できる情報を除いたものを作製し、新たな番号を付与し、本研究にはこの番号のみを用い、個人が特定できる名前などを用いない。2) 対象者由来の血液サンプルは個人が同定できる情報を消去して、番号を付与する。
- c. 対象者に理解を求め同意を得る方法：検診時に宮崎医科大学第二内科の担当医およびT町看護婦より、研究内容について説明を行ない、書面による同意を得る。(ただし、昨年度まで同意書を取得した対象者については、本年度は改めて同意書は作製しない。)
- d. 研究等によって生じる個人への不利益：超音波検査や静脈穿刺は侵襲性のあるものではなく、被験者に不当な危険が生じることはない。個人のプライバシーに関わる点については上記のように十分な配慮を行い、対象者の不利益が生じないようにする。

C. 研究成果

- 1) HCV RNA 陽性群は陰性群に比べ A*2603、B*0702、B*1501、DRB1*0101、DRB1*0406、DQB1*0501 の頻度が有意に低かった。特に、ハプロタイプ解析で DRB1*0101 と DQB1*0501 は HCV 排除と強い関連を認めた。
- 2) 肝機能正常群 (P-N群) は肝機能異常群 (P-A群) と比較して、女性が多く、1995年時の平均年齢が高い傾向であったが、HCVコア抗原量とHCV群別(セロタイプI or II)に有意差はなかった。また、2001年から2004年

までにP-A群から7例の肝癌が発症したが、P-N群からは肝癌の発症はなかった。

- 3) 肝機能正常群 (P-N群) は肝機能異常群 (P-A群) に比較してHLA B*3501、HLA C*0303、HLA DRB1*1501、DQB1*0602の頻度が有意に高かった。
- 4) P-N群15例、P-A群14例のHCV core領域の遺伝子解析を行い、P-N群の方がP-A群に比較して有意に遺伝子距離が離れたクローンが多かった。
- 5) 分子量が約7800m/zに正常者で認められ、HCV関連肝疾患で認めないピーク、約8000m/zに肝癌のみで認め、肝硬変、慢性肝炎、正常者でほとんど認められないピーク、約9000m/zに正常者では認めず、HCV関連肝疾患では認めるピークを検出した。現在蛋白同定中である。

D. 考察

1) 今までに少数症例であるが、HLAとHCV排除や肝障害との関連が検討されており、特にHLA DRB1*0406はHCV排除に関与すると報告されている。今回の検討でもHLA DRB1*0406がHCV排除と関連していたが、さらにハプロタイプのDRB1*0101とDQB1*0501がHCV排除と強く相関していることを明らかにした。また、HLA B*3501、HLA C*0303、HLA DRB1*1501、DQB1*0602は肝障害の発現に関与している可能性を見出した。また、DRB1*1101、DRB1*1302、DQB1*0604と肝障害との関連性が今までに報告されているが、今回の検討では同様の結果は得られず、以前の報告とは異なったHLAと肝障害との関連性が明らかになった。このように、HLAとHCV関連肝疾患との関連は必ずしも以前の報告とは一致せず、特に頻度の低い方でそのような傾向であり、症例数や地域性によるものか、HCV群別との関連性など、さらに検討を進める必要がある。

2) ウイルス持続感染者の中で持続異常群では、肝機能持続正常群に比べ多彩なquasispeciesを持ち、肝機能異常群のほうが遺伝子距離は遠いと報告されているが、我々の検討では遺伝子距離の結果は逆に肝機能持続正常群の方が遠いという結果であった。

我々の対象者の平均年齢は70歳と他の報告より高齢であり、感染期間による差も考えられ、今後、感染時期からの年数や経時的変化も合わせて検討する必要がある。また、他の領域の解析も行い、肝障害やコア領域の遺伝子変異との関連性を検討する予定である。

3) SELDI プロテインチップシステムを用いて微量の血液から再現性よく低分子蛋白もしくはペプチドの発現プロファイルが得られ、肝疾患の進展に関与する可能性のあるピークを同定した。今後、症例数を増やし、統計学的手法で解析することで、蛋白の同定を必要としない肝癌診断が可能となる可能性がある。また、蛋白の同定により、肝疾患の進展に関与する因子が同定出来れば、肝疾患の進展を抑制する分子標的治療法の確立が期待できると考えられた。

E. 結論

HCV 高侵淫地区住民を対象とした解析により、HCV 関連肝疾患の病態に関わる HLA を同定し、特異的な蛋白候補を見出した。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

【論文】

- 1) Kasahara A, Tanaka H, Okanoue T, Imai Y, Tsubouchi H, Yoshioka K, Kawata S, Tanaka E, Hino K, Hayashi K, Tamura S, Itoh Y, Kiyosawa K, Kakumu S, Okita K, Hayashi N. Interferon treatment improves survival in chronic hepatitis C patients showing biochemical as well as virological responses by preventing liver-related death. *Journal of Viral Hepatitis* 11, 148-156. 2004.
- 2) 堀 剛、永田賢治、坪内博仁：肝細胞癌の経皮的治療（ラジオ波焼灼療法について）。*宮崎県内科医会誌* 2-7, 2004
- 3) Raker AC, Tabor E, Okayama A, Yu WM, Kohara M, Mueller EN, Tsubouchi H, Stuver OS: HCV core antigen as an alternative to

NAT to detect HCV Viremia. *Transfusion* 44, 307-308, 2004.

- 4) Onaga M, Ido A, Hasuike S, Uto H, Moriuchi A, Kato J, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Enhanced expression of growth factors and imbalance between hepatocyte proliferation and apoptosis in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Hepatology Research* 28, 94-101, 2004
- 5) 江藤敏治、林克裕、坪内博仁、亀井健二：学生定期健康診断におけるエコー健診導入の意義 -肥満学生での検討- *CAMPUS HEALTH* 41, 111-116, 2004.
- 6) Okayama Ak, Stuver OS, Matsuoka M, Ishizaki J, Tanaka G, Kubuki Y, Mueller N, Hsieh Ch, Tachibana N, Tsubouchi H: Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia /lymphoma in asymptomatic carriers. *Int J Cancer* 110, 621-625, 2004.
- 7) 井戸章雄、坪内博仁：HGFによる肝再生医療の現況。 *ゲノム医学* 4, 61-67, 2004.
- 8) 大工原恭、坪内博仁：肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor）-その発見の歴史、齒科医学との関連、臨床応用の現状- *生化学* 76, 640-649, 2004.
- 9) Birmann BM, Mueller N, Okayama A, Hsieh CC, Tachibana N, Tsubouchi H, Lennette ET, Harn D, Stuver OS: Serologic assessment of type 1 and type 2 immunity in healthy Japanese adults. *Cancer epidemiol biomarkers prev* 13: 1385-1391, 2004.
- 10) Kato J, Ido A, Hasuike S, Uto H, Hori T, Hayashi K, Murakami K, Terano A, Tsubouchi H. Transforming growth factor- β -induced stimulation of formation of collagen fiber network and anti-fibrotic effect of taurine in an in vitro model of hepatic fibrosis. *Hepatol Res* 30, 34-41, 2004.

- 11) Makiyama A, Itoh Y, Kasahara A, Imai Y, Kawata S, Yoshioka K, Tsubouchi H, Kiyosawa K, Kakumu S, Okita K: Characteristics of patients with chronic hepatitis C who develop hepatocellular carcinoma after a sustained response to interferon therapy. *Cancer* 101, 1616-1622, 2004.
- 12) Ido A, Moriuchi A, Kim I, Numata M, Nagata T, Tsubouchi Y, Hasuike S, Uto H, Tsubouchi H: Pharmacokinetic study of recombinant human hepatocyte growth factor administered in bolus intravenously or via portal vein. *Hepatol Res* 30, 175-181, 2004.
- 13) Imai Y, Kasahara A, Tanaka H, Okanoue T, Hiramatsu N, Tsubouchi H, Yoshioka K, Kawata S, Tanaka E, Hino K, Hayashi K, Tamura S, Itoh Y, Sasaki Y, Kiyosawa K, Kakumu S, Okita K, Hayashi N: Interferon therapy for aged patients with chronic hepatitis C: improved survival in patients exhibiting a biochemical response. *J Gastroenterol* 39, 1069-1077, 2004.
- 14) Tsubouchi H: Sustained activation of epidermal growth factor receptor in cholangiocarcinoma: a potent therapeutic target? *Journal of Hepatology* 41, 859-861, 2004.
- 15) Sho Y, Fujisaki K, Sakashita H, Yamaguchi K, Tahara K, Kubozono O, Ido A, Tsubouchi H: Orally administered Kampo medicine, Juzen-taiho-to ameliorates anemia during interferon plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 39, 1202-1204, 2004.
- 16) Takami Y, Kanasaki K, Tsubouchi H, Ishii T, Yamamoto I, Gohda E: Inhibition of hepatocyte growth factor induction in human dermal fibroblasts by interleukin-1 and its prevention by interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 676-682, 2004.
- 【学会報告】
- 1) 井戸章雄、森内昭博、坪内博仁：難治性の消化器疾患に対する肝細胞増殖因子（HGF）の臨床応用。日本消化器病学会総会（仙台）2004年4月
- 2) 宇都浩文、林克裕、楠元寿典、蓮池悟、永田賢治、堀剛、井戸章雄、山岸俊哉、坪内博仁：血清 HGF activator inhibitor (HAI)-1 の肝線維化マーカーとしての有用性の検討。日本内科学会総会（東京）2004年4月
- 3) 宇都浩文、林克裕、楠元寿典、蓮池悟、坂元秀壮、元田みずえ、永田賢治、加藤順也、駒田直人、重平正文、井戸章雄、坪内博仁：HCV 高浸淫地区住民を対象とした ALT の変動と肝癌発症との関連の検討。日本消化器病学会（仙台）2004年4月
- 4) 江藤敏治、林克裕、岩満章浩、岩切久芳、元田みずえ、蓮池悟、宇都浩文、堀剛、中間哲文、末田光恵、村田光宏、落合俊雅、坪内直子、黒木和男、坪内博仁：高ウイルス量かつ HCV 群別 1 の C 型慢性肝炎に対する β -IFN 2 回分割先行リバビリン併用療法。日本消化器病学会総会（仙台）2004年4月
- 5) 永田賢治、堀剛、坂元秀壮、元田みずえ、蓮池悟、宇都浩文、林克裕、坪内博仁：小型肝癌に対する経皮的ラジオ波焼灼療法の有用性の検討。日本肝臓学会総会（浦安）2004年6月
- 6) 宇都浩文、楠元寿典、黒木稜二、坂元秀壮、元田みずえ、蓮池悟、宮田義史、永田賢治、林克裕、井戸章雄、山岸俊哉、長池一博、坪内博仁：急性肝不全における迅速な HGF 半定量測定キットの有用性の検討。日本肝臓学会（浦安）2004年6月
- 7) 蓮池悟、林克裕、永田賢治、宇都浩文、坪内博仁、加藤順也、落合俊雅、堀剛、村田光宏、黒木和男、井戸章雄：B 型肝炎ウイルス関連肝硬変に対するラミブジンの長期予後に関する検討。日本肝臓学会総会（浦安）2004年6月

- 8) 永田賢治、宇都浩文、坂元秀壮、元田みずえ、蓮池悟、熊谷公太郎、林克裕、堀剛、坪内博仁：進行肝細胞癌に対する少量5-FU CDDP 肝動注化学療法の有用性。日本肝癌研究会（筑波）2004年6月
- 9) 蓮池悟、宇都浩文、安倍弘生、中西千尋、楠元寿典、永田賢治、堀剛、林克裕、井戸章雄、坪内博仁：2-AAF投与後肝切除モデルラットにおけるHGFのoval cell増殖および分化に及ぼす影響の検討。肝細胞研究会（宇部）2004年7月
- 10) 蓮池悟、宇都浩文、安倍弘生、中西千尋、楠元寿典、山本章二郎、永田賢治、林克裕、森内昭博、井戸章雄、坪内博仁：オステオアクチビンの肝線維化・発癌に及ぼす影響の解析。肝サイトスケレトン研究会（京都）2004年7月
- 11) 宇都浩文、林克裕、楠元寿典、堀剛、駒田直人、落合俊雅、黒木和男、加藤順也、坪内博仁：C型肝炎ウイルス高侵淫地域における超音波検診の有用性。宮崎大学地域共同研究センター設立十周年記念行事技術・研究発表交流会新生宮崎大学100のシリーズ（宮崎）2004年7月
- 12) 蓮池悟、宇都浩文、安倍弘生、楠元寿典、永田賢治、井戸章雄、坪内博仁：コリン欠乏アミノ酸置換（CDAA）食飼育ラット肝から単離したosteostatin遺伝子の発現および機能解析。日本癌学会学術総会（福岡）2004年9月
- 13) 井戸章雄、蓮池悟、坪内博仁：肝再生を目的とした肝細胞増殖因子（HGF）を用いた新規治療法の開発。日本肝臓学会大会（福岡）2004年10月
- 14) Uto Hirofumi, Ido Akio, Nakanishi Chihiro, Hasuike Satoru, Kusumoto Kazunori, Abe Hiroo, Nagata Kenji, Hayashi Katsuhiko, Tsubouchi Hirohito: Analysis of a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. 3rd JSH Single Topic Conferens "Nonalcoholic Steatohepatitis in Asia-Oceania" (土佐) 2004年10月
- 15) Eto Toshiharu, Hayashi Katsuhiko, Tsubouchi Hirohito. The introduction of abdominal ultra-sonography test into student annual health examination -Examination for overweight student -3rd JSH Single Topic Conference "Nonalcoholic steato hepatitis in Asia-Oceania" (土佐) 2004年10月
- 16) 金一徳、井戸章雄、森内昭博、沼田政嗣、坪内佳子、坪内博仁、田中統一:MR volumetryを用いたミブタ肝切除後の肝再生の評価。日本肝臓学会大会（福岡）2004年10月
- 17) 坪内博仁:肝再生医療の最先端。DDW-Japan 2004 Fukuoka（福岡）2004年10月
- 18) Chihiro Nakanishi, Hirofumi Uto, Akio Ido, Akihiro Moriuchi, Satoru Hasuike, Shuuji Kannmura, jyouji Kuroki, Kazunori Kusumoto, Hiroo Abe, Shojiro Yamamoto, Katsuhiko Hayashi, Hirohito Tsubouchi. A peroxisome proliferation activated receptor γ ligand, pioglidazone, inhibits fat accumulation and fibrosis in the livers rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(Boston)2004年11月
- 19) 永田賢治、林克裕、村田光宏、黒木和男、末田光恵、中間哲文、蓮池悟、宇都浩文、坪内博仁：従来のIFN療法とIFN+リバビリン併用療法、PEG-IFN療法におけるウイルス動態と治療効果—治療早期のウイルス動態からみた慢性C型肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果の検討—。第84回日本消化器病学会九州支部例会（福岡）2004年12月
- 20) 坂元秀壮、永田賢治、黒木稔二、蓮池悟、宇都浩文、堀剛、林克裕、坪内博仁：肝癌の自然経過、各種治療後の再発と予後—小型肝癌に対する経皮的ラジオ波焼灼療法の有用性の検討—。第84回日本消化器病学会九州支部例会（福岡）2004年12月

- 21) Eto Toshiharu, Hayashi Katsuhiko, Tsubouchi Hirohito: The trial of meal instruction and movement prescription to overweight students and one year after follow up survey. 14th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (New Delhi) 2004年12月
- 22) Kazunori Kusumoto, Akio Ido, Hiroo Abe, Chihiro Nakanishi, Akihiro Moriuchi, Satoru Hasuike, Kenji Nagata, Hirofumi Uto, Katsuhiko Hayashi, Hirohito Tsubouchi. Intravenous bolus injection of recombinant human hepatocyte growth factor accelerates liver regeneration and ameliorates hepatic fibrosis in a rat model of liver cirrhosis. 14th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (New Delhi) 2004年12月
- 23) Hiroo Abe, Satoru Hasuike, Hirofumi Uto, Chihiro Nakanishi, Kazunori Kusumoto, Shojiro Yamamoto, Kenji Nagata, Katsuhiko Hayashi, Akihiro Moriuchi, Akio Ido, Hirohito Tsubouchi. Overexpression of rat osteonectin suppresses the growth of preneoplastic nodules. 14th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (New Delhi) 2004年12月
- 24) 坪内博仁: C型慢性肝炎治療の展望. 第282回日本消化器病学会関東支部例会(宇都宮) 2004年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況
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) Kanazawa N. (榎本)	Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1.	Journal of Virology	78(18)	9713-20	2004
2) Maekawa S. (榎本)	Introduction of NS5A Mutations Enables Subgenomic HCV-Replicon Derived from Chimpanzee-Infectious HC-J4 Isolate to Replicate Efficiently in Huh-7 Cells.	Journal of Viral Hepatitis	11(5)	394-403	2004
3) Nakagawa M. (榎本)	Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporine A.	Biochemical and Biophysical Research Communications	313(1)	42-7	2004
4) Tanabe Y. (榎本)	Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon-alpha.	Journal of Infectious Diseases	189(7)	1129-39	2004

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) Ueda E. (榎本)	Changes of HCV quasispecies during combination therapy with interferon and ribavirin.	Hepatology Research	29(2)	89-96	2004
6) Abe K. (加藤)	cdNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells.	Virus Research	107	73-81	2005
7) Namba K. (加藤)	Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype.	Biochemical and Biophysical Research Communications	323	299-309	2004
8) Naganuma A. (加藤)	Promotion of microsarellite instability by hepatitis C virus core protein in human non-neoplastic hepatocyte cells.	Cancer Research	64	1307-1314	2004
9) Okamoto K. (松浦)	Intramembrane proteolysis and ER retention of HCV core protein.	Journal of Virology	78	6370-6380	2004
10) Suzuki T. (松浦)	Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome.	Journal of Virology	78	10820-10824	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
11) Kaimori A. (松浦) (林)	Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin.	Virology	324	74-83	2004
12) Watanabe R. (松浦)	Comparison of serum sensitivities of pseudotype retroviruses produced from newly established packaging cell lines of human and feline origins.	Virus Research	99	89-93	2004
13) Migliaccio C.T. (松浦)	Evidence for an alternative topology of the E1 envelope glycoprotein of hepatitis C virus.	Virus Research	105	47-57	2004
14) Miyoshi H. (小池)	Methylation status of suppressor of cytokine signaling-1 gene in hepatocellular carcinoma.	Journal of Gastroenterology	39	563-569	2004
15) Shintani Y. (小池)	Hepatitis C virus and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance.	Gastroenterology	126	840-848	2004
16) Koike K. (小池)	Hepatitis C and Diabetes Mellitus: what is the metabolic pathway?	Gastroenterology	127	1280-1281	2004