

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝硬変に対する治療に関する研究

B型慢性肝炎および肝硬変のラミブジン治療成績

分担研究者 増本 陽秀 国立病院機構小倉病院 肝臓病センター部長

研究要旨 B型慢性肝炎および肝硬変例のラミブジン治療をより効果的に行うことを目的として、解析可能な29例につき検討し以下の結果を得た。ラミブジン投与を中止した5例中、post-treatment flareが発現したのは1例であった。Viral breakthroughおよびbreak-through hepatitisの累積出現率は、ラミブジン投与144週でそれぞれ53.9%、23.4%であった。HBe抗原陰性例は陽性例に比し、投与96週まではviral breakthroughの出現率が低い、144週ではHBe抗原陽性例58.0%、HBe抗原陰性例52.0%でほぼ同率となった。肝硬変例ではラミブジン投与により肝機能が改善するが、20～30%の症例で改善がみられず、これらの症例にどのように対応すべきかが今後の課題であると考えられた。

研究協力者

佐藤 丈顕	国立病院機構小倉病院
岡田 誠	国立病院機構小倉病院
真崎 由子	国立病院機構小倉病院

A. 研究目的

B型慢性肝炎および肝硬変例に対して、ラミブジン治療をより効果的に行うことを目的として、投与中止後の肝機能悪化（post-treatment flare）、長期投与時の耐性ウイルス出現によるHBV-DNAの再上昇（viral breakthrough）とそれに伴う肝機能の悪化（breakthrough hepatitis）、および肝硬変例における投与後の肝機能の変化につき検討した。

B. 研究方法

当院においてラミブジンを投与したB型

慢性肝炎および肝硬変患者34例中、投与開始後24週以内の2例、肝細胞癌の合併が経過に影響した2例、およびNASH合併の1例を除外した29例を対象とした。これらの症例において、投与中止後のpost-treatment flare発現の有無と経過、投与継続中のviral breakthroughとbreakthrough hepatitisの出現率および、肝硬変例における投与前後の肝機能の変化を検討した。HBV-DNAはアンプリコアPCR法（検出感度 2.6LC/ml）で定量し、検出感度以下の場合にHBV-DNA陰性と判定した。YMDD変異株は直接塩基配列決定法を用いて検出した。

本研究の遂行にあたっては患者のプライバシーを厳守し、患者に不利益が生じないよう細心の注意を払った。各患者にインフォームドコンセントを行ない、書面での同意を得た。

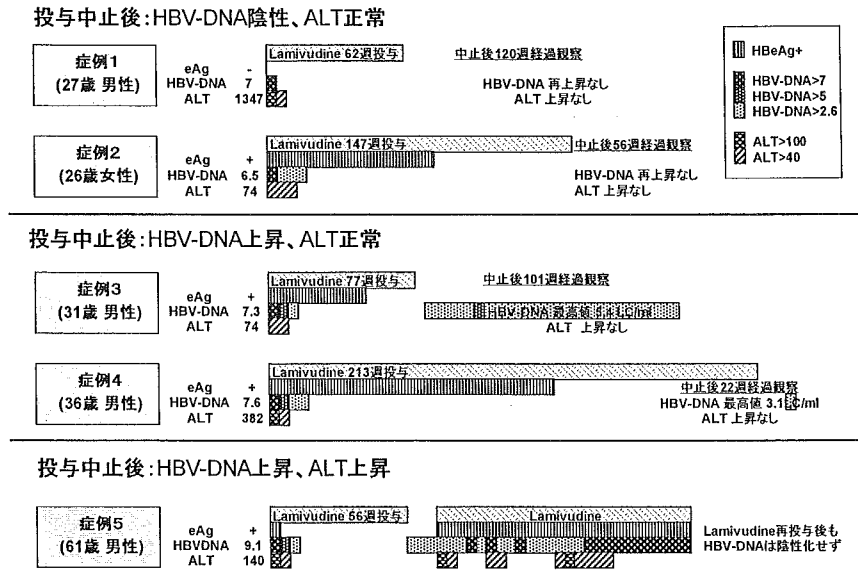


図1. ラミブジン中止例の経過

C. 研究結果

(1) 対象症例

対象とした29例は男性20例、女性9例、年齢 47.5 ± 12.8 (平均 \pm 標準偏差) 歳で、慢性肝炎21例、肝硬変8例であった。HBe抗原陽性14例、HBV-DNA 6.6 ± 1.2 LC/ml、ALT 199 ± 260 IU/Lで、ラミブジン投与開始後の経過観察期間は 133 ± 68 週であった。

(2) 投与中止例における臨床経過の解析

ラミブジン治療を中止した5症例の経過を図1に示す。いずれもHBV-DNA陰性化、HBe抗原/抗体セロコンバージョン、およびALT正常化のすべての条件が24週以上持続した後ラミブジン投与を中止した。ラミブジン投与期間は56~213週(平均111週)であった。

症例1、2はラミブジン中止後HBV-DNAの再上昇がなく、ALTも正常値が持続した。症例3は、ラミブジン中止4週後にHBV-DNAの再上昇がみられたがALTは正常範囲であった。症例4は、ラミブジン中止後一過性にHBV-DNAの再上昇がみられたがALTは正常範囲であった。症例3、4におけるラミブジン中止後のHBV-DNA量の最高値はそれぞれ5.4 LC/ml、3.1 LC/mlであった。症例5はラ

ミブジン中止2週後にHBV-DNAの再上昇がみられ、12週後にALTの再上昇をきたした。ラミブジン再投与により一旦改善傾向がみられたが、以後HBV-DNAが上昇低下を繰り返し、これに伴ってALTも変動した。

すなわちラミブジンを中止した5例中、HBV-DNAの再上昇が見られたのは3例であり、このうち1例でpost-treatment flareをきたした。

(3) 投与継続例における臨床経過の解析

ラミブジンを長期継続投与した24症例の解析の結果、viral breakthroughの累積出現率は48週で3.7%、96週で30.9%、144週で53.9%であった(図2)。またbreakthrough hepatitisの累積出現率は48週で0%、96週で10.6%、144週で23.4%であった。

さらにviral breakthroughの累積出現率をHBe抗原陽性例と陰性例で比較すると、HBe抗原陽性例では48週で7.8%、96週で44.1%、144週で58.0%であるのに対し、HBe抗原陰性例では48週で0%、96週で20.0%、144週で52.0%であった(図3)。

(4) 肝硬変例における臨床経過の解析

肝硬変の8症例において、ラミブジン投与

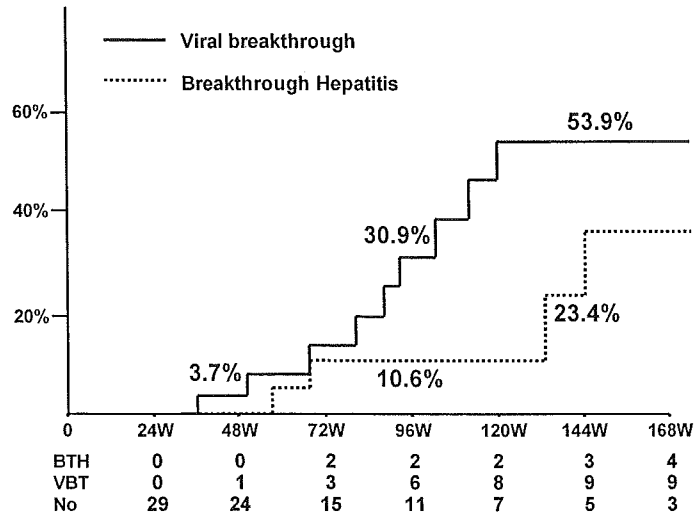


図2. Viral breakthroughおよびBreakthrough hepatitisの累積出現率

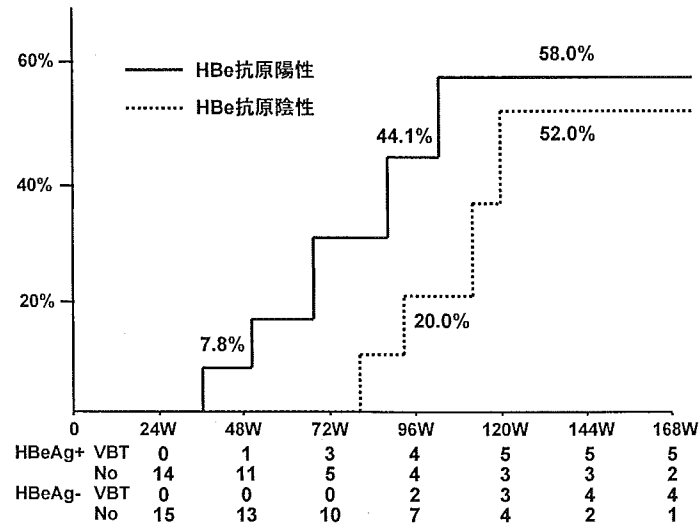


図3. HBe抗原別のViral breakthrough累積出現率

が肝機能におよぼす効果を検討するために、投与前後の血清総ビリルビン値およびアルブミン値の変化を解析した。総ビリルビン値は投与開始24週後に、投与前と比較して6例で低下し2例で上昇した(図4)。その平均値は投与開始前3.04mg/dl、投与24週後2.55mg/dlであり、平均値が0.49mg/dl低下した。アルブミン値は投与開始24週後に、投与前と比較して5例で上昇、2例で低下し、1例で不変であった(図5)。その平均値は投与開始前3.14g/dl、投与24週後3.28g/dlであり、平均値が0.14g/dl上昇した。

D. 考察

投与中止例の検討において、5例中1例(20%)でラミブジン中止後に post-treatment flare をきたし、ラミブジン再投与によりALT値は改善したが、HBV-DNAは低下せず7LC/ml以上の高値となった。一方、5例中4例(80%)はラミブジン中止後も post-treatment flare がみられなかった。これら4例のうち、2例はラミブジン中止後もHBV-DNA陰性が持続し、他の2例は中止後にHBV-DNAが陽性化したはその量は6LC/ml未満であった。我々の検討では一般

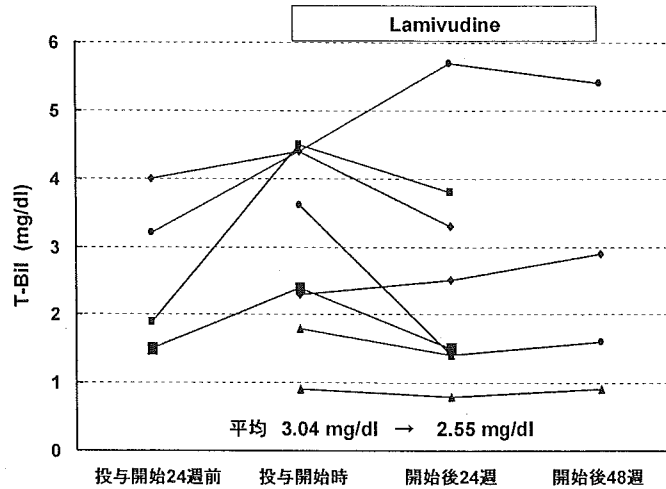


図4. 肝硬変患者の総ビリルビン値の推移

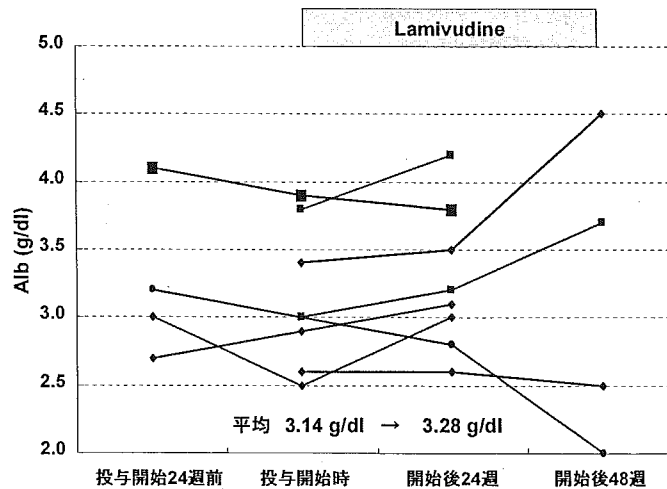


図5. 肝硬変患者のアルブミン値の推移

の報告に比しラミブジン中止後のpost-treatment flareの出現率が低く、十分なラミブジン投与期間をおき個々の症例の背景を勘案して投与を中止したことがその要因と思われる。しかし、投与中止後にpost-treatment flareをきたさない条件を明確にするには至らず、今後さらに症例を集積してこの点を明らかにする必要がある。

投与継続例の検討では、144週投与後のviral breakthrough出現率は53.9%であり、breakthrough hepatitis出現率は23.4%であった。ラミブジン耐性株に対して有効なア

デホビルの投与を、viral breakthrough出現時、またはbreakthrough hepatitis出現時のいずれの時期に開始すべきかが今後の課題である。またHBe抗原陰性例はHBe抗原陽性例に比し耐性株が出現しにくいと言われるが、144週投与時のviral breakthrough出現率がHBe抗原陽性例58.0%、HBe抗原陰性例52.0%であったことから、HBe抗原陰性例はHBe抗原陽性例と比較して耐性株の出現が遅れるが、最終的には両者ほぼ同程度の割合になることが示唆された。

肝硬変例では、ラミブジン投与後に血清総

ビリルビンの平均値が低下し、アルブミンの平均値が上昇したことから、ラミブジンが肝硬変例の肝機能を改善することが示された。しかし20～30%の症例ではこれらの指標に改善がみられず、ラミブジン投与で肝機能が改善しない肝硬変例にどのように対応するかが今後の課題である。

E. 結論

1) 今回の検討では、ラミブジン投与中止後のpost-treatment flareの発現率は20%であり、一般の報告に比し低率であった。今後症例を蓄積し、post-treatment flareをきたしにくい条件を明らかにする必要がある。

2) Viral breakthroughおよびbreakthrough hepatitisの累積出現率は、ラミブジン投与144週でそれぞれ53.9%、23.4%であった。HBe抗原陰性例は陽性例に比し、投与96週まではviral breakthroughの出現率が明らかに低いが、144週ではHBe抗原陽性例58.0%、HBe抗原陰性例52.0%であり、最終的にはほぼ同率となることが示唆された。

3) 肝硬変例ではラミブジン投与により肝機能が改善するが、20～30%の症例で改善がみられず、これらの症例にどのように対応すべきかが今後の課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

G. 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。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝硬変に対する治療に関する研究

TRAILによるIFNシグナル（抗ウイルス作用）の増強

分担研究者 中尾 一彦 長崎大学保健管理センター 助教授

研究要旨 TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) は腫瘍細胞やウイルス感染細胞特異的にアポトーシスを誘導することが知られている。近年、B型急性肝炎患者血清中のTRAILが上昇していることが報告され、TRAILは肝炎ウイルスの排除にも関わることを示唆された。よって、我々はIFNの抗ウイルス活性をTRAILが増強するのでは無いかと考え実験を行った。ヒト培養肝癌細胞株Huh-7にTRAILを16時間前処理後、IFN- α を添加すると、抗ウイルス蛋白発現とその活性がIFN- α 単独に比べ増強されることが明らかとなった。IFNのシグナル分子であるSTAT1のリン酸化もTRAIL前処理によって増強された。TRAILはIFN受容体であるAR1の発現を誘導する一方で、細胞内シグナルドメインを欠如したAR2の発現を抑制した。TRAILはシグナル伝達能力を有するAR1/AR2受容体の発現誘導を介してIFNの抗ウイルス活性を増強することが示唆された。

研究協力者

濱崎 圭輔 長崎大学医学部第一内科
市川 辰樹 長崎大学医学部第一内科

A. 研究目的

TRAILが肝細胞におけるインターフェロン(IFN)刺激伝達系へ及ぼす影響をin vitro実験系を用いて検討する。

B. 研究方法

(1) TRAIL添加によるIFN作動性遺伝子の転写活性、IFN誘導性抗ウイルス蛋白発現に対する影響

培養ヒト肝癌細胞HuH-7にIFN感受性配列(ISRE)レポータープラスミドを遺伝子導入し、TRAILを添加16時間培養後、IFN-

α で刺激し、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性に与える影響を検討した。またTRAIL前処置によるIFN- α 誘導性抗ウイルス蛋白2-OAS、PKRのmRNA発現の変化をnorthern blotting、PKR活性の変化をwestern blottingで検討した。

(2) TRAILのIFN- α 刺激伝達系に与える影響

培養ヒト肝癌細胞HuH-7をTRAILで前処置後、IFN- α によるSTAT-1のリン酸化をwestern blottingより検討した。また、TRAILがIFN-receptorであるAR1、AR2の発現に与える影響をFlowcytometer、western blottingで検討した。

(3) HBe抗原産生に与える影響

in vitro HBV複製実験系を用いて、TRAIL

で前処置後、IFN- α 処理し、HBe抗原産生量を測定した。

C. 研究結果

(1) TRAILによるIFN作動性遺伝子の転写活性、IFN誘導性抗ウイルス蛋白発現に対する影響

IFN作動性遺伝子の転写活性はIFN- α に

より誘導されるが、TRAIL (0.5、1ng/ml) 16時間前処置にて濃度依存性にその活性は増強された(図1)。抗ウイルス蛋白2-5OAS、PKR mRNAの発現もIFN- α 単独投与と比べTRAIL前処置で増強された(図2)。PKR蛋白発現量とその活性(eIF-2 α リン酸化)もTRAIL前処置で増強された(図3)。

図1.

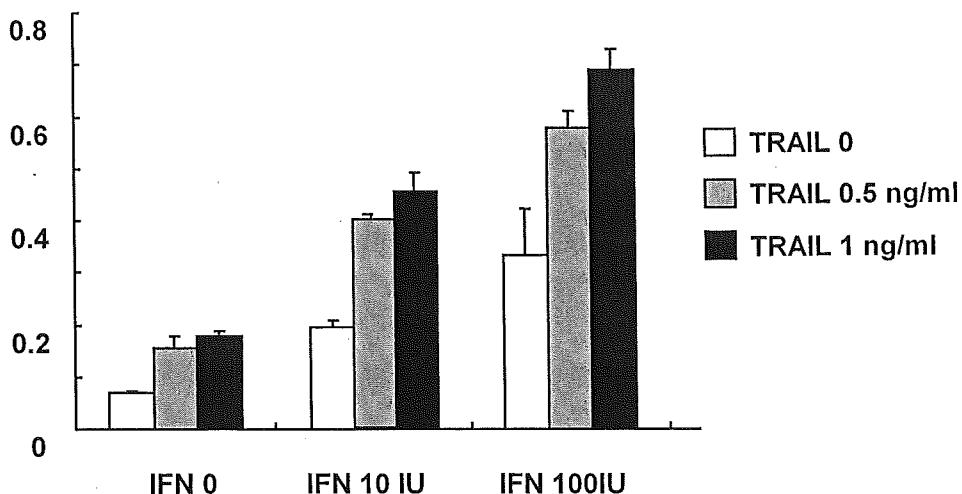


図2.

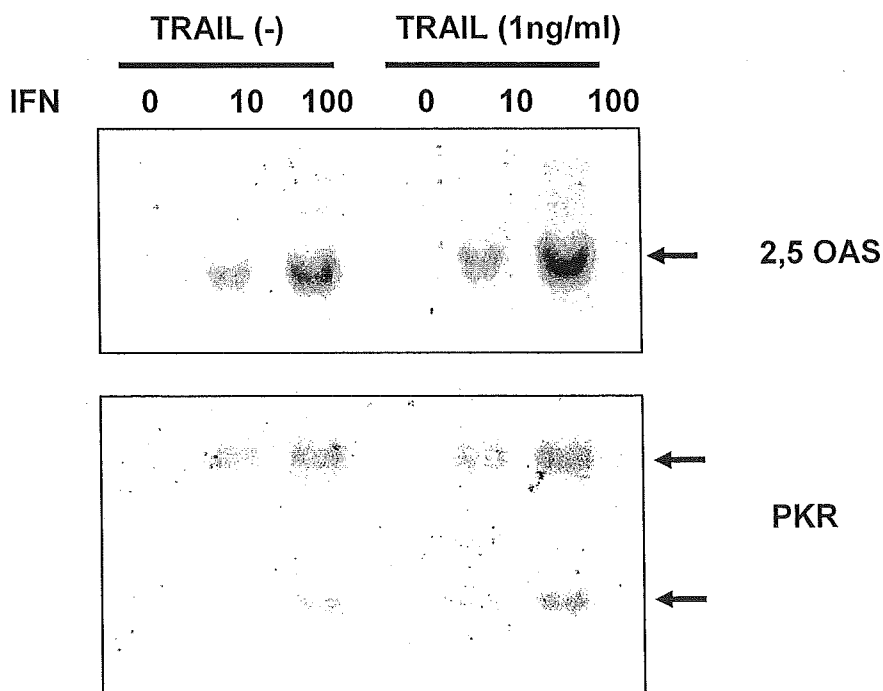
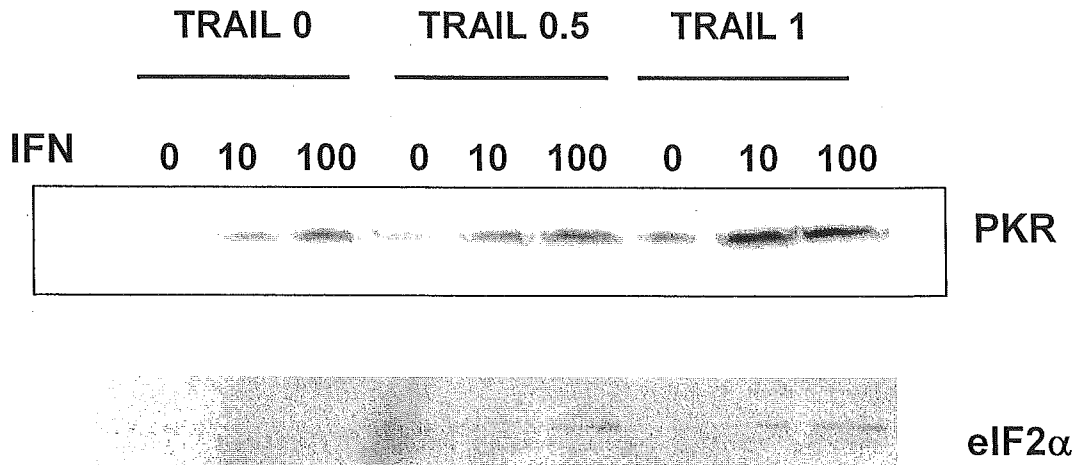


図3.



(2) TRAILのIFN- α 刺激伝達系に与える影響

HuH-7をTRAILで前処置後、IFN- α によるSTAT-1のリン酸化をwestern blottingで検討したところ、IFN- α 単独に比べSTAT-1のチロシンリン酸化はTRAIL前処置で容量依存的に増強された(図4)。Flowcytometerを用いてTRAILのIFN-receptor (AR1、AR2)の発現に与える影響を検討したところ、

TRAILはAR1の発現を増強したが、AR2の発現には影響がなかった(図5)。AR2は細胞内ドメインを欠如したスプライシングバリエントが存在することから、Western blottingによる検討を行ったところ、TRAIL処理により115Kの完全型AR2の発現は変化しないものの、55KのバリエントAR2はTRAIL処理で減少することが解った(図6)。

図4.

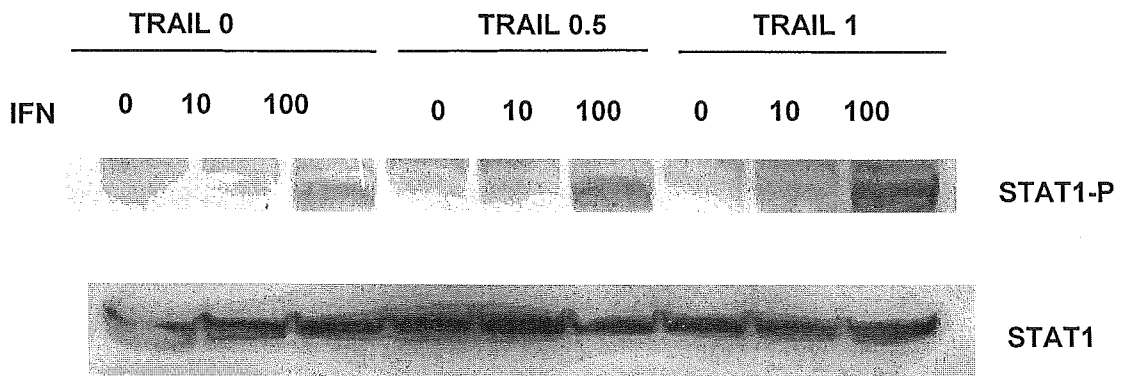


图5.

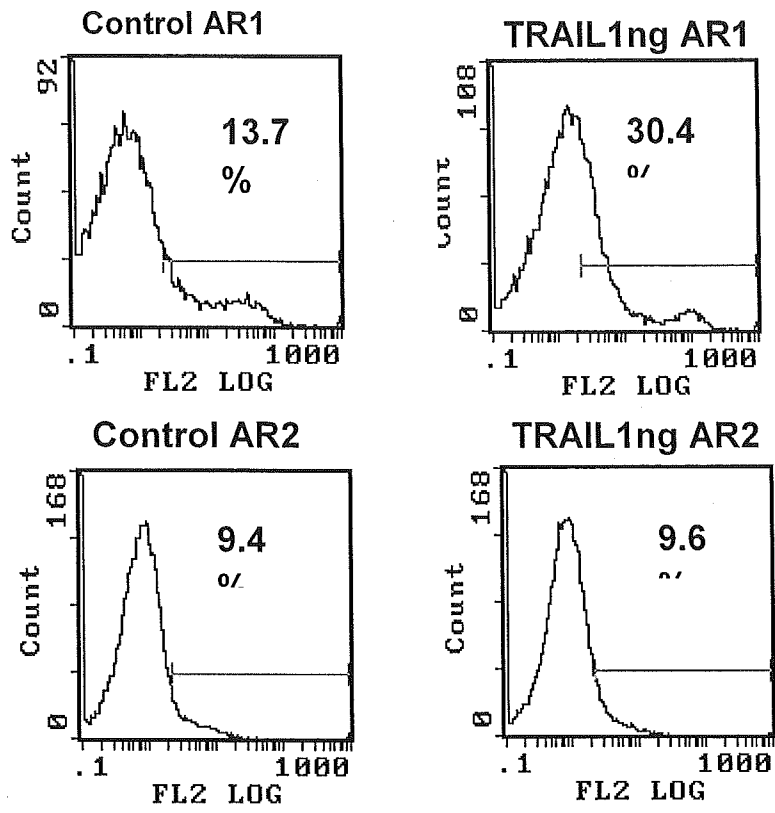
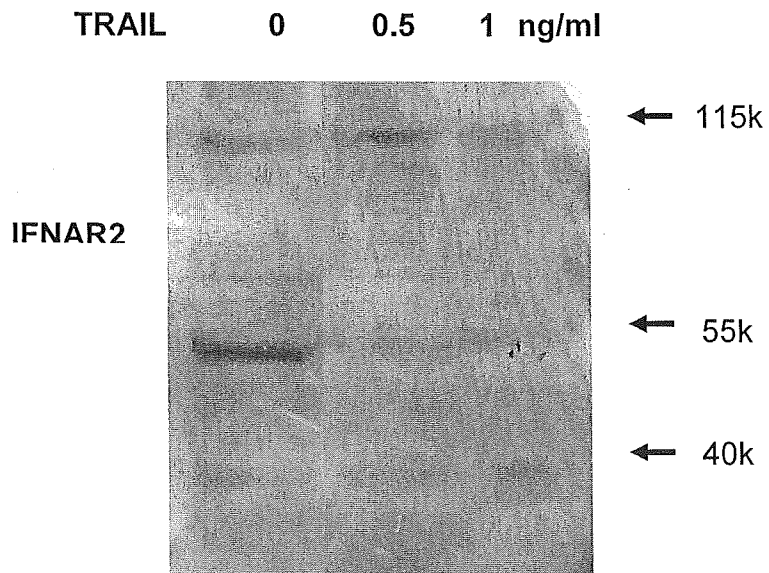


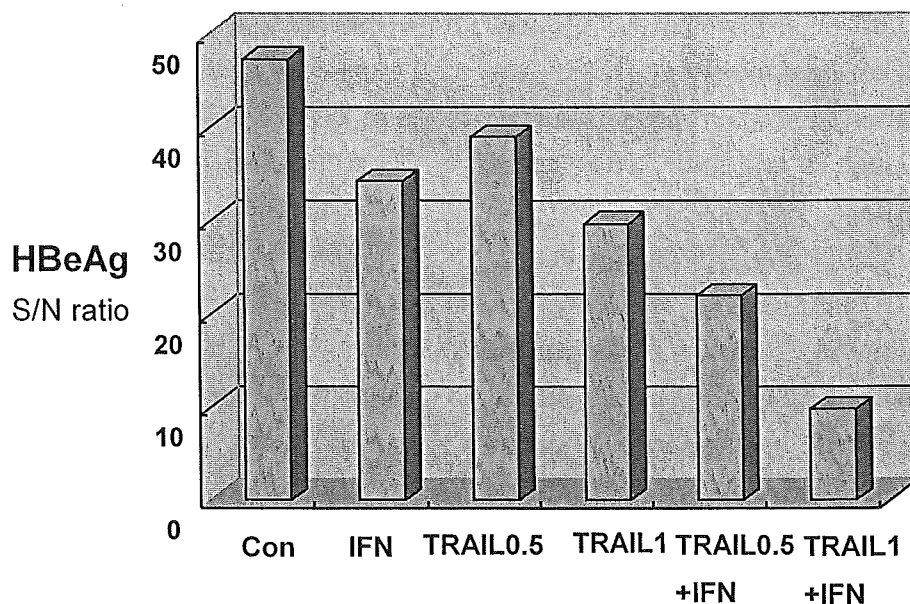
图6.



(3) HBe抗原産生に与える影響
in vitro HBV複製実験系において、TRAIL

とIFNは相乗的にHBe抗原産生を抑制した
(図7)。

図7.



D. 考察

本研究の結果、TRAILがIFN- α 刺激による細胞内JAK-STATシグナル伝達を増強し、ISRE配列を介した抗ウイルス蛋白の遺伝子発現を促進する事が示された。その結果、抗ウイルス活性が増強されることも明らかとなった。TRAILによるJAK-STATシグナル増強の機序として、IFN受容体AR1の発現増強とAR2のバリエントスプライシングの減少により、シグナル伝達能力を有するAR1/AR2受容体の増加が示唆された。

生体内においてIFNはTRAIL発現を誘導することが知られている。我々はIFN処理によって肝癌細胞がTRAIL誘導アポトーシスに対して感受性となることを報告した。これらの知見と本研究の結果を合わせると、TRAILとIFNは相互にその作用を高め合う関係にあることが示唆される。ウイルス排除に関わる生体のinnate immunityにおいてIFNとTRAILは密接な関係にあると考えられる。

今後はTRAILによるAR1の発現増強のメカニズムやAR2のスプライシング調節などを明らかにしていく予定である。また、各種肝疾患における血清中TRAILの測定とその臨床的意義についても検討を行う予定である。

E. 結論

TRAILはIFN-receptorの発現増強を介して、IFNの抗ウイルス活性を促進することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taura N, Yatsunami H, Hamasaki K, Nakao K, Daikoku M, Ueki T, Yano K, Matsumoto T, Ishibashi H, Eguchi K. Increasing hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma mortality and aging: Long term trends in Japan. *Hepatol Res.* 2006 Jan

16:34:130-4.

- 2) Taura N, Hamasaki K, Nakao K, Ichikawa T, Nishimura D, Goto T, Fukuta M, Kawashimo H, Motoyoshi Y, Shibata H, Eguchi K. Clinical benefits of hepatocellular carcinoma surveillance: a single-center, hospital-based study. *Oncol Rep.* 2005 Oct;14(4):999-1003.
 - 3) Hayashi T, Nakao K, Nagayama Y, Saitoh O, Ichikawa T, Ishikawa H, Hamasaki K, Eguchi K, Ishii N. Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic cells elicits effective antitumor immunity in murine hepatoma models. *Int J Oncol.* 2005 May;26(5):1313-9.
 - 4) Ichikawa T, Nakao K, Hamasaki K, Ohkubo K, Toriyama K, Eguchi K. An autopsy case of acute pancreatitis with a high serum IgG4 complicated by amyloidosis and rheumatoid arthritis. *World J Gastroenterol.* 2005 Apr 7;11(13):2032-4.
 - 5) Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, Yano K, Nagaoka S, Matsumoto T, Nakao K, Hamasaki K, Yatsushashi H, Ishibashi H, Eguchi K. Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection--association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2005 Apr;42(4):505-10.
2. 学会発表
- 1) 第36回日本肝臓学会西部会 市川辰樹, 中尾一彦, 濱崎圭輔, 大曲勝久, 鳥山寛, 江口勝美. 抗ミトコンドリア抗体 M2陽性で脂肪性肝炎の組織像を呈した2例
長崎大学第一内科, 長崎大学保健管理センター, 長崎大学第二内科, 長崎大学熱帯医学研究所病変発現機序分野
 - 2) 第36回日本肝臓学会西部会 田浦直太, 濱崎圭輔, 中尾一彦, 市川辰樹, 西村大介, 後藤貴史, 福田麻里子, 川下浩, 藤本真澄, 楠本浩一郎, 本吉康英, 柴田英貴, 江口勝美. 20年間における肝細胞癌の予後の推移 長崎大学第一内科, 長崎大学保健管理センター
 - 3) 第9回日本肝臓学会大会 後藤貴史, 石川博基, 松本幸二郎, 柴田英貴, 本吉康英, 川下浩, 福田麻里子, 田浦直太, 西村大介, 市川辰樹, 濱崎圭輔, 中尾一彦, 江口勝美. 肝動脈塞栓術前後の血管新生関連因子 (VEGF, Endostatin, PEDF) の動態 長崎大学第一内科, 長崎大学保健管理センター
 - 4) 第9回日本肝臓学会大会 福田麻里子, 中尾一彦, 柴田英貴, 本吉康英, 川下浩, 田浦直太, 後藤貴史, 西村大介, 市川辰樹, 濱崎圭輔, 江口勝美. 九州筑豊地区と長崎地区における HCV感染者の疫学的特徴の検討 長崎大学第一内科, 長崎大学保健管理センター
 - 5) 第9回日本肝臓学会大会・日本消化器病学会大会・日本消化器集団検診学会大会 ワークショップ (生活習慣病 (糖尿病) と肝障害) 田浦直太, 濱崎圭輔, 中尾一彦. C型肝炎ウイルス (HCV) 感染者における耐糖能異常の検討長崎大学第一内科, 長崎大学保健管理センター
 - 6) 第41回日本肝臓学会総会 右田清志, 宮副誠司, 大黒学, 阿比留正剛, 矢野公士, 長岡進矢, 松本武浩, 中村稔, 小森敦正, 中尾一彦, 濱崎圭輔, 八橋弘, 江口勝美, 石橋大海. 肝細胞癌合併B型肝炎患者におけるサイトカイン遺伝子多型の解析 国立病院長崎医療センター臨床研究センター, 国立病院佐賀医療センター消化器内科, 長崎大学第一内科

- 7) 第41回日本肝臓学会総会 田浦直太, 濱崎圭輔, 中尾一彦, 市川辰樹, 西村大介, 後藤貴史, 福田麻里子, 川下浩, 本吉康英, 柴田英貴, 江口勝美. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) における高感度 CRP (hsCRP) の測定意義長崎大学第一内科, 長崎大学保健管理センター
- 8) 第41回日本肝臓学会総会 後藤貴史, 石川博基, 松本幸二郎, 柴田英貴, 本吉康英, 川下浩, 福田麻里子, 田浦直太, 西村大介, 市川辰樹, 濱崎圭輔, 中尾一彦, 江口勝美. Tumstatinを用いた肝臓に対する血管新生抑制遺伝子治療の基礎的検討 長崎大学第一内科, 長崎大学保健管理センター
- 9) 第41回日本肝臓学会総会ワークショップ (アポトーシス) 福田麻里子, 中尾一彦, 濱崎圭輔, 市川辰樹, 西村大介, 後藤貴史, 田浦直太, 川下浩, 本吉康英, 柴田英貴, 江口勝美. STAT3活性化阻害による肝臓細胞の増殖抑制とアポトーシス誘導 長崎大学第一内科, 長崎大学保健管理センター
- 10) 第91回日本消化器病学会総会 市川辰樹, 濱崎圭輔, 中尾一彦, 藤本真澄, 柳謙二, 西村大介, 田浦直太, 後藤貴史, 福田麻里子, 川下浩, 本吉康英, 柴田英貴, 鳥山寛, 江口勝美. NAFLDにおけるグレリン, 成長ホルモン, ソマトメジンCの関与 長崎大学第一内科, 長崎大学保健管理センター, 日本赤十字社長崎原爆病院内科, 井上病院内科, 長崎大学熱帯医学研究所病変発現機序分野

G. 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

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

肝硬変に対する治療に関する研究

PEG-IFN- α 2bの肝癌細胞の増殖抑制に関する研究

分担研究者 矢野 博久 久留米大学医学部病理学 助教授

研究要旨 今回、PEG-interferon (IFN) - α 2bの肝癌細胞の増殖に対する作用を*in vitro*及び*in vivo*で検討した。13株の肝癌細胞株をPEG-IFN- α 2b (4~4,096IU/ml) 添加培地で24~96時間培養し、生細胞数を測定した結果、9株において種々の程度に濃度及び時間依存性に細胞増殖が抑制された。nude mouseの皮下に肝癌細胞株HAK-1Bを接種し、腫瘤形成後に、4種類の量のPEG-IFN- α 2b、2種類の量のIFN- α 2b、あるいは培養液 (control) を週2回皮下接種し、2日毎に推定体積を測定し15日目にsacrificeし、切除腫瘍の重量測定と組織学的検討を行った。PEG-IFN- α 2bの最低量は、C型慢性肝炎の臨床投与量のほぼ1/3に相当する。その結果、PEG-IFN- α 2bおよびIFN- α 2bは、ほぼ濃度依存性に腫瘍体積及び腫瘍重量の増加を抑制した。増殖抑制機序として、腫瘍細胞のアポトーシス誘導が確認されたが、血管新生に関しては作用は認めなかった。*in vivo*におけるIFN- α 2bの抗腫瘍効果はPEG化により明らかに増加した。臨床投与量のPEG-IFN- α 2bの投与により、腫瘍の増殖が抑制された結果からPEG-IFN- α 2bの肝癌の発生や再発予防に対する有用性が示唆された。

A. 研究目的

近年、IFNの肝発癌抑制・肝癌再発予防効果などが注目されている。PEG-interferon (IFN) - α 2bは、IFN- α 2bの遊離アミノ基に12kDaの短鎖メトキシポリエチレングリコール (PEG) を1:1でウレタン結合させたIFNである。PEG化により吸収および排泄が遅延し、そのため血中半減期が従来型のIFNに比べ著明に延長する。PEG化IFNのC型慢性肝炎治療における有用性の報告はあるが、肝細胞癌に対する作用に関する検討はない。今回、PEG-IFN- α 2bの肝癌細胞の増殖に対する作用を*in vitro*及び*in vivo*で検討した。

B. 研究方法

①*in vitro*の実験には、我々の施設で独自に樹立した13種類のヒト肝癌細胞株（11種類の肝細胞癌細胞株と2種類の混合型肝細胞癌細胞株）を使用した。PEG-IFN- α 2b [PEG Intron[®]]を16~4,096IU/mlの濃度に調整し、24時間から96時間癌細胞株と接触させ生細胞数をMTT assay法を使用し測定した。また、細胞をLab-Teck tissue culture chamber slideに接種し、種々の濃度のPEG-IFN- α 2bと72時間接触させ、カルノア液で固定しHE染色を施行後に癌細胞の形態的变化を観察した。②nude mouseの皮下に肝癌細胞株 (HAK-1B) を接種し、10mm前後の腫瘤形成後、PEG-IFN- α 2b (640、6,400、64,000、

640,000IU/mouse)、IFN- α 2b (6,400、64,000IU/mouse)あるいは培養液(control)を週2回皮下接種し、2日毎に推定体積を測定し15日目にsacrificeした。切除腫瘍の重量測定と組織学的検討を行った。640IU/mouse (3.2×10^4 IU/kg)は、C型慢性肝炎の臨床投与量のほぼ1/3に相当する。

C. 研究結果

①16~4,096IU/mlの濃度のPEG-IFN- α 2bに、24~96時間接触させた結果、10株で時間依存性の増殖抑制効果が認められ、9株で濃度依存性の増殖抑制効果が認められた。4,096IU/mlの濃度のPEG-IFN- α 2bと96時間接触させた際に非接触群(コントロール)と比較し細胞数が50%以下に低下したのは、4株であった。これらの株の50%増殖抑制濃度は、832IU/ml~3,396IU/mlであった。種々の濃度のPEG-IFN- α 2bと72時間接触させた際に、10株で形態的にアポトーシスの誘導が確認された。②PEG-IFN- α 2bのマウスへの投与により腫瘍体積が徐々に減少し、14日目では640、6,400、64,000、640,000IU/mouseのPEG-IFN- α 2b、6,400、64,000IU/mouseのIFN- α 2b投与でcontrol値のそれぞれ約42%、39%、3%、0%(消失)、46%、46%となった。腫瘍重量は、それぞれ54%、41%、4%、0%、60%、51%となった。PEG-IFN- α 2b投与により腫瘍内のアポトーシス細胞が濃度依存性に増加したが、腫瘍血管数には、差を認めなかった。

D. 考察

PEG-IFN- α 2bは、*in vitro*で、10株において時間依存性に増殖を抑制し、9株で濃度依存性に増殖を抑制した。96時間4,096IU/mlの濃度で培養すると2株において生細胞数がコントロールに比べ50%以下となった。これまで検討を行った天然型IFN- α (OIF)やコンセンサスIFN- α (advaferon)では、1000IU/mlの濃度で96時間培養すると、

生細胞数が、コントロールに比べ、それぞれ5株と7株で50%以下に低下した。これらの結果から、PEG-IFN- α 2bの増殖抑制作用は、これまで検討したIFN- α 製剤に比べ弱い事が示唆される。一方、*in vivo*においては臨床使用量のPEG-IFN- α 2bを週2回投与した際に見られた抗腫瘍効果は、コンセンサスIFN- α の臨床使用量を連日同じ期間投与した際の抗腫瘍効果と同等かそれ以上であり、PEG-IFN- α 2bの*in vivo*における高い抗腫瘍効果が示された。PEG化されていないIFN- α 2bの抗腫瘍効果は、PEG化されたものに比べ低くPEG化により明らかに抗腫瘍効果の増加が見られた。臨床投与量レベルのPEG-IFN- α 2bの投与により、腫瘍の増殖が抑制された結果からPEG-IFN- α 2bの肝癌の発生や再発予防に対する有用性が示唆された。

E. 結論

C型慢性肝炎や肝硬変患者に対するPEG-IFN- α 2bの投与は、肝癌の発生や再発予防に有用であ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

- 1) 矢野博久, 神代正道: IFN投与が肝発癌・再発を直接的に抑制する可能性の実験的検討—PEG-IFN α 2bのヒト肝癌細胞の増殖抑制. 第41回日本肝癌研究会 ワークショップ3: 肝癌発生の Primary & Secondary Prevention. 2005年6月3日. 千葉.

G. 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。

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

肝硬変に対する治療に関する研究

平成17年度

総括研究報告書

分担研究報告書

(2/2)

論 文 集

主任研究者

八 橋 弘

平成 18(2006)年 3 月

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	発表誌名	巻号	ページ	出版年
八橋 弘	インターフェロンの治療効果予測 - SNPとデータマイニングを用いた解析	肝臓	46(10)	599-603	2005
福田実可, 八橋 弘, 矢野公士, 大黒 学, 石橋大海, 竹崎英一, 脇岡泰三, 酒井浩徳, 室 豊吉, 正木尚彦, 小松達司, 森本日出雄, 竿代丈夫, 増本陽秀, 袖山 健, 島田昌明, 山東剛裕, 渡部幸夫, 千田信之, 大原行雄, 山下晴弘, 原田英治	高感度HCV-Core抗原定量試験の基礎的検討と臨床的有用性	医学と薬学	54(5)	677-682	2005
Taura N, <u>Yatsubashi H</u> , Hamasaki K, <u>Nakao K</u> , Daikoku M, Ueki T, Yano K, Matsumoto T, Ishibashi H, Eguchi K	Increasing hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma mortality and aging: Long term trends in Japan.	Hepatol Res.	34	130-134	2006
Tanaka E, Matsumoto A, Suzuki F, Kobayashi M, Mizokami M, Tanaka Y, Okanoue T, Minami M, Chayama K, Imamura M, <u>Yatsubashi H</u> , Nagaoka S, Yotsuyanagi H, Kawata S, Kimura T, Maki N, Iino S, Kiyosawa K, HBV Core-Related Antigen Study Group	Measurement of hepatitis B virus core-related antigen is valuable for identifying patients who are at low risk of lamivudine resistance.	Liver International.	26	90-96	2006
Tien LT, Ito M, Nakao M, Niino D, Serik M, Nakashima M, Wen CY, <u>Yatsubashi H</u> , Ishibashi H.	Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma.	World J Gastroenterol.	11(16)	2398-2401	2005
Michitaka K, Horiike N, Chen Y, <u>Yatsubashi H</u> , Yano M, Kojima N, Ohkubo K, Tanaka Y, Yamamoto K, Ohno N, Onji M.	Infectious source factors affecting the severity of sexually transmitted acute hepatitis due to hepatitis B virus genotype C.	Intervirolgy.	48(2-3)	112-119	2005
Ikeda M, Fujiyama S, Tanaka M, Sata M, Ide T, <u>Yatsubashi H</u> , Watanabe H.	Risk factors for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C after sustained response to interferon.	J Gastroenterol.	40(2)	148-156	2005
Jutavijittum P, Jiviriyawat Y, Yousukh A, <u>Hayashi S</u> , Toriyama K.	Evaluation of a hepatitis B vaccination program in Chiang Mai, Thailand.	Southeast Asian J Trop Med Public Health.	36(1)	207-212	2005

Nakamuta M, Kotoh K, Tanabe Y, Kajiwarra E, Shimono J, Masumoto A, Maruyama T, Furusho N, Nomura H, <u>Sakai H</u> , Takahashi K, Azuma K, Shimoda S, Enjoji M, Hayashi J.	Body surface area is an independent factor contributing to the effects of lamivudine treatment.	Hepatol. Res.	31	13-17	2005
Kotoh K, Nakamuta M, Fukushima M, Matsuzaki C, Enjoji M, <u>Sakai H</u> , Nawata H.	High relative fat-free mass is important for maintaining serum albumin levels in patients with compensated liver cirrhosis.	World J Gastroenterol.	11	1356-1360	2005
Kotoh K, Nakamuta M, Morizono S, Kohjima M, Arimura E, Fukushima M, Enjoji M, <u>Sakai H</u> , Nawata H.	A multi-step, incremental expansion method for radio frequency ablation: optimization of the procedure to prevent increases in intra-tumor pressure and to reduce the ablation time.	Liver Int.	25	542-547	2005
Takeshita M, <u>Sakai H</u> , Okamura S, Oshiro Y, Higaki K, Nakashima O, Uike N, Yamamoto I, Kinjo M, Matsubara F.	Splenic large B-cell lymphoma in patients with hepatitis C virus infection.	Human Pathology.	36	878-885	2005
加藤道夫	アデホビル	臨牀消化器内科	20	613-616	2005
加藤道夫	B型慢性肝炎治療の最前線 インターフェロン療法	総合臨牀	54(3)	541-547	2005
Yuki N, Matsumoto S, Tadokoro K, Mochizuki K, <u>Kato M</u> , Yamaguchi T	Significance of liver negative-strand HCV RNA quantitation in chronic hepatitis C.	J Hepatol.	44	302-309	2006
加藤道夫	B型慢性肝炎の病態をどう把握し、治療方針を立てるか？	Medical Practice	23(1)	51-55	2006
Kamitsukasa H, <u>Harada H</u> , Tanaka H, Yagura M, Tokita H, Ohbayashi A	Late liver-related mortality from complications of trans fusion-acquired hepatitis C.	Hepatology.	41(4)	819-825	2005
Tokita H, Fukui H, Tanaka A, Kamitsukasa H, Yagura M, <u>Harada H</u> , Okamoto H.	Risk factors for the development of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis C who achieved a sustained virological response to interferon therapy.	J of Gastroenterol Hepatol.	20	752-758	2005
Yagura M, Tanaka A, Tokita H, Kamitsukasa H, <u>Harada H</u> .	Factors regarding increase of platelet counts in chronic hepatitis C patients with sustained virological response to interferon – Relation to serum thrombopoietin levels.	Hepatol Res.	33	211-215	2005

前出幸子, 森下慶一, 岩村国博, 高山敬子, 塚田百合子, 岸野真衣子, 清水健, 松島昭三, <u>小松達司</u> , 笠木陽子	ペグインターフェロン α 2a導入後早期にBasedow病を発症したC型慢性肝炎の1例	日内会誌	94 (12)	2600-2602	2005
Sawada K, <u>Masaki N</u> , Hayashi S, Zeniya M, Ishikawa T, Takahashi H, Ohnishi K, Fukunaga K, Hara N, Yamamoto T, Hada T, Toda G	Immunomodulatory effects of selective leucocytapheresis as a new adjunct to interferon-alpha2b plus ribavirin combination therapy: a prospective study in patients with high plasma HCV viraemia.	J Viral Hepatitis.	12(3)	274-282	2005
Nakajima A, Usui M, Huy TT, Hlaing NK, <u>Masaki N</u> , Sata T, Abe K.	Full-length sequence of Hepatitis B virus belonging to genotype H identified in a Japanese patient with chronic hepatitis.	Jpn J Infect Dis.	58	244-246	2005
Taura N, Hamasaki K, <u>Nakao K</u> , Ichikawa T, Nishimura D, Goto T, Fukuta M, Kawashimo H, Motoyoshi Y, Shibata H, Eguchi K.	Clinical benefits of hepatocellular carcinoma surveillance: a single-center, hospital-based study.	Oncol Rep.	14	999-1003	2005
Hayashi T, <u>Nakao K</u> , Nagayama Y, Saitoh O, Ichikawa T, Ishikawa H, Hamasaki K, Eguchi K, Ishii N.	Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic cells elicits effective antitumor immunity in murine hepatoma models.	Int J Oncol.	26	1313-1319	2005
Ichikawa T, <u>Nakao K</u> , Hamasaki K, Ohkubo K, Toriyama K, Eguchi K.	An autopsy case of acute pancreatitis with a high serum IgG4 complicated by amyloidosis and rheumatoid arthritis.	World J Gastroenterol.	11	2032-2034	2005
Migita K, Miyazoe S, Maeda Y, Daikoku M, Abiru S, Ueki T, Yano K, Nagaoka S, Matsumoto T, <u>Nakao K</u> , Hamasaki K, <u>Yatsubashi H</u> , Ishibashi H, Eguchi K.	Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection - association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma.	J Hepatol.	42	505-510	2005
Arima Y, Matsueda S, <u>Yano H</u> , Harada M, Itoh K.	Parathyroid hormone-related protein as a common target molecule in specific immunotherapy for a wide variety of tumor types.	Int J Oncol.	27(4)	981-988	2005
Ogasawara S, <u>Yano H</u> , Momosaki S, Nishida N, Takemoto Y, Kojiro S, Kojiro M.	Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in cultured hepatocellular carcinoma (HCC) cells and surgically resected HCC tissues.	Oncol Rep.	13(6)	1043-1048	2005
<u>Yano H</u> , Ogasawara S, Momosaki S, Akiba J, Nishida N, Kojiro S, Ishizaki H, Kojiro M.	Expression and activation of apoptosis-related molecules involved in interferon- α -mediated apoptosis in human liver cancer cells.	Int J Oncol.	26(6)	1645-1652	2005

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
伊与田賢也, 結城暢一, 山本佳司, 加藤道夫	消化器3 ウイルス性肝炎 急性肝炎の診断と治療(各論): (2) B型急性肝炎とB型慢性肝炎急性増悪		最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 27	最新医学社		2005	80-87

4. インターフェロンの治療効果予測—

SNP とデータマイニングを用いた解析

八橋 弘

1. データマイニングとは？

マイニング(mining)の意味を辞書で調べてみると「採掘」と記載されている。データマイニング(Data mining : Dm)とは、過去のデータを分析し、その中から有効な規則性を発見して重要な意思決定支援を促進する先進的情報解析システムで、金融ビジネス流通分野において広く導入されている手法である。従来の統計解析手法は限られたサンプル数を用いて仮説を検証する方法で、網羅性、迅速性において難点があるも、Dmでは膨大なデータから網羅的に高速探索し精緻な解析が可能である。ランダムマイズを行わなくとも迅速に知識を発見することが可能なことから、米国 NIH では既に Dm による医療医学情報の解析が導入されているという。

Dm の歴史は、1980 年代末から IBM アルデマン基礎研究所の Dr.ラティシュ・アグルワルが開発した相関関係分析アルゴリズムに始まり、データマイニングという造語も最初に彼が唱えたと言われている。1990 年代後半にデータマイニング・ソフトウェアが流通し始めたころから、Dm は金融、流通業界に浸透し始め、本解析手法が未来予測に有用であることが広く知られるようになった。一方、医学領域では、その有用性、存在自体ともにほとんど知られておらず、Pub Med で検索しても医学領域での Dm の論文は解析理論にとどまり、具体的な成果を報告した論文はほとんど見られない。

Dm を理解する上で重要なポイントは、統計解析との違いを明確に理解することである。統計解析と Dm の相違点を表 1 に示す。統計解析では限られたサンプルの中から仮説を検証する解析手法で、解析前に前提となる仮説をあらかじめ設ける必要があるのに対し、Dm では仮説を必要としない。Dm は膨大なデータから網羅的に高速探索し、精緻に解析して仮説を発見するという仮説発見型の解析手法で、両者の根本的な概念は全く異なる。

例えばパンを買うお客さんは牛乳を買うかという仮説を立てて、それが正しいかどうかというのを検証するのが統計解析であるのに対し、Dm では、スーパーマーケットで顧客の購買ルートを発見せよとコンピュータ解析を命じると、ワサビを買う方の 85% は刺身を買う。ビールを買う方の 55% はスルメを買う。パンを買う方の 40% は牛乳を買う。スルメを買う方の 20% はビールを買う。このように、いわゆる全ての購入のデータからコンピュータが計算して購買パターンのルールを網羅的に発見していく。またアメリカの某スーパーマーケットでの(金曜日に紙おむつを買う顧客はビールを買う)という Dm によって発見された購買パターン法則は有名な話として知られている。スーパーマーケットの陳列ではシャンプーとリンスは、ほぼ同じ場所に配置され、その 2 つを同時に買うという購買パターンは、一般的に理解しやすい話であるが、紙おむつを買う顧客の約 10% はビールを買うという法則が Dm によって発見された。1 歳ぐらいの子どもがいる共働きの 30 歳代の若い夫婦は、金曜日の夕方、1 週間分のまとめ買いをする。そして、この顧客層の特徴は、紙おむつを買ってビールを同時に購入することが多い、という分析結果である。そこで紙おむつとビールという質の異なるものを横に並べて配置すると、売り上げが数倍アップしたというエピソードである。Dm は、実生活、金融、流通の領域では既に浸透し、何か新しい事実を見つけ出すという観点からは仮説を必要とせず、網羅的で、情報過多の現在社会に合致した新たな情報解析手法である。

2. Dm による C 型慢性肝炎 IFN 治療効果予測

C 型慢性肝炎成人患者では自然にウイルスが排除されることはなく、日本の C 型慢性肝炎患者の約 30% は長期的には肝硬変、肝臓に進展すると推定されている。C 型慢性肝炎の根本的治療法はインターフェロン(IFN)であり、従来型の IFN 治療では約 30% の治癒率、週 1 回のペグ IFN とリバビリンの併用で 50% 以上の治癒率が現在では期待されるようになった。一方、わが国で、