

に比し、Hep3B 肝癌細胞に対して NKG2D 依存性の傷害活性が減弱していた。

最後に sMICA が NK 細胞による肝癌細胞の細胞傷害活性のみならず、樹状細胞の成熟にも影響を与えるかどうかを検討した。単球由来樹状細胞は CD86 が低発現であり未成熟な表現型を示した。健常者の NK 細胞を MICA 陽性血清あるいは陰性血清で 48 時間処理し、その NK 細胞と Hep3B を 24 時間混合培養した培養上清で未成熟な樹状細胞を 24 時間刺激したときの CD86 の発現レベルを検討した。MICA 陰性血清で処理した NK の場合は Hep3B と混合培養後に樹状細胞を成熟させたが、MICA 陽性血清で刺激した NK の場合はこの成熟活性が減弱していた。

#### D. 考察と結論

樹状細胞は T 細胞の活性化とその方向性に関与するが、そのためには樹状細胞が成熟・活性化することが必要である。病原体の感染の際には、樹状細胞は病原体特有の分子構造を Toll 様レセプターが認識することにより成熟する。一方、腫瘍発生の際には、NK 細胞が細胞の異常を altered-self あるいは missing-self として認識して活性化され、腫瘍細胞に対する直接的な抵抗性に関与するとともに、NK 細胞の活性化が液性因子などを介して樹状細胞の成熟に影響を与える。肝癌では NKG2D リガンドの発現により NK 細胞が活性化されるが、進展した腫瘍では sMICA が分泌されることにより NKG2D の発現低下が起こり、これにより NK 細胞による抵抗性が減弱するとともに、獲得免疫応答の形成も負に制御される可能性があると考えられる。

#### E. 研究発表

##### 論文発表

1. 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* 48: 77-83, 2005.
2. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Sakamori R, Yamaguchi S, Hayashi N. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 43: 1013-1020, 2005.
3. Takehara T, Suzuki T, Ohkawa K, Housui A, Jinushi M, Miyagi T, Tatsumi T, Kanazawa Y, Hayashi N. Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B virus replication. *J Hepatol* 44: 267-274, 2006.
4. Sakakibara M, Kanto T, Inoue M, Kaimori A, Yakushijin T, Miyatake H, Itose I, Miyazaki M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Quick generation of fully mature dendritic cells from monocytes with OK432, low-dose prostanoid and interferon- $\alpha$  as potent immune enhancers. *J Immunother* 29: 67-77, 2006.
5. Takehara T, Hayashi N. Natural killer

cells in hepatitis C virus infection: from innate immunity to adaptive immunity. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3: S78-S81, 2005.

6. Hayashi N, Takehara T. Anti-viral therapy for chronic hepatitis C: past, present, and future. *J Gastroenterol* (in press)
7. Yakushijin T, Kanto T, Inoue M, Oze T, Miyazaki M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced expression and functional impairment of Toll-like receptor 2 on dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology Res* (in press)

#### 学会発表

1. Tetsuo Takehara, Norio Hayashi. Innate Immune System in Hepatitis C Virus Infection. (Invited Lecture) "Hepatitis C: Clinic-Basic Interface" Second Joint Meeting of the Japanese Society of Gastroenterology and the American Gastroenterological Association Apr 16-17, 2005 Tokyo International Forum, Tokyo, Japan
2. Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Yakushijin T, Sakakibara M, Itose I, Miyazaki M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. The altered ability of dendritic cells to polarize helper T cells in hepatitis C virus-infected patients with persistently normal ALT levels: implications for the mechanisms of asymptomatic state of infection. (Oral; #125) The American Association for the Study of Liver Diseases (56th Annual Meeting) Nov 12~Nov 15, 2005; San Francisco (USA)
3. Yakushijin T, Kanto T, Inoue M, Miyazaki M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced expression and functional impairment of Toll-like receptor 2 on dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection. (Oral; #126) The American Association for the Study of Liver Diseases (56th Annual Meeting) Nov 12~Nov 15, 2005; San Francisco (USA)
4. Inoue M, Kanto T, Miyatake H, Itose I, Miyazaki M, Yakushijin T, Sakakibara M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Th2 bias of peripheral invariant natural killer T cells in chronic hepatitis C virus infection: implication for the role in HCV persistence. (Poster; #904) The American Association for the Study of Liver Diseases (56th Annual Meeting) Nov 12~Nov 15, 2005; San Francisco (USA)
5. Miyatake H, Kanto T, Inoue M, Sakakibara M, Yakushijin T, Itose I, Miyazaki M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. The combination of

- interferon-alpha and ribavirin restores the ability of dendritic cells to induce T helper type 1 response in chronic hepatitis C virus infection. (Poster; #924) The American Association for the Study of Liver Diseases (56th Annual Meeting) Nov 12~Nov 15, 2005; San Francisco (USA)
6. Sakamori R, Takehara T, Ohnishi C, Hosui A, Tatsumi T, Kanazawa Y, Ohkawa K, Hayashi N. Stat3 regulates hepatocyte proliferation after carbon tetrachloride-induced acute liver injury. (Poster; #1141) The American Association for the Study of Liver Diseases (56th Annual Meeting) Nov 12~Nov 15, 2005; San Francisco (USA)
7. Itose I, kanto T, Inoue M, Yakushijin T, Sakakibara M, Miyatake H, Miyazaki M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Dynamics of plasmacytoid dendritic cell and type2 helper T cell frequency predicts virological relapse in chronic hepatitis C patients underwent 48 weeks pegylated interferon<sup>alpha</sup> and ribavirin therapy. (Poster; #1274) The American Association for the Study of Liver Diseases (56th Annual Meeting) Nov 12~Nov 15, 2005; San Francisco (USA)
8. Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, Jinushi M, Miyagi T, Tatsumi T, Kanazawa Y, Hayashi N. IFN $\gamma$  is critically required for humoral immune response to HBV antigens but not for cytotoxic T cell responses. (Poster; #1307) The American Association for the Study of Liver Diseases (56th Annual Meeting) Nov 12~Nov 15, 2005; San Francisco (USA)
9. Kanazawa Y, Takehara T, Miyoshi E, Suzuki T, Hosui A, Ohkawa K, Sakamori R, Yamaguchi S, Tatsumi T, Taniguchi N, Hayashi N. Role of anti-apoptotic gene bcl-2 in hepatocytic transdifferentiation process of pancreatic cells. (Poster; #1392) The American Association for the Study of Liver Diseases (56th Annual Meeting) Nov 12~Nov 15, 2005; San Francisco (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

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

肝炎ウイルスによる肝炎・肝硬変および肝がんの病態解明に関する研究  
（分担） 研究者 金子 周一 金沢大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 B型肝炎ウイルス(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)による慢性肝炎肝組織を対象にレーザーマイクロダイセクション法を用いて浸潤リンパ球および肝細胞を選択的に採取し、それぞれにおける発現遺伝子プロファイルを包括的に解析した。浸潤リンパ球および肝細胞における発現遺伝子は両肝炎において異なっていた。詳細な遺伝子およびパスウェイ解析を行うことにより両肝炎の病態の相違を明確に解析することが出来た。この情報を用いた診断および治療法の解析が期待される。

#### A. 研究目的

HBV および HCV の持続感染によって慢性肝炎が引き起こされる。両慢性肝炎とも同様の臨床所見を示し、病理学的にも良く似ている。しかし我々は肝臓における発現遺伝子プロファイルの解析から両肝炎の病態が大きく異なることを示した (Gastroenterology 2001)。HBV および HCV とともに直接の細胞障害性は認めずウイルス性慢性肝炎による肝細胞の破壊は感染肝細胞に対する免疫系が細胞障害の主体であると考えられている。本研究ではウイルス感染肝細胞に対する浸潤リンパ球の反応と、それに対する肝細胞の反応を、包括的な発現遺伝子のレベルからヒト材料を用いて解析した。これによって両肝炎における病態の解析を行い、診断および治療法の標的となる遺伝子あるいはパスウェイを同定することを目的とする。

#### B. 研究方法

19 例の HBs 抗原陽性および 18 例の HCV 抗体陽性慢性肝炎肝組織を対象とした。16 例に対してはレーザーマイクロダイセクション下に浸潤リンパ球および肝細胞を選択的に採取した。サンプルから 2 度の RNA 増幅を行い、約 1 万の遺伝子を搭載した自家製の肝臓解析用 DNA チップ解析に使用した。得られた結果を各種バイオインフォマティクス解析し、遺伝子およびパスウェイの抽出を行った。科学技術会議生命倫理委員会「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、研究を行った。

#### C. 研究結果

我々の既報と同様に異なる DNA チップを用いた今回の解析においても hierarchical clustering において HBs 抗原陽性と HCV 抗体陽性が慢性肝炎の発現遺伝子プロファイルを分類する唯一の有意な判別因子となった

( $p < 0.001$ ).

浸潤リンパ球と肝細胞における発現遺伝子プロファイルは1例の違いなく両者に判別された。HBs 抗原陽性およびHCV 抗体陽性サンプルにおける発現遺伝子プロファイルの変動は浸潤リンパ球および肝細胞の応答により規定されていると考えられた。HBs 抗原陽性慢性肝炎では Granzyme A, MHC class I などの発現が強く、chemotaxis に関わる遺伝子群の中では両肝炎において異なる chemokine が発現していた。HBs 抗原陽性慢性肝炎の肝細胞では FK506 binding protein, p53 などの発現が高く、HCV 抗体陽性例では mitochondria 関連、インターフェロン誘導遺伝子の発現が高かった。

パスウェイ解析ではHBs 抗原陽性慢性肝炎では細胞死や DNA repair, peroxisome の遺伝子が有意に変動するのに比して、HCV 抗体陽性の慢性肝炎ではインターフェロンによって誘導される遺伝子および抗原表出にかかわる遺伝子、コレステロール生合成にかかわる遺伝子が有意に変動していた。

転写因子のパスウェイ解析ではHBs 抗原陽性慢性肝炎において SMAD3, AP-1, p53 といった系が変動し、HCV 抗体陽性慢性肝炎では NF- $\kappa$ B, IRF-1, STAT-1 の系が有意に変動していた。

#### D. 考察

HBV および HCV は肝細胞に持続感染するもののウイルス学的に大きく異なるウイルスである。今回の解析によ

り、ウイルス感染によって肝細胞において誘導される遺伝子、それを発現している肝細胞に対する免疫系の応答する遺伝子、さらにその応答をうけた肝細胞において発現する遺伝子が、両肝炎において明確に違うことを明らかにした。

変動している遺伝子・パスウェイは大きく異なっているにもかかわらず、それらが臨床的および病理学的によく似た所見を呈していたことが興味深い。今後、ウイルス性慢性肝炎の診断・治療の方針を決定する際は、両肝炎において共通して認められる所見と異なる所見を分け、それぞれに対する戦略をたてることが重要と思われる。また、今回の解析結果から、診断および治療の標的とするべき遺伝子およびパスウェイの一部が示されたと考えられた。

#### E. 結論

レーザーマイクロダイセクション法を用いたDNAチップ解析とバイオインフォマティクスを用いた包括的発現遺伝子解析により、ウイルス性肝炎の病態を分子レベルで詳細に解析した。

#### F. 研究発表

1. K Hayashida, A Daiba, A Sakai, T Tanaka, K Kaji, N Inaba, S Ando, N Kajiyama, H Terasaki, A Abe, M Ogasawara, M Kohara, M Harada, T Okanoue, S Ito and S Kaneko. Pretreatment

- prediction of interferon-alfa efficacy in chronic hepatitis C patients. Clin Gastroenterol Hepatol 3(12):1253-9, 2005.
2. E Mizukoshi, Y Nakamoto, H Tsuji, T Yamashita and S Kaneko. Identification of alpha-fetoprotein-derived peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ patients with hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 118(5):1194-1204, 2005.
  3. M Honda, H Kawai, Y Shirota, T Yamashita, T Takamura and S Kaneko. cDNA microarray analysis of autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and consecutive disease manifestation. J Autoimmun 25(2):133-40, 2005.
  4. M Honda, H Kawai, Y Shirota, T Yamashita, and S Kaneko. Differential gene expression profiles in stage I primary biliary cirrhosis. Am J Gastroenterol 100(9):2019-30, 2005.
  5. K Kawaguchi, M Honda, T Yamashita, Y Shirota and S Kaneko. Differential gene alteration among hepatoma cell lines demonstrated by cDNA microarray-based comparative genomic hybridization. Biochem Biophys Res Commun 329(1):370-80, 2005.
  6. H Iida, M Honda, H F. Kawai, T Yamashita, Y Shirota, B-C Wang, H Miao, and S Kaneko. Ephrin-A1 Expression Contributes to the Malignant Characteristics of  $\alpha$ -Fetoprotein-Producing Hepatocellular Carcinoma. Gut 54(6):843-51, 2005.
  7. M Matsuda, Y Nakamoto, S Suzuki, T Kurata, and S Kaneko. Interferon-gamma-mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine. Lab Invest 85: 655-663, 2005.
  8. C Fujii, Y Nakamoto, P Lu, K Tsuneyama, BK Popivanova, S Kaneko, and N Mukaida. Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. Int J Cancer 114(2):209-18, 2005.
  9. M Honda, T Shimazaki, and S Kaneko. La protein is a potent regulator of replication of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C through internal ribosomal entry site (IRES) directed translation. Gastroenterology 128(2):449-462, 2005.
- G. 知的所有権の取得状況  
無し

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

Gankyrin と B-Myb のヒト肝臓癌における検討

分担研究者 伊藤義人 京都府立医科大学大学院医学研究科  
消化器病態制御学 講師

**研究要旨：** siRNA を用いて癌遺伝子 Gankyrin の発現を低下させると肝臓癌細胞株にアポトーシスが惹起された。現在、tet-on expression system を用いて Gankyrin の発現調節が可能な in vitro の実験系を構築中である。また、Gankyrin の発現が非癌部に比べて肝細胞癌(HCC)で亢進していることを免疫組織化学的に明らかにした。現在、血清中の Gankyrin を測定する ELISA の樹立を目指している。HCC において、①転写因子 B-MYB 遺伝子(MYBL2)が、転写因子 E2F1/DP1 の下流遺伝子として活性化を受けている、②B-MYB は HCC 細胞増殖を促進する、③細胞周期 G1/S 期において活性化された B-MYB は、次いで G2/M 期の進行に必要な遺伝子群 (CDC2 と CCNA2) を活性化する、以上のことが示唆された。B-MYB は E2F1/DP1 の second regulator として HCC 増殖促進に重要な役割を果たすと想定されたことから、治療標的分子候補と考えられた。

共同研究者

京都府立医科大学大学院医学研究科  
消化器病態制御学

助手 安居幸一郎

大学院生 榎村敦詩

教授 岡上 武

京都大学医学研究科分子病診療学教室

可能であることを明らかにしてきた (Nat Med 6:96 '00、J Biol Chem 278:10668 '03)。さらに最近では、Gankyrin が MDM2 と結合し、MDM2 と wild type p53 との結合を強化し p53 の不活化にも関わるとしている(Cancer Cell 8:75 '05)。

我々は Gankyrin が分子標的療法の標的分子として有力な候補であると考え、Gankyrin を発現低下させる検討を昨年度行った。結果、si-Gankyrin を発現させた肝臓癌細胞株 HuH7 では細胞数が有意に減少し、subG1 期細胞の増加と Annexin V 陽性細胞の増加がみられた。今回、tet-on expression system を用いて Gankyrin の発現調

A. 研究目的

1. Gankyrin は共同研究者の藤田らにより肝細胞癌(HCC)より単離された癌遺伝子である。藤田らはすでに Gankyrin の mRNA が広く HCC で過剰発現していることや、Gankyrin を過剰発現させることで線維芽細胞を癌化させることが

節が可能な *in vitro* の実験系を構築する。また、免疫組織化学的に肝癌組織における Gankyrin の発現を検討する。さらに、Gankyrin の腫瘍マーカーとしての可能性を検討するため、血清中の Gankyrin を測定する ELISA の樹立を目指す。

2. p16<sup>INK4a</sup> - サイクリン D1/Cdk4 - pRB - E2F (RB/E2F 経路) は癌化の基本的な経路の 1 つであり、ほとんどの癌で RB/E2F 経路のどこかに異常が生じている。その結果、転写因子 E2F が常に活性化され、細胞が細胞周期 G1 期で増殖停止しにくくなる。

先にわれわれは、HCC に生じた DNA コピー数変化を CGH (comparative genomic hybridization) 法で網羅的に探索し、第 13 番染色体長腕 13q34 領域に新規遺伝子増幅を検出した。そして、その増幅の標的の 1 つが DP1 遺伝子であることを明らかにした (Hepatology 35:1476-84, 2002)。転写因子 DP1 は E2F ファミリーと heterodimer を形成し、細胞周期 G1/S 期の進行に必要な遺伝子群を活性化する。DP1 の発現量は HCC の腫瘍径増大と有意に相関し、その発現を抑制すると HCC 細胞株の増殖が抑制された (J Hum Genet 48:609-13, 2003)。

本研究では、HCC において E2F1/DP1

によって誘導される遺伝子の同定を目的とした。

## B. 研究方法

1. p53 が wild type である U2OS 細胞にヒトおよびマウスの si-Gankyrin 発現ベクター (si-hGKN、si-mGKN) を導入、または、Tet operator を組み込んだ si-hGKN 発現ベクター (tet-on si-hGKN) を導入し、western blotting で Gankyrin の発現を検討した。血清中の Gankyrin 蛋白の測定を目的とした ELISA の系を作成するため、モノクローナル抗体の作成、および、スクリーニングを行った。肝癌組織における Gankyrin の発現は以下のように検討した。すなわち、パラフィン切片を脱パラ後 5 分間オートクレーブ処理。内因性ペルオキシダーゼを阻害し血清で処理した後、一次抗体およびビオチン化した二次抗体、さらに、avidin HRP と DAB で発色させ鏡検した。

2. HCC 臨床検体 41 例を対象に、E2F1/DP1 により活性化されると報告がある 10 個の下流遺伝子の発現量を real-time RT-PCR 法で定量した。

転写因子 B-MYB の HCC における機能を解析するために、B-MYB 遺伝子 (MYBL2) を高発現している HCC 細胞株



において、MYBL2 に対する siRNA をトランスフェクションしてその発現をノックダウンした。

本研究においては、協力者に研究の目的、医学的意義、侵襲の程度を十分に説明する。さらに、研究結果の匿名性のみならず、いつでも同意を撤回できること、研究への同意は診療内容には一切関係しないこと、研究終了後は検体を破棄することについても説明し、予め、同意書に署名・捺印を得た後、研究を始めることとしている。

### C. 研究結果

1. U2OS 細胞における Gankyrin の発現は si-mGKN を導入してもコントロールと差がなかった。si-hGKN を導入すると、Gankyrin の発現は低下したが、tet-on si-hGKN を導入した場合には Gankyrin の発現低下は乏しかった。Gankyrin に対するモノクローナル抗体を作成すべくスクリーニングを行った結果、抗体 3A6 が得られた。免疫組織化学的に肝癌組織での Gankyrin の発現を検討すると、HCC では非癌部に比べて Gankyrin の発現が亢進していた。Gankyrin は主に肝癌細胞の細胞質に強く発現していた。

2. MYBL2、CDC2 (cyclin-dependent kinase 1 遺伝子)、および CCNA2 (cyclin A 遺伝子) の発現が、非癌部に比べて

癌部において有意に亢進しており、なかでも MYBL2 は平均 4.4 倍と最も亢進していた。癌部とその周囲の非癌部で発現量を比較し得たペアサンプル 18 例中 17 例において、MYBL2 は癌部において有意に発現亢進していた。

siRNA を用いて、MYBL2 の発現をノックダウンすると、HCC 細胞株の増殖能が低下し、また細胞周期 G2/M 期の進行を調節する CDC2 と CCNA2 の発現量が低下した。

### D. 考案

1. U2OS 細胞に si-hGKN を導入したときに低下した Gankyrin の発現が tet-on si-hGKN を導入した場合には低下しないため、tet-on si-hGKN の骨格を改変する必要がある。現在、H1 promoter 以下 Tet operator および si-hGKN までを複数組み込んだベクターを作成している。HCC において Gankyrin の発現は非癌部で弱く、肝癌細胞の細胞質で強かった。このことは、ヒトの肝癌組織において特異的に Gankyrin が過剰発現していることを示す。共同研究者の藤田らは Gankyrin が RB や p53 の不活化に関わると報告しており、興味深い結果と考えられる。血清中の Gankyrin を測定する ELISA の系は、現在、作成中である。

2. ①B-MYB 遺伝子は E2F1/DP1 の下流遺伝子として活性化を受けている、② B-MYB は HCC 細胞増殖を促進する、③ 細胞周期 G1/S 期において活性化された B-MYB は、次いで G2/M 期の進行に必要な遺伝子群 (CDC2 と CCNA2) を活性化する、以上のことが示唆された。

#### E. 結論

1. ヒトの肝癌組織で Gankyrin は肝癌細胞に特異的に過剰発現していた。

今後、ヒト血清中での測定系や Gankyrin の発現調節が可能な *in vitro* の実験系を構築することで、より重要な情報が得られるものと考えられる。

2. B-MYB は E2F1/DP1 の second regulator として HCC 増殖促進に重要な役割を果たしていると考えられることから、格好の治療標的分子候補と考えられた。

#### F. 研究発表

1) Minami M, Daimon Y, Mori K, Takashima H, Nakajima T, Itoh Y, Okanou T. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene*. 2005 Jun 23;24(27):4340-8.

2) Nakajima T, Sekoguchi S, Nishikawa T, Takashima H, Watanabe T, Minami M,

Itoh Y, Mizuta N, Nakajima H, Mazaki T, Yanagisawa A, Okanou T. Multifocal intraportal invasion of breast carcinoma diagnosed by laparoscopy-assisted liver biopsy. *World J Gastroenterol*. 2005 Apr 21;11(15):2360-3.

3) Okanou T, Makiyama A, Nakayama M, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Nakajima T, Yasui K, Minami M, Itoh Y. A follow-up study to determine the value of liver biopsy and need for antiviral therapy for hepatitis C virus carriers with persistently normal serum aminotransferase. *J Hepatol*. 2005 Oct;43(4):599-605.

4) Okanou T, Minami M, Makiyama A, Sumida Y, Yasui K, Itoh Y. Natural course of asymptomatic hepatitis C virus-infected patients and hepatocellular carcinoma after interferon therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005 Oct;3 (10 Suppl 2):S89-91.

5) Nakashima T, Sumida Y, Furutani M, Hirohama A, Okita M, Mitsuyoshi H, Itoh Y, Okanou T. Elevation of serum thioredoxin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2005 (in press).

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

HCV 関連肝疾患患者血清のプロテオーム解析と

HCV 抗体陽性者の 10 年間のコホート研究

分担研究者 坪内博仁 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 教授

研究要旨:HCV高浸淫地区のHCV陽性者を対象として、約10年間の臨床経過を検討し、ALT値は肝癌発症を予測する因子の一つであるだけでなく、ALT高値は肝癌で死亡する可能性が高いことを明らかにした。しかし、ALTが比較的低値が持続しても肝癌発症のリスクがあり、ALT持続正常者のうちフェリチン、HFE遺伝子の一塩基多型(H63D)はALT上昇と関連する可能性があると考えられた。さらに、TNF- $\alpha$  遺伝子の一塩基多型(-238G/A)が肝線維化の進展と関連する可能性を明らかにした。また、HCV関連肝疾患患者血清のプロテオーム解析から、感度・特異度が80%以上の肝癌診断法を確立した。この方法を用いると臨床的に肝癌が明らかとなる約1年前に肝癌を高率に予測でき、この方法が肝癌の判別、肝癌の早期診断法となる可能性を明らかにした。

共同研究者

宇都浩文、楠元寿典、上村修司

宮崎大学医学部内科学第二講座

林 克裕

宮崎大学医学部医学教育改革推進センター

井戸章雄

京都大学医学部附属病院探索医療センター

(測定キットの正常値)、49以下、50以上の1996年以降10年間の累積肝癌発症率を検討した。

3) 1995年のALT値が19以下、34以下の対象者で1996年以降の検査で、ALTが35以上となったflare-up症例の10年間の累積を検討した。また、2000年までALT34以下が持続した対象者で、さらに2004年までALT34以下が持続した対象者と、2001年以降にALTがflare-upした対象者の2000年の臨床的特徴を比較検討した。鉄関連遺伝子の一塩基多型についても解析した。

4) TNF- $\alpha$  遺伝子もしくはIL-10遺伝子の一塩基多型(SNP)とALT値もしくは肝線維化マーカーとの関連を解析した。

5) HCV関連の肝癌患者61例と非肝癌患者55例(肝硬変35例、慢性肝炎20例)の血清を使用した。患者血清を前処理後に、イオン交換チップに添加し、SELDIプロテインチップシステムを用いて解析した。測定範囲は分子量1万以下の蛋白質・ペプチド領域とした。

倫理面の配慮(昨年度までと同様である)

A. 研究目的

本研究の目的は、C型肝炎ウイルス(HCV)感染者の血清を用いたプロテオーム解析およびHCV高浸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) 1995年までに検診に参加したHCV抗体陽性でHCVコア抗原もしくはHCV RNA測定者(いずれか陽性をウイルス陽性者とした)を対象とした(男性317名、女性500名、平均年齢65歳)。

2) ウイルス陽性かつ1995年に腹部超音波検査で肝癌がない対象者で、1995年のALT値が19以下、34以下

a. 個人の人権の擁護:1)研究内容について十分な説明を行い、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・検査や治療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。宮崎大学医学部附属病院通院もしくは入院患者は継続して附属病院で検査および加療を受けられる。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:検診時に宮崎大学医学部第二内科の担当医およびT町看護師より、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。)また、宮崎大学医学部附属病院通院もしくは入院患者は担当医より、研究内容について説明を行ない、書面による同意を得る。

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. 研究結果

1) ウイルス陽性者の 10 年間の累積全死亡率は 23.2% (うち肝癌死亡率 6.1%) で、ウイルス陰性者 17.2% (肝癌死亡なし) よりも全死亡率および肝癌死亡率が有意に高く、年齢、性に有意差はなかった。また、ウイルス陽性者のうち、肝癌死亡者は非肝癌死亡者よりも 1995 年の ALT が高値で、年齢、性、ウイルス量、セロタイプには有意差がなかった。

2) 1995 年の ALT 値が 19 以下、34 以下(測定キットの正常値)、49 以下、50 以上の 1996 年以降 10 年間の累積肝癌発症率はそれぞれ 0、2.8、6.3、21.0% で、ALT 値により有意に HCC 発症率は異なっていた。

3) 1995 年の ALT 値が 19 以下、34 以下の対象者で

1996 年以降の検査で、ALT が 35 以上となった flare-up 症例の 10 年間の累積は、それぞれ 35.8%、71.6% で、flare-up 症例は ALT 持続正常者より 1995 年のフェリチン値が有意に高かった。また、2000 年まで ALT34 以下が持続した対象者で、さらに 2004 年まで ALT34 以下が持続した 66 名に比較し、2001 年以降に ALT が flare-up した 19 名の 2000 年のフェリチン値は有意に高値であった。

4) 2001 年以降に ALT が flare-up した対象者では 2004 年まで ALT34 以下が持続した対象者よりも HFE(H63D) の頻度が高かったが、HFE (C282Y)、Hepcidin(166C→T)、Transferrin Receptor 2(I238M)、ferroportin(H248Q)の一塩基多型は ALT と関連しなかった。

5) 1993 年から 2002 年まで ALT が持続正常であった群(74 名)と ALT が少なくとも 1 回以上異常であった群(211 名)との比較では、TNF- $\alpha$ (-308G/A、-238C/A)、IL-10(-1082G/A、-819C/T、-592C/A)の SNP の頻度に有意差はなかった。一方、TNF- $\alpha$ (-238)の SNP が GA である対象者は-238GG である対象者よりも有意に血清 4 型コラーゲン 7S が高かった。

6) SELDIプロテインチップシステムを用いて、HCVによる肝癌を統計学的手法により感度 82%、特異度 81%で、肝癌と判定できる手法を確立した。この方法を用いると臨床的に肝癌が明らかとなる約 1 年前に肝癌を高率に予測でき(肝癌が明らかとなる 1 年以上前の血清が保存してあった 7 例中 6 例を肝癌と早期診断)、この方法が肝癌の判別、肝癌の早期診断法となる可能性を明らかにした。

### D. 考察

日本には HCV 高浸淫地区が散在すると考えられ、我々の地域も含めて、Group1の頻度が高く、ウイルス自然排除が女性に多いことなどが共通している。今後日本では、患者の年齢を考慮したC型慢性肝炎に対する治療法の確立が重要であり、我々が解析した対象者の 1995 年の平均年齢が約 65 歳であることを考えると、多くの対象者を長期に追跡調査した我々の研究は、今後 10 年間の日本のC型慢性肝炎患者の予後の推定に有用であると考えられる。また、HCV による肝障害と血清

鉄の関与は知られているが、HFE 以外の鉄代謝関連遺伝子の一塩基多型と HCV との関連性についての検討は少なく、日本人でのこれらの一塩基多型を明らかにすることは意義があると考えられた。さらに、C 型慢性肝炎において肝障害は肝癌を予測する簡便な指標で、ALT 値正常の HCV キャリアも存在し、そのような患者からの肝発癌の頻度は少ないことを本研究で示したが、今後 ALT の正常値についてはさらに検討が必要であると考えられた。また、本研究では ALT が持続正常であっても、経過中に ALT が上昇 (flare-up) することがあり、その肝障害の発症機序とフェリチン、HFE 遺伝子一塩基多型との関連性を明らかにした。その他、本研究では、SELDI プロテインチップシステムを用いた検討も行い、HCV 関連慢性肝疾患患者血清の網羅的タンパク質発現解析により、肝癌診断に有用な手法を確立できた。この手法は蛋白の同定には不向きであるが、今後得られたピーク蛋白を異なる手法で同定し、病態解明や新しい分子標的治療法の開発につなげたい。

#### E. 結論

C 型肝炎ウイルス(HCV)感染者血清を用いたプロテオーム解析および 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の一部を明らかにすることが出来た。

#### 研究発表

##### ・論文発表

1. Suruki R, Hayashi K, Kusumoto K, Uto H, Ido A, Tsubouchi H, Stuver SO. Alanine aminotransferase level as a predictor of HCV-associated hepatocellular carcinoma incidence in a community-based population in Japan. *Int J Cancer*. 2005 (in press)
2. Uto H, Hayashi K, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kodama M, Ido A, Kohara M, Stuver SO, Tsubouchi H. Spontaneous elimination of hepatitis C virus RNA in individuals with persistent infection in a hyperendemic area of Japan. *Hepatol Res*. 2006;34(1):28-34
3. Kim ID, Azuma T, Ido A, Moriuchi A, Numata M, Teramukai S, Okamoto J, Tsutsumi S, Tanaka K, Tsubouchi H. Navigator-echo-based MR provides

high-resolution images and precise volumetry of swine livers without breath holding or injection of contrast media. *Liver Transpl*. 2006;12(1):72-7.

4. Hasuike S, Ido A, Uto H, Moriuchi A, Tahara Y, Numata M, Nagata K, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation of hepatic oval cells and possibly promotes the differentiation in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005; 20(11): 1753-61.
5. Uto H, Nakanishi C, Ido A, Hasuike S, Kusumoto K, Abe H, Numata M, Nagata K, Hayashi K, Tsubouchi H. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, pioglitazone, inhibits fat accumulation and fibrosis in the livers of rats fed a choline-deficient, l-amino acid-defined diet. *Hepatol Res*. 2005;32(4): 235-242
6. Nagata-Tsubouchi Y, Ido A, Uto H, Numata M, Moriuchi A, Kim I, Hasuike S, Nagata K, Sekiya T, Hayashi K, Tsubouchi H. Molecular mechanisms of hereditary persistence of alpha-fetoprotein (AFP) in two Japanese families A hepatocyte nuclear factor-1 site mutation leads to induction of the AFP gene expression in adult livers. *Hepatol Res*. 2005;31(2):79-87
7. Hayashi K, Hasuike S, Kusumoto K, Ido A, Uto H, Kenji N, Kohara M, Stuver SO, Tsubouchi H. Usefulness of a new immuno-radiometric assay to detect hepatitis C core antigen in a community-based population. *J Viral Hepat*. 2005;12(1):106-10.
8. Gao G, Stuver SO, Okayama A, Tsubouchi H, Mueller NE, Tabor E. The minimum number of clones necessary to sequence in order to obtain the maximum information about hepatitis C virus quasispecies: a comparison of subjects with and without liver cancer. *J Viral Hepat*. 2005;12(1):46-50.

##### ・学会発表

1. Uto Hirofumi, et al. Clinical features and natural course of hepatitis C virus carriers with persistently

normal alanine aminotransferase levels in a hyperendemic area of Japan. Digestive Disease Week 2005, 2005年5月

2. Kanmura Shuji, et al. Proteomic analysis of serum protein in patients with hepatocellular carcinoma. 10 US-Japan GI and Liver meeting in 21st Century. 2005年5月

3. Kanmura Shuji, et al: Proteomic analysis of serum proteins in patients with hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection. 56th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2005年11月

4. 上村修司、他: SELDI プロテインチップシステムによる C 型肝炎ウイルス関連慢性肝疾患患者血清の解析. 第 91 回日本消化器病学会総会、2005 年 4 月

5. 宇都浩文、他: HCV 陽性 ALT 長期持続正常者の臨床的特徴. 第 102 回日本内科学会講演会、2005 年 4 月

6. 宇都浩文、他: コリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラットにおける遺伝子発現解析. 第 41 回日本肝臓学会総会、2005 年 6 月

7. 宇都浩文、他: オステオアクチビン強発現細胞の培養上清のプロテオーム解析. 第 41 回日本肝臓学会総会、2005 年 6 月

8. 楠元寿典、他: C 型肝炎ウイルス抗体陽性者における E 型肝炎ウイルス抗体陽性者率の検討. 第 41 回日本肝臓学会総会、2005 年 6 月

9. 上村修司、他: 肝疾患患者血清のプロテオーム解析の診断および治療への応用. 第 1 回京都肝セルバイオロジー研究会、2005 年 7 月

10. 上村修司、他: C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌患

者血清プロテオーム解析. 第 7 回九州肝癌研究会学術講演会、2005 年 9 月

11. 上村修司、他: C 型肝炎ウイルス関連慢性肝疾患患者血清の網羅的蛋白発現解析. 第 9 回日本肝臓学会大会、2005 年 10 月

12. 楠元寿典、他: C 型肝炎ウイルス (HCV) 関連肝疾患の病態進展に関連する HCV コア遺伝子領域の検討. 第 9 回日本肝臓学会大会、2005 年 10 月

13. 上村修司、他: 肝細胞癌の早期診断法および新規治療法の開発を目指した血清プロテオーム解析. 第 86 回日本消化器病学会九州支部例会、2005 年 11 月

14. 楠元寿典、他: HCV 感染の自然経過に対する IL-10、TNF $\alpha$  遺伝子多型の検討 第 36 回日本肝臓学会西部会、2005 年 11 月

15. 宇都浩文、他: 血清 ALT 持続正常者の ALT 上昇と血清フェリチン値との関連性の検討. 第 36 回日本肝臓学会西部会、2005 年 11 月

知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許出願

【発明の名称】C 型肝炎ウイルス関連肝細胞癌の将来における発症を予測する方法、その方法に用いる決定木、及びその決定木の構築方法

【出願番号】特許願 2005 年第 325308 号

【出願日】平成 17 年 11 月 9 日

【発明者】坪内 博仁、宇都 浩文、上村 修司

【特許出願人】独立行政法人科学技術振興機構

### 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) H. Dansako, (加藤)	Hepatitis C virus proteins exhibit conflicting effects on the interferon system in human hepatocyte cells.	Biochemical and Biophysical Research Communications	336	458-468	2005
2) K. Li, Z. Chen (加藤)	Distinct poly-I:C and virus-activated signaling pathways leading to interferon- $\beta$ production in hepatocytes.	Journal of Biological Chemistry	280	16739-16747	2005
3) K. Naka, (加藤)	Interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells is caused by functional disruption of type I interferon receptors.	Journal of General Virology	86	2787-2792	2005
4) K. Naka, (加藤)	Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication: effect of combination with interferon- $\alpha$ .	Biochemical and Biophysical Research Communications	330	871-879	2005



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) M. Ikeda, (加藤)	Efficient replication of a full-length hepatitis C virus genome, strain O, in cell culture, and development of a luciferase reporter system.	Biochemical and Biophysical Research Communications	329	1350-1359	2005
6) N. Kato, (加藤)	Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture.	Journal of General Virology	86	645-656	2005
7) K. Tamura, (加藤)	Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication.	Microbes and Infection	7	29-40	2005
8) K. Abe, (加藤)	cDNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells.	Virus Research	107	73-81	2005
9) Hamamoto I, (松浦)	Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B.	Journal of Virology	79	13473-13482	2005
10) Li TC, (松浦)	Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus.	Journal of Virology	79	12999-13006	2005

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) Abe T, (松浦)	Involvement of the toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus.	Journal of Virology	79	2847-2858	2005
12) Kitagawa Y, (松浦)	Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses.	Journal of Virology	79	3639-3652	2005
13) Mori Y, (松浦)	Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication.	Journal of Virology	79	3448-3458	2005
14) Suzuki R, (松浦)	Molecular determinants for subcellular localization of hepatitis C virus core protein.	Journal of Virology	79	1271-1281	2005
15) Chen CH, (榎本)	Enhancement of mitochondrial gene expression in the liver of primary biliary cirrhosis.	Hepatology Research	31(1)	24-30	2005
16) Tanabe Y, (榎本)	Characteristic sequence changes of hepatitis C virus genotype 2b associated with sustained biochemical response to IFN therapy.	Journal of Viral Hepatitis	12(3)	251-261	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
17) Nakagawa M, (榎本)	Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins	Gastroenterology	129(3)	1031-1041	2005
18) Hamano K, (榎本)	Mutations in the NS5B region of the hepatitis C virus genome correlate with clinical outcomes of interferon- $\alpha$ plus ribavirin combination therapy.	Journal of Gastroenterology and Hepatology	20(9)	1401-1409	2005
19) Simmonds P, (榎本)	Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes.	Hepatology	42(4)	962-973	2005
20) Nakanishi H, (榎本)	Polymerase domain B mutation is associated with hepatitis relapse during long-term lamivudine therapy for chronic hepatitis B.	Intervirology	48(6)	381-388	2005
21) Asahina Y, (榎本)	Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C.	Journal of Gastroenterology	43(4)	623-629	2005
22) Maekawa S, (榎本)	Genetic changes in the interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus (HCV) during the natural course of infection: an implication for the gene function in the role of chronic infection.	Journal of Gastroenterology	40(1)	113-115	2005

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) Itakura J, (榎本)	Viral load change and sequential evolution of entire hepatitis C virus genome in Irish recipients of single source-contaminated anti-D immunoglobulin.	Journal of Viral Hepatitis	12(6)	594-603	2005
24) Koike K, (小池)	Metabolic aspects of hepatitis C: steatohepatitis distinct from NASH.	Journal of Gastroenterology	40	329-336	2005
25) Koike K. (小池)	Steatosis in chronic hepatitis C: fuel for overproduction of oxidative stress?	Journal of Gastroenterology	40	664-665	2005
26) Miyoshi H, (小池)	Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression.	Journal of Hepatology	43	757-763	2005
27) Koike K. (小池)	Hepatitis C as a metabolic disease: implication for the pathogenesis of NASH.	Hepatology Research	33	145-150	2005