

これらの脂質成分に着目し、これらの合成経路阻害剤、あるいはこれらを直接除去する薬剤を用いて、HCV 増殖に対する影響を HCV-replicon システム、および完全粒子産生システム (JFH システム) を用いて解析した。

C. 研究成果

(1) コレステロール合成系路 Mevalonate pathway 阻害剤は HCV 増殖を強力に抑制する
我々は、昨年度 Mevalonate pathway 阻害剤であるスタチンについて、simvastatin を用いてその抗 HCV 効果について明らかにしていたが、薬効を表す selectivity index は 10 程度で必ずしも高いとは言えなかった。我々は、Mevalonate pathway 下流のファルネシル酸シンテターゼに対して強い阻害効果をもつビスフォスフォネートに注目し、抗 HCV 活性の有無について検討したところ、Nitrogen-containing Bisphosphonate である Risedronate、Alendronat、Zoledronic acid において、スタチンを遙かに凌ぐ著明な抗 HCV 効果を持つこと (selectivity index 300~400) が明らかとなった。

(2) Mevalonate pathway 阻害剤による HCV 増殖抑制は、ゲラニルゲラニオールによって改善する。

強力な抗 HCV 活性を有するビスフォスフォネートの効果がコレステロールそのものの低下作用によるものか、他の機序によるものかを確認した。同経路の阻害によって、コレステロール合成のみならず、ゲラニルゲラニル化などの、タンパク質プレニル化が阻害されるが、同剤投与下においてゲラニルゲラニオールを投与することによって、

HCV 増殖抑制は rescue される傾向となった。すなわち、ビスフォスフォネートによる HCV 増殖抑制にはタンパク質のゲラニルゲラニル化抑制が重要な機序と考えられた。

(2) コレステロール吸着剤 β サイクロデキストリンにより、HCV 増殖は抑制される。

一方、脂質ラフト構成成分であるコレステロールそのものの、HCV 増殖への関与を検証するため、直接脂質膜からコレステロールを吸着する作用を持つ β サイクロデキストリンの効果を検討したところ、特異的な HCV 増殖抑制が認められ、コレステロールそのものも HCV 増殖に必須であることが考えられた。

D. 考察と結論

脂質ラフトを構成する脂質成分であるスフィンゴミエリン、コレステロール、飽和脂肪酸、各々の合成を阻害することによって、さらに、これらの脂質ラフト構成成分のみならず、蛋白質の脂質修飾のひとつであるゲラニルゲラニル化の阻害によっても、HCV 増殖が特異的に抑制されることが示され、脂質代謝制御が重要な抗 HCV 治療戦略のターゲットとなることが示された。

E. 研究発表

論文発表

1. Yamashiro T, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Nakagawa M, Chen CH, Itsui Y, Koyama T, Takeda Y, Maekawa S, Enomoto N, Sakugawa H, Watanabe M.

Negative regulation of intracellular hepatitis C virus replication by

- interferon regulatory factor 3.
J Gastroenterol. 2006 Aug;41(8):750-7.
2. Itsui Y, Sakamoto N, Kurosaki M, Kanazawa N, Tanabe Y, Koyama T, Takeda Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Sekine Y, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M.
Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication.
J Viral Hepat. 2006 Oct;13(10):690-700.
3. Kohashi T, Maekawa S, Sakamoto N, Kurosaki M, Watanabe H, Tanabe Y, Chen CH, Kanazawa N, Nakagawa M, Kakinuma S, Yamashiro T, Itsui Y, Koyama T, Enomoto N, Watanabe M.
Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication.
J Viral Hepat. 2006 Sep;13(9):582-90.
4. Koyama T, Sakamoto N, Tanabe Y, Nakagawa M, Itsui Y, Takeda Y, Kakinuma S, Sekine Y, Maekawa S, Yanai Y, Kurimoto M, Watanabe M.
Divergent activities of interferon-alpha subtypes against intracellular hepatitis C virus replication.
Hepatol Res. 2006 Jan;34(1):41-9.
5. Hosogaya S, Ozaki Y, Enomoto N, Akahane Y.
Analysis of prognostic factors in therapeutic responses to interferon in patients with chronic hepatitis C.
Transl Res. 2006 Aug;148(2):79-86.
- 学会発表
1. Amemiya F, Maekawa S, Kanayama A, Itakura Y, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Okada H, Enomoto N.
Inhibition of sphingolipid synthesis attenuates HCV replication in vitro.
International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (13th Annual Meeting) August 27-31, 2006; Cairns (Australia).
2. Maekawa S, Itakura Y, Amemiya F, Kanayama A, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Sakamoto N, Enomoto N.
HCV modulates RIG-I signaling pathway differently dependent on HCV isolates.
International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (13th Annual Meeting) August 27-31, 2006; Cairns (Australia).
- 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

C型肝炎と脂質代謝

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨：我々は、マウスモデルを用いてC型肝炎ウイルス(HCV)コア蛋白が肝発癌を引き起こすことを示してきた。この動物モデルでは、明らかな炎症の不在下に肝脂肪化(steatosis)が発生し、その後に肝細胞癌が発生している。また、このマウスモデルおよびC型肝炎患者の肝に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることが明らかになっている。今回、我々は、この脂肪化および一価不飽和脂肪酸増加の機序とその意義を知るために、培養細胞を用いて検討を行った。不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において著明な亢進を示していたが、 δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進しているため、見かけ上は一価不飽和脂肪酸ではなく、不飽和脂肪酸 20:3(n-9)が増加していた。多価不飽和脂肪酸(PUFA)である eicosatetraenoic acid や arachidonic acid によって一価不飽和脂肪酸はコア蛋白非特異的に減少したが、コア蛋白によって誘発されることがわかっている活性酸素種(ROS, reactive oxygen species)は減少しなかった。これに対して、ピルビン酸の投与によって解糖系において NADH を消費させると、中性脂肪、一価不飽和脂肪酸、ROS 産生のいずれもがコア蛋白発現細胞で特異的に減少した。一価不飽和脂肪酸の増加は、細胞質内 NADH 増加の結果と考えるのが妥当と考えられた。HCV によるミトコンドリア電子伝達系複合体 I (NADH dehydrogenase) の機能障害が、ROS 産生、脂質代謝異常を含む C 型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示され、病態改善薬開発への可能性が示唆された。

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、解明の妨げとなっている。我々はHCVのコア蛋白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、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ってきた。また、

マウスモデルで得られた知見をもとにして、ヒトC型肝炎患者においても検討を行ってきた。

C型肝炎動物モデルであるコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては、明らかな炎症の不在下に肝脂肪化(steatosis)が発生し、その後に肝細胞癌(肝癌)が発生している。また、このマウスモデルおよびC型肝炎患者の肝に蓄積する脂肪には特

徴があり、オレイン酸、バクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることが明らかになっている。今回、我々は、この肝脂肪化および一価不飽和脂肪酸増加の機序と意義を知るために、培養細胞を用いて検討を行った。

B. 方法

コア遺伝子を導入した HepG2 細胞である Hep39 細胞と対照である Heps wx 細胞を用いて以下のような解析を行なった。脱脂肪化ウシアルブミンを含むメEDIUMに溶解した脂肪酸を、各種条件下で細胞へ曝露した後細胞を回収し、脂肪酸を抽出した。脂肪酸はガスクロマトグラフィによって解析した。eicosatetraenoic acid、eicosatetraenoic acid(EPA)、arachidonic acid(AA)、ピルビン酸を適宜添加して培養を行なった。

C. 結果

(1) コア蛋白発現細胞では、対照細胞に比して中性脂肪が有意に増加していた (5.56 ± 0.33 vs. $2.92 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{mg cell}$, $p < 0.01$)。

(2) 一価不飽和脂肪酸 (オレイン酸、バクセン酸、パルミトオレイン酸) の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において著明な亢進を示していたが、 δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進しているため、見かけ上は最下流に存在する 5, 8, 11-eicosatrienoic acid (20:3(n-9)) 不飽和脂肪酸が増加していた。

(3) δ -6 desaturase の特異的な阻害剤である eicosatetraenoic acid(ETYA)によ

ってコア蛋白発現細胞のみで 18:1(n-9) が著増した。このことからコア蛋白発現 HepG2 細胞においても δ -9 desaturase 活性が著増していることが示唆された。

(4) 多価不飽和脂肪酸である eicosatetraenoic acid (EPA) や arachidonic acid (AA) によって一価不飽和脂肪酸は、コア蛋白発現細胞と対照細胞のいずれにおいても減少したが、活性酸素種 (ROS, reactive oxygen species) はいずれの細胞でも減少しなかった。

(5) これに対して、ピルビン酸の投与によって解糖系において lactate dehydrogenase によって lactate 産生側へ平衡を傾けると、NADH が消費され、細胞内の蓄積中性脂肪、一価不飽和脂肪酸、ROS 産生のいずれもが、コア蛋白発現細胞においてのみ特異的に改善された。

D. 考察

HCV 感染症における肝発癌の機序については、まだ明らかでない点が多い。HCV コア蛋白は動物モデルにおいて肝癌を発生させることが明らかになっており、ヒト C 型肝炎における肝発癌で重要な役割を果たしていることが示されてきている。この肝発癌の過程において、肝脂肪化が炎症不在下に発生し、肝発癌への関わりが想定されている。

C 型肝炎における肝脂肪化の機序については、我々のこれまでの検討によって、MTP 活性低下による肝からの VLDL 分泌の低下、ミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化の阻害等が明らかになってきている。C 型肝炎における肝脂肪化では、また、蓄積され

る脂肪には特徴があり、オレイン酸、ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることも判明している。しかし、この一価不飽和脂肪酸増加の機序および意義については明らかではない。

今回の我々の検討によって、一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による desaturase 活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積 (= 過還元状態) にあることが明らかになった。すなわち、一価不飽和脂肪酸増加は膜の流動性を増加させ細胞増殖へ有利に働くが、すくなくとも酸化ストレスの増加には直接的には関与していない可能性が高いといえる。HCV によるミトコンドリア電子伝達系複合体 I (NADH dehydrogenase) の機能障害が、C 型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示されたといえる。NADH を減少させる方法によって C 型肝炎の病態を改善させる可能性がある。

E. 結論

一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による desaturase 活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積 (= 過還元状態) にあることが明らかになった。本発見によって、C 型慢性肝炎における、高頻度かつ多中心性の肝発癌が、より説明しやすくなったと考える。C 型肝炎の病態解明と病変進行の予防、病態改善薬の開発に向けて重要な発見といえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koike K. Hepatitis C virus infection presenting with metabolic disease by inducing insulin resistance. *Intervirology* 2006;49:51-57.
- 2) Koike K, Miyoshi H. Oxidative stress and hepatitis C viral infection. *Hepatol Res* 2006;34:65-76.
- 3) Koike K. Oxidative stress and apoptosis in hepatitis C: the core issue. *J Gastroenterology* 2006;41:292-294.
- 4) Okuse C, Yotsuyanagi H, Nagase Y, Kobayashi Y, Yasuda Y, Koike K, Iino S, Suzuki M, Itoh F. Risk Factors for Retinopathy Associated with Interferon Alpha-2b and Ribavirin Combination Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006;12:3759-3759.
- 5) Koike K. Antiviral treatment of hepatitis C: present status and future prospects. *J Infect Chemother* 2006;12:227-232.
- 6) Takahashi H, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Koibuchi T, Suzuki M, Kato T, Nakamura T, Iwamoto A, Nishioka K, Iino S, Koike K, Itoh F. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in metropolitan areas in Japan. *J Gastroenterol* 2006;41:981-986.
- 7) Koike K, Tsukada K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S. Prevalence of Coinfection with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Japan. *Hepatol Res*

2007;37:2-5.

- 8) Koike K. Pathogenesis of HCV-associated HCC: dual-pass carcinogenesis through the activation of oxidative stress and intracellular signaling. *Hepatol Res* 2007 in press.
 - 9) Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 in press.
 - 10) Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Hepatitis C Virus Core Protein Induces Insulin Resistance through a PA28 γ -Dependent Pathway. *J Virol* 2007;81:1727-1735.
 - 11) Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:1661-1666.
 - 12) Yotsuyanagi H, Koike K. Mechanisms underlying drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis B and C viruses. *J Gastroenterol* 2007 in press.
 - 13) Suzuki Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Nagase Y, Takahashi H, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Iino S, Itoh F. Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-resistant hepatitis B virus: A case report. *World J Gastroenterol* 2007 in press.
2. 学会発表
 - 1) Moriishi K, Moriya K, Miyamoto H, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y: Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatosis and hepatocarcinogenesis. p130, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
 - 2) Moriya K, Shinzawa S, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K: Iron-reactive overexpression of anti-oxidative heme oxygenase-1 is spoiled by the effect of HCV core protein in vivo. p131, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
 - 3) Miyoshi H, Moriya K, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K: Mitochondrial dysfunction by HCV core protein and its restoration by tacrolimus. p118, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
 - 4) Tsutsumi T, Tomobe K, Suzuki T, Mizumoto K, Miyamura T, Koike K: HCV core protein transactivates IL-8 via ATF-6 pathway. p188, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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

C型慢性肝炎から肝癌発生の過程で発現量が変化する肝内遺伝子群の検討

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 肝細胞癌合併患者を含むC型慢性肝疾患患者の、肝組織中の遺伝子発現パターンを解析することにより、線維化進展および発癌過程で起こる遺伝子発現の変化について、DNA マイクロアレイ解析を用いて網羅的に検討した。慢性肝炎の組織では代謝と免疫応答に関する遺伝子群、肝細胞癌では細胞周期、増殖、アポトーシス、シグナル伝達に関する遺伝子群の発現が増強されていた。肝細胞癌近傍の組織ではシグナル伝達、アポトーシス、免疫応答、細胞接着に関する遺伝子群などの発現が増強されていた。これらの解析は、慢性肝炎における線維化進展機・発癌のメカニズムの解明、癌の早期診断法の開発などに有用である可能性がある。

共同研究者

石川哲也 愛知医科大学 消化器内科 助教授
奥村明彦 愛知医科大学 消化器内科 講師

A. 研究目的

慢性肝炎における線維化進展機構の解明、肝細胞癌における発癌のメカニズムの解明、癌の早期診断法の開発のため、慢性肝炎患者、肝細胞癌患者の肝組織中における遺伝子発現の変化について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に検討する。

B. 研究方法

対象はC型慢性肝炎患者14例（F1:4例、F2:5例、F3:5例）。C型慢性肝疾患に肝細胞癌を合併した患者7例。C型慢性肝炎患者については肝生検組織より、肝細胞癌合併患者については手術標本（癌部、非癌部）より、計28サンプルを用いて解析を行った。まず得られた肝組織より、total RNAを抽出し、逆転写によりcDNAを合成した。T7 RNA transcriptionによりcRNAを増幅、ラベリング後、スライド上のDNA chipにハイブリした。DNA chipはAgilent TechnologiesのHuman 1A オリゴDNA マイクロアレイ（21,073遺伝子）を用いた。正常ヒト肝組織での発現遺伝子をコントロールとして、サンプル間の発現量の比較を行った。なお、遺伝子解析はヒト・遺伝子研究に関する倫理指針に基づき、当大学倫理委員会の承認の元に行った。

C. 研究結果

解析した21073遺伝子中、582遺伝子が有意な変動を示した。C型慢性肝炎患者の肝生検組織は、線維化進展度ごとに分類（F1; C1, F2; C2, F3; C3）、肝細胞癌の手術標本中の非癌部組織は、線維化がF2-3であったものをC4（4サンプル）、F4であったものをC5（3サンプル）とし、癌部組織はC6と分類した。Hierarchical cluster analysisでは、ほとんどのサンプルが組織分類と一致したグループを形成した。一致しなかったものは、C1の1サンプル（C2の形成す

るグループへ）、C3の1サンプル（C1のグループへ）、C5の1サンプル（C6のグループへ）の3サンプルのみであった。

Hierarchical cluster analysisにより分類されたグループごとに、選択された582遺伝子の発現パターンを比較し、9つの特徴的な遺伝子群のクラスターを得た。慢性肝炎組織で発現が増強、非癌部・癌部組織で発現が低下するパターンをとるクラスターには、immune responseに関連する2遺伝子、metabolismに関連する1遺伝子が属していた。慢性肝炎・非癌部組織で発現が増強、癌部組織で発現が低下するパターンをとるクラスターには、metabolismに関連する4遺伝子、cell adhesion/cell growthに関連する2遺伝子、signaling pathwayに関連する2遺伝子、immune responseに関連する1遺伝子が属していた。慢性肝炎組織で発現が低下し、非癌部・癌部組織で発現が増強するパターンをとるクラスターには、cell cycle/growth / proliferationに関連する4遺伝子、apoptosisに関連する2遺伝子、signaling pathwayに関連する2遺伝子が属していた。また、慢性肝炎・癌部組織で発現が低く、非癌部組織で発現増強するパターンをとるクラスターには、signaling pathwayに関連する12遺伝子、immune responseに関連する6遺伝子、apoptosisに関連する4遺伝子、cell adhesionに関連する4遺伝子、cell cycle/growthに関連する2遺伝子、oxidative stressに関連する1遺伝子が含まれていた。

D. 考察

担癌患者を含むC型慢性肝疾患患者の肝組織中の遺伝子発現パターンを解析することにより、線維化進展・発癌に関与する遺伝子群の推定が可能であった。これらの個々の遺伝子を詳細に解析することにより、線維化進展および発癌のメカニズムの解明に繋げることができる可能性がある。また、発癌過程における遺伝子発現パターンの変化を解析することにより、癌の早期診断、発癌のハイリスク群の囲い込みができる

可能性があると考えられる。

E. 結論

慢性肝疾患患者肝組織中の遺伝子発現の解析が肝線維化進展・発癌機構の解明、肝細胞癌の早期診断に有用である可能性が示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ohashi T, Ishikawa T, Okumura A, Furuta K, Kurokawa T, Sato K, Ayada M, Hotta N, Nonami T, Kakumu S. Changes in hepatic gene expression profiles from chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection. (submitted)

2. 学会発表

1) 大橋知彦, 松本英司, 石川哲也, 他. C型慢性肝炎から肝細胞癌の発生の過程で発現量が変化する肝内遺伝子群の検討.

第10日本肝臓学会大会(札幌) 2006.10.12.

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。

分担研究報告書

肝癌患者の治療前後における各種癌抗原に対する細胞性免疫応答の研究

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

肝癌における細胞障害性 T 細胞の癌特異的抗原エピトープを同定し、将来的な肝癌免疫治療の開発に応用する目的で、MAGE 抗原, Glypican-3 抗原, NY-ESO-1 抗原ペプチドを用いて、末梢リンパ球の各ペプチドに対する免疫応答を、肝癌の治療前後で ELISpot 法により測定した。各ペプチドに対し治療前には 10 例中 5 例が、治療後にも 10 例中 5 例が陽性の応答を示した。また、肝癌の治療後には 2 例で免疫応答が増加し、3 例では一部増加一部減少し、2 例では応答が低下する傾向がみられた。血小板低値例では治療後に癌特異的細胞障害性 T 細胞の応答が減少する傾向がみられた。

A. 研究目的

どにより決定されるが、肝予備能を低下

肝癌の治療は、癌の進展度や肝予備能な

させることなく肝癌を効果的に縮小する

ことができる治療法の開発が望まれる。

肝癌における免疫療法は、その点で注目されている新規治療法の一つである。

MAGE 抗原, Glypican-3 抗原, NY-ESO-1 抗原はいずれも癌特異抗原として知られており、肝癌においてもそれぞれ約 70%, 70%, 30%の症例で発現がみられるとの報告がある。今回我々は、肝癌患者において、癌抗原ペプチドに対する細胞障害性 T 細胞応答を肝癌治療前後で比較検討するため、肝癌患者末梢リンパ球の癌抗原ペプチドに対する免疫応答を ELISpot 法で測定した。

B. 研究方法

MAGE-1 抗原、Glypican-3 抗原、NY-ESO-1 抗原、それぞれの全長を網羅し、10 アミノ

ノ酸ずつオーバーラップする 20 アミノ酸のペプチドを各 30、57、17 種類作成した。肝癌患者 15 例について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 1 μ 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)

「研究への協力をお願い」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、試料の使用方法、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た。

C. 研究結果

各ペプチドに対し治療前には 10 例中 5

例が、治療後にも 10 例中 5 例が陽性の応答を示した。また、肝癌の治療後には 2 例で免疫応答が増加し、3 例では一部増加一部減少し、2 例では応答が低下する傾向がみられた。また、血小板低値例では治療後に癌特異的細胞障害性 T 細胞の応答が減少する傾向がみられた。

D. 考察

従来の肝癌治療により肝癌組織が壊死またはアポトーシスに陥ると、局所には癌抗原が多く放出され、それにより免疫応答が賦活される可能性がある。その際に、樹状細胞やサイトカインなどを投与し免疫応答を賦活させると、さらに強い抗腫瘍免疫応答が惹起される可能性が考えられる。血小板低下例では、肝機能が低下

し免疫応答も減弱している可能性が考えられ、免疫治療の効果も低いことが示唆された。

E. 結論

肝癌患者において、治療により癌抗原に対して細胞障害性 T 細胞応答が増加する症例もあり、そのような症例に対し従来の肝癌治療の後に免疫療法を加えることによりさらなる効果が期待される。今後、さらに症例を追加し検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hiraide, A., Hiroishi, K., Ishii, S., Eguchi, J., Imawari, M. CpG oligo-deoxynucleotides and interferon-alpha-

expressing tumor cells effectively induce dendritic cell maturation in vitro. Anticancer Res 26 (1A): 211-218, 2006.

3. その他

なし

2) C 型肝炎ウイルス感染における免疫応答. 井廻道夫、広石和正、平出綾子. Frontiers in Gastroenterology 11(3): 196-208, 2006.

2. 学会発表

広石和正、平出綾子、井廻道夫. インターフェロン α と CpG にて成熟させた樹状細胞による消化器癌治療. 第 48 回日本消化器病学会大会 (札幌 2006.10.12)

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

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

慢性肝疾患における免疫抑制機能分子 soluble MICA/B の解析

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: Soluble MICA は NK 細胞の NKG2D 活性化レセプターの発現低下をひきおこす機能分子である。前年度までの研究により、進行した肝がん患者血清中に同分子が検出されることが明らかとなった。本年度はその臨床的意義を解明するために多数例の患者血清を用いて、soluble MICA およびその近縁分子である soluble MICB の測定を行った。Soluble MICA/B は慢性肝疾患の進行および肝がんの発生に伴い上昇した。組織学的検索が行われた症例で検討すると soluble MICA/B は線維化ステージの進行に伴い上昇した。さらに、肝硬変・肝がん群で検討すると、soluble MICA/B の上昇に寄与する独立した因子は Child-Pugh スコアと肝がんの有無であった。また、soluble MICA/B が高い肝がん症例の予後は有意に不良であった。以上の結果より、soluble MICA/B は線維化と発がんに伴い上昇する機能分子であり、肝がん患者の予後に密接に関連する因子であることが明らかとなった。

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) 細胞の機能は多様な抑制性レセプターと活性化レセプターからのシグナルのバランスにより規定されている。活性化レセプターのなかで NKG2D (natural killer group 2 D) は最も高頻度に発現するレセプターであり、我々は肝がん細胞に対する反応性を規定するレセプターであることを明らかにした。NKG2D のリガンドは MHC class I-related chain molecules (MIC) であり A と B が存在す

ることが知られている。MICA/B は消化管上皮細胞や一部の胸腺細胞を除いては正常細胞には発現しておらず、ストレスを受けた細胞やトランスフォームした上皮細胞でのみ発現が誘導される。肝がんにおいても高頻度に MICA/B の発現がみられることが我々の研究により明らかになっている。

近年、MICA/B は酵素的な切断をうけて培養液中に分泌されること、また、ある種の肝がん患者の血清中に検出されることが報告されている。我々は前年度において、soluble MICA/B (sMICA/B) が肝がん患者の血清中に検出されることを報告し、この分子が NK 細胞の NKG2D 発現を低下させ

ることにより、肝がんに対する NK 細胞の反応性を抑制させる可能性を示唆した。本年度は sMICA/B の臨床的意義を検討するために多数例の患者血清を用いた検討を行った。

B. 研究方法

sMICA および sMICB は ELISA 法により測定した。健常者 104 例、慢性肝炎患者 141 例、肝硬変患者 104 例、肝がん患者 232 例の保存血清を解析に用いた。

C. 研究成果

sMICA、sMICB とともに健常者に比し、慢性肝炎患者で有意に高値であり、さらに肝硬変患者では慢性肝炎より高値、肝がん患者では肝硬変患者より高値であった。肝生検が行われていた 98 例のサンプル用いて検討すると、sMICA、sMICB とともに線維化ステージの進行に伴いその血清濃度が上昇した。肝硬変・肝がん患者のサンプルを用いて多変量解析を行うと、Child-Pugh スコアと肝がんの有無が sMICA および sMICB の濃度に寄与する因子であった。なお、血清 sMICA と sMICB の間には有意な相関はみられなかった。以上のことより、sMICA と sMICB は肝臓の線維化と発がんに関連して上昇する血清マーカーであることが示された。sMICA と sMICB のカットオフ値をそれぞれ 550 pg/mL、850 pg/m として患者の生存との関係を解析すると、sMICA あるいは sMICB が高値の患者は有意にその予後が不良であった。

D. 考察と結論

sMICA およびその近縁分子である

sMICB は NK 細胞の NKG2D 発現を低下させる機能分子である。今回の研究により肝疾患では、線維化の進行に伴い前がん病態においても sMICA/B が上昇していることが明らかとなった。このことは慢性肝疾患からの高率な発がんのひとつのメカニズムになっている可能性があると考えられた。また、sMICA/B は肝がんの進展と背景肝疾患の進行に伴い上昇する血清マーカーであり、肝がん患者の予後を推定する上で有用なマーカーとなることが示唆された。

E. 研究発表

論文発表

1. Inoue M, Kanto T, Miyatake H, Itose I, Miyazaki M, Yakushijin T, Sakakibara M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Enhanced ability of peripheral invariant natural killer T cells to produce IL-13 in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 45: 190-196, 2006.
2. Hiramatsu N, Oze T, Tsuda N, Kurashige N, Koga K, Toyama T, Yasumaru M, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Kato M, Yoshihara H, Katayama K, Hijioka T, Hagiwara H, Kubota S, Oshita M, Haruna Y, Mita E, Suzuki K, Ishibashi K, Hayashi N. Should aged patients with chronic hepatitis C be treated with interferon and ribavirin combination therapy? *Hepatol Res* 35: 185-189, 2006.
3. Hosui A, Takehara T, Ohkawa K, Kanazawa Y, Tatsumi T, Yamaguchi

- S, Sakamori R, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. Suppressive effect on hepatocyte differentiation of hepatitis C virus core protein. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 1125-1130, 2006.
4. Takehara T, Uemura A, Tatsumi T, Suzuki T, Kimura R, Shiotani A, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Natural killer cell-mediated ablation of metastatic liver tumors by hydrodynamic injection of IFN α gene to mice. *Int J Cancer* 120: 1252-1260, 2007
 5. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Yamaguchi S, Sakamori R, Hiramatsu N, Kanto T, Ohkawa K, Hayashi N. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4⁺ CD25⁺ T cells with PD-1-dependent regulatory activities. *Immunology* 120: 73-82, 2007.
 6. Oze T, Hiramatsu N, Kurashige N, Tsuda N, Yakushijin T, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Kato M, Yoshihara H, Katayaka K, Kubota S, Hijioka T, Ishibashi K, Oshita M, Hagiwara H, Haruna Y, Mita E, Tamura S, Hayashi N. Early decline of hemoglobin correlates with progression of ribavirin-induced hemolytic anemia during interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 41: 862-872, 2006.
 7. Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Sakamori R, Ohkawa K, Kohga K, Uemura A, Hayashi N. Intrahepatic delivery of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor. *Hepatology* 45: 22-30, 2007.
 8. Miyatake H, Kanto T, Inoue M, Sakakibara M, Kaimori A, Yakushijin T, Itose I, Miyazaki M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* (in press)
 9. Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Miyagi T, Jinushi M, Sakamori R, Kohga K, Uemura A, Ohkawa K, Storkus WJ, Hayashi N. Injection of IL-12 gene-transduced dendritic cells into mouse liver tumor lesions activates both innate and acquired immunity. *Gene Ther* (in press)

学会発表

The American Association for the Study of Liver Diseases

57th Annual Meeting AASLD

October 27-31, 2006, Boston

- Hydrodynamic injection of IFN α gene completely rejected metastatic liver tumors via NK cell activation. Uemura A, Takehara T, Sasakawa A, Kohga K, Sakamori R, Yamaguchi S, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T,

Hiramatsu N, Hayashi N.

- Administration of α -GalCer activates liver dendritic cells and acquired immunity against liver tumor. Sasakawa A, Takehara T, Tatsumi T, Yamaguchi S, Fujita Y, Sugiyama T, Sakamori R, Uemura A, Kohga K, Ohkawa K, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N.
- Soluble MHC class I chain-related molecules A and B (sMICA/B) increase in sera of patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Kohga K, Takehara T, Sasakawa A, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Kato M, Hayashi N.
- Intratumoral delivery of α -GalCer pulsed dendritic cells into mouse liver tumor activates innate and acquired immunity and effectively suppresses local and distant tumor growth. Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Sakamori R, Uemura A, Kohga K, Fujita Y, Ohkawa K, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N.
- Efficacy of immunotherapy with the receptor tyrosine kinase EphA2 derived peptides-pulsed dendritic cells in mouse liver tumor. Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Fujita Y, Sakamori R, Uemura A, Kohga K, Ohkawa K, Hiramatsu N, Kanto T, Walter S, Hayashi N.
- Decreased expression of CD1d molecules on liver dendritic cells from mice bearing large subcutaneous tumor was responsible for the impairment of anti-tumor effect of α -galactosylceramid against tumor. Fujita Y, Takehara T, Tatsumi T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Sakamori R, Uemura A, Kohga K, Ohkawa K, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N.
- Hepatic STAT3 attenuates hyper-acute inflammatory response and mortality in a murine model of septic shock. Sakamori R, Takehara T, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Yamaguchi S, Tatsumi T, Ohkawa K, Hayashi N.
- Emerging manner of drug resistant mutant hepatitis B virus: relation to the presence of precore defective (1896A) mutant. Ohkawa K, Takehara T, Kato M, Tatsumi T, Sakamori R, Yamaguchi S, Uemura A, Kohga K, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N.
- Hepatitis B virus genomic alteration causing restoration of relaxed circular viral DNA synthesis and lethal disease deterioration. Ohkawa K, Takehara T, Tatsumi T, Sakamori R, Yamaguchi S, Uemura A, Kohga K, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N.

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および肝細胞がん組織を対象にDNAチップおよびSAGE法を用いて発現遺伝子プロファイルを包括的に解析した。B型およびC型慢性肝炎における分子経路の違いを明らかにするとともに、血管新生といったがんの特徴的な形質変化をきたす分子経路も、両者で異なることを示した。また、これまでに知られていない肝細胞がん共通の分子経路としてSREBP1を中心とする脂質代謝系の異常を明らかにした。この分子および経路を標的とした診断および治療法の開発が期待された。

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)。また、HBV および HCV が感染した肝細胞に対する浸潤リンパ球をレーザーマイクロダイセクションを用いることによって、両者の反応を解析し、両肝炎における分子病態の違いを明らかにした。本年度は、がんの特徴的な形質である血管新生にいたる経路の違いを解析するとともに、他のがんにおいて示されていない肝細胞がん共通の経路を明らかにした。これによって、分子および分子経路を標的とした医療の開発を目指した。

B. 研究方法

HBs 抗原陽性および HCV 抗体陽性慢性肝炎肝組織を対象としサンプルから 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 チップ解析を行った。一部のサンプルにおいてはレーザーマイクロダイセクションを行い、浸潤リンパ球および肝細胞を選択に採取し解析した。また、肝細胞がん組織および非がん部を対象に serial analysis of gene expression (SAGE) ライブラリーを作成し、得られたライブラリーにおける発現遺伝子を解析した。得られたジェノミクス情報をもとに各種の統計処理を行い、変動している分子および分子経路の抽出を行った。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

昨年度の研究において明らかにした B 型および C 型慢性肝炎において異なっている分子、分子経路および転写因子の解析情報、さらに包括的な発現遺伝子情報を解析したところ、B 型および C 型慢性肝炎において種々のがん関連分子経路が活性化されていることが明らかとなった。

包括的には B 型と C 型でがん関連分子の変動が大きく異なっているものの、がん化に関連する重要な分子および最終に形質表現とかかわる重要な分子は共通に利用されていた。

がん化の重要な形質のひとつである血管新生因子である VEGF は両慢性肝炎において共通に発現していた。そこで、血管新生にかかわる分子および分子経路を解析したところ、B 型では AP1、c-fos、STAT3、p53 を介して上流の分子に向かい最終的に VEGF が活性化されていることが明らかとなった。C 型では NF- κ B を介して、細胞外の IL-8、18、IP-10 等を介して最終的に VEGF が活性化されていることが示された。

11 個の B 型、C 型、および非 B 非 C 型関連の肝細胞がんよりなる SAGE ライブラリーの解析から、非がん部に比して 10 倍以上で、かつ統計的に有意 (<0.05) に亢進している分子を選択した。既知であり単一の遺伝子として明らかにされている分子は 20 種であった。多くは細胞増殖に関連する分子であったが、fatty acid desaturase、steroyl-CoA desaturase といった脂質代謝に関連する分子が抽出され、肝

細胞がんにおいて脂質代謝系が有意に亢進していることが明らかとなった。この上流に位置する可能性のある分子として SREBP1 が知られているが、検討した 20 の肝細胞がん組織において SREBP1 はこれらの分子と同様に挙動しており、さらに SREBP1 の発現量と肝細胞がん患者の予後は独立した危険因子であった。

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、発がんにいたる分子経路が異なることを明らかにした。

また、従来から肝細胞がんには脂肪化が見られること、肥満と肝細胞がんの死亡率との間に高い相関がみられること、脂肪化を有する前癌病変が高率にがん化することから、細胞の脂肪化とがん化との関連が注目されていた。今回の結果は、これを分子学的に裏付けるものであった。

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、B 型および C 型の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、それぞれに対するストラテジー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分子および分子経路の一部が示された。

E. 結論

B型およびC型慢性肝炎から発がんにいたる分子経路の違いと共通性、さらには診断および治療の標的とする分子を明らかにした。

F. 研究発表

1. M Honda, T Yamashita, T Ueda, H T, R Nishino, and SKaneko. Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. Hepatology 44(5):1122-1138, 2006.
2. E Mizukoshi, Y Nakamoto, Y Marukawa, K Arai, T Yamashita, H Tsuji, K Kuzushima, M Takiguchi, and S Kaneko. Cytotoxic T cell responses to human telomerase reverse transcriptase in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatology 43(6):1284-1294, 2006.
3. T Shimakami, M Honda, T Kusakawa, T Murata, K Shimotohno, S Kaneko, and S Murakami. Effect of hepatitis C virus (HCV)

NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. J Virol 80(7):3332-3340, 2006.

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 IGFBP5 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：癌遺伝子 Gankyrin は免疫組織化学的検討で TNM stage I、II の肝癌症例で陽性率が高く、stage III、IV では陽性率が低下した。Gankyrin 陽性肝癌は陰性例に比して被膜浸潤、門脈浸潤、肝内転移を伴うことが少なかった。Membrane array を用いた検討では、肝癌以外に乳癌、消化管癌、肺癌でも Gankyrin の mRNA が高発現していた。U2OS 細胞で Gankyrin を過剰発現させ mRNA を microarray で検討すると insulin like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) の mRNA が高発現していた。免疫組織化学的検討でも IGFBP5 は肝癌細胞で強く発現していた。43 例の肝癌組織で Gankyrin と IGFBP5 の発現を検討すると、Gankyrin 陽性肝癌の半数以上で IGFBP5 が陽性であったが、Gankyrin 陰性肝癌では IGFBP5 もほとんど陰性であった。1) Gankyrin は初期の肝癌で高発現した。2) Gankyrin は IGFBP5 の発現を亢進し肝癌の進展に関わる可能性が示唆された。

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、中島知明

教授 岡上 武

京都大学医学研究科分子病診療学教室

現させることで癌化を誘発することが可能であることを明らかにした (Nat Med 6:96 '00、J Biol Chem 278:10668 '03)。さらに、Gankyrin の癌遺伝子としての作用機序には RB 蛋白のリン酸化や MDM2 との結合を介した wild type p53 の不活化が重要であると報告している (Cancer Cell 8:75 '05)。

われわれは昨年度までの検討で、肝癌細胞株 HuH7 においては Gankyrin の発現抑制が肝癌細胞のアポトーシスを誘導することを示し、Gankyrin が肝癌細胞の生存に必須であることを示

A. 研究目的

1. われわれの共同研究者である藤田らは Gankyrin を肝細胞癌 (HCC) より単離し、Gankyrin の mRNA が HCC で過剰発現していることを初めて報告した。また、Gankyrin を線維芽細胞に過剰発