

- 12) K Koike. Metabolic Aspects of HCV-Associated HCC. International Symposium on Energy Metabolism and Oxidative Stress in Liver Pathophysiology. Tokyo, 2005.
- 13) Koike K. Molecular Basis of HCV-associated hepatocarcinogenesis: Lessons from Animal Model Studies. 2nd AGA-JSGE Joint Meeting "Hepatitis C: Clinic-Basic Interface" Tokyo, 2005.
- 14) Koike K. HCV-associated hepatocarcinogenesis. 5th Sino-Japan Hepato- Pancreato- Biliary Simposium. Beijing, 2005.
- 15) Moriishi K, Moriya K, Miyamoto H, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y: Critical role of PA28gamma-in hepatitis C virus-associated steatosis and hepatocarcinogenesis. p130, 13th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Cairns, 2006.
- 16) Moriya K, Shinzawa S, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K: Iron-reactive overexpression of anti-oxidative hemeperoxygenase-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.
- 17) 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.
- 18) 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

厚生科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（総合）研究報告書
肝細胞癌の発症メカニズム解明および早期診断法確立のための研究
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 肝細胞癌の発症メカニズムの解明および早期診断法確立のため、種々の血清マーカーの動態および肝組織中遺伝子発現について検討した。肝硬変患者に比較し、肝癌患者血清において、細胞外マトリクス蛋白の一つである SHAP-HA は有意に増加、サイトカインのうち TNF- α は有意に減少していた。DNA マイクロアレイ解析を用いた肝内遺伝子発現パターンの検討では、発癌過程で発現量の増減する遺伝子群の存在が確認された。これらのさらに詳細な検討が、発癌メカニズムの解明、新たな早期診断法の確立に繋がる可能性が示された。

分担研究者：各務伸一 愛知医科大学・教授

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

肝細胞癌の発症メカニズムの解明、早期診断法の確立のために、発癌、病態に関わると考えられるサイトカイン、細胞外マトリクス関連蛋白の血清中の動態について検討した。また、担癌患者を含む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し、発癌に関わる遺伝子群の同定を試みた。

B. 研究方法

1. SHAP-HA (serum derived hyaluronan associated protein-hyaluronan complex) の血清レベルの検討

対象は B 型慢性肝疾患患者 127 例（慢性肝炎 (CH) : 47 例、肝硬変 (LC) : 47 例、肝細胞癌 (HCC)、C 型慢性肝疾患患者 278 例 (CH : 102 例、LC : 105 例、HCC : 71 例)。保存血清中の SHAP-HA、HA 濃度を ELISA 法にて測定した。

2. サイトカインの血清レベルの検討

対象は C 型慢性肝疾患患者 38 例 (LC : 25 例、HCC : 13 例)。HCC 群については、診断前、診断時、診断後の 3 ポイント (6~12 か月間隔)、LC 群については、それに相当する期間での 3 ポイントを設定し、保存血清中の、TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、IL-12 (p40+p70)、IL-12 p70 を ELISA 法にて測定した。

3. DNA マイクロアレイにおける検討

対象は C 型慢性肝炎患者 (C-CH) 14 例 (F1 : 4 例、F2 : 5 例、F3 : 5 例)。C 型慢性肝炎患者に HCC を合併した患者 7 例。C-CH 患者については肝生検組織より、HCC 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

1. SHAP-HA の血清レベルの検討

SHAP-HA は、B-CH : 29 \pm 18、B-LC : 60 \pm 56、B-HCC : 101 \pm 77 ng/ml、C-CH : 36 \pm 25、C-LC : 62 \pm 48、C-HCC : 110 \pm 89 ng/ml であり、それぞれ HCC 群において、CH 群、LC 群に比較し、有意に高値となった。HA においても同様の解析を行ったが、それぞれ、LC 群と HCC 群との間で有意な差は認めなかった。これより、SHAP-HA は HCC の特異的な診断マーカーとなり得ると考えられた。

2. サイトカインの血清レベルの検討

HCC 群における診断前後 3 ポイント (6~12 か月間隔) のサイトカインの動態からは、発癌を予測、反映するような変化は認めなかった。しかし、HCC 群と LC 群間の比較では、TNF- α は LC 群に比較し HCC 群において有意に低く (LC : 382 \pm 341、HCC : 155 \pm 151 pg/ml、 $p < 0.05$)、IL-1 β (LC : 67 \pm 267、HCC : 15 \pm 20 pg/ml) も同様の傾向を認めた。LC 群における 3 ポイント間でも、それぞれのサイトカインレベルに有意な変動はみられなかったが、TNF- α 、IL-1 β は、ともに最後のポイントで低値をとる傾向がみられた。これらより、TNF- α 、IL-1 β は、発癌予測のマーカーとなり得る可能性が考えられた。

3. DNA マイクロアレイにおける検討

解析した 21073 遺伝子中、582 遺伝子が有意な変動を示した。CH 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)、HCC 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。CH 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。CH・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。CH 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、CH・癌部組織で発現が低く、非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、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

発癌に至る過程、あるいは担癌状態での免疫環境の変化、細胞外マトリクスの異常などは、種々の報告があることより、サイトカイン、細胞外マトリクス関連蛋白は癌の早期診断のマーカーとなり得ると考えられる。当該研究でも、肝細胞癌において、SHAP-HA、TNF- α などが、前癌状態 (慢性肝炎、肝硬変) から連続的に測定することによって、癌の早期診断に有用なマーカーとなる可能性があることが示された。ただし、既存の腫瘍マーカーとの有用性の比較、発癌予測のポイントをどこにおくかなどの問題点もあり、今後の検討が必要である。C 型慢性肝疾患患者における DNA マイクロアレイ解析からは、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、発癌のメカニズムの解明に繋げることができると考えられる。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、さらに新しい発癌の早期診断のマーカーの確立や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ている。

E. 結論

サイトカイン、細胞外マトリクス関連蛋白の測定が

肝細胞癌の早期診断に有用である可能性が示された。また、慢性肝疾患患者肝組織中の遺伝子発現の解析が発癌機構の解明、肝細胞癌の早期診断に応用でき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) Okumura A, Ishikawa T, Maeno T, Sato K, Ayada M, Hotta, Yamauchi T, Fukuzawa Y, Kakumu S. Changes in natural killer T cell subsets during therapy in type C hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 32: 213-217.

2) Shen L, Zhuo L, Okumura A, et al. The SHAP-hyaluronan complex in serum from patients with chronic liver diseases caused by hepatitis virus infection. *Hepatology* 2006; 34: 178-186.

3) Ayada M, Ishikawa T, Okumura A, et al. Alteration of serum cytokine balances among different phases of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; 34: 214-221.

4) 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。

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）

（総合）研究報告書

肝癌患者の各種癌抗原に対する細胞性免疫応答の研究

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

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 ELISpot 法により測定した。肝癌特異的細胞障害性 T 細胞の frequency は低いものの、MAGE-1 抗原で 15 例中 4 例、Glypican-3 で抗原 7 例中 4 例、NY-ESO-1 抗原では 3 例中 3 例で免疫応答がみられた。また、肝癌の治療前後で各癌抗原ペプチドに対する免疫応答を比較検討したところ、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。

分担研究者 井廻 道夫

昭和大学医学部第二内科 教授

A. 研究目的

肝癌の治療は、癌の進展度や肝予備能などにより決定されるが、肝予備能を低下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

MAGE-1 抗原で 15 例中 4 例、Glypican-3 で抗原 7 例中 4 例、NY-ESO-1 抗原では 3 例中 3 例で各ペプチドの刺激に対して IFN- γ 産生が認められた。また、混合した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。肝癌の治療後には 2 例で癌抗原ペプチドに対する免疫応答が増加し、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 of 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. 研究発表

1. 論文発表

1) Ishii S, Hiroishi K, Eguchi J, Hiraide A, Imawari M. Dendritic cell therapy with interferon-alpha synergistically suppresses outgrowth of established tumors in a murine colorectal cancer model. *Gene Therapy* 13 (1): 78-87, 2006.

2) C 型肝炎の発症機序と HCV 持続感染. 広石和正、渡邊豪紀、井廻道夫. *総合臨床* 54 (3): 503-511, 2005

3) 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.

4) 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

1) 広石和正、袴田拓、井廻道夫. C 型肝炎における CTL 応答. 第 41 回日本肝臓学会総会シンポジウム *Liver Immunology 最前線*. (大阪 2005.6.16)

2) 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)

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

厚生労働省科学研究費（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（総合）研究報告書

C型肝炎・肝がんにおけるNK細胞レセプターを介した免疫制御

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：肝がん細胞は細胞膜上に MICA/B を発現しており、これにより NK 細胞の NKG2D レセプターを介して NK 細胞を活性化する。一方、肝がん細胞は HLA-E の発現が維持されており、これにより NK 細胞の CD94/NKG2A レセプターが活性化され、逆に NK 細胞の機能は抑制される。C 型肝炎患者の NK 細胞は CD94/NKG2A 抑制レセプターの発現頻度が亢進しており、肝がん細胞に対する反応性が健常者に比較し低下していた。この NK 細胞の機能低下は肝がん細胞に対する直接的な傷害活性の低下だけではなく、*in vitro* において樹状細胞の成熟に対しても抑制的に働き、獲得免疫応答の形成にも負の影響を与えることが示唆された。MICA/B は酵素依存的に細胞膜上で切断を受け、一部の悪性腫瘍患者の血清中で高値になることが報告されている。慢性肝疾患においては肝臓の線維化に伴って、可溶性 MICA/B の濃度が血中で増加し、肝がんの発生と進展に伴いさらに上昇した。可溶性 MICA/B は NK 細胞膜上の NKG2D 活性化レセプターの発現を低下させたことから、慢性肝疾患あるいは肝がんの進展は NK 細胞の活性化シグナルの低下もひきおこすことが示唆された。C 型肝炎および進行した肝疾患・肝がんでは CD94/NKG2A の発現頻度の亢進や可溶性 MICA/B の上昇を介した NKG2D の発現低下がおり、肝がん細胞に対する認識機構が障害されていることが明らかとなった。

分担研究者：林 紀夫
大阪大学大学院医学系研究科・教授
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。NK レセプターのリガンドは細胞膜上に

発現している種々の MHC クラス I 関連分子である。細胞のがん化などの生体内に生じた異常は、細胞の MHC クラス I 発現の変化として反映されることから、NK レセプターは生体内に生じた自己細胞の異常を認識するための重要なシステムを形成していると考えられる。

肝がんでは NKG2D 活性化レセプターのリガンドである MICA/B が発現しており、これによる NKG2D の活性化が NK 細胞の

反応性を規定している。そこで本研究では C 型肝炎や肝がんの特徴的にみられる NK レセプターの発現パターンを明らかにし、その機能的意義を解析することにより、慢性肝疾患における NK レセプターによる免疫監視機構を俯瞰することを目的に研究を行った。

B. 研究方法

- NK レセプター発現の解析：FACS
- 血清 sMICA/B の測定：ELISA
- NK 細胞による細胞傷害活性：クロムリリース法
- 樹状細胞の機能評価：樹状細胞を NK 細胞と混合培養し、同種 T 細胞刺激能により解析
- ヒト肝組織 MICA/B の発現：免疫染色

C. 研究成果

1) C 型肝炎患者における CD94/NKG2A 抑制レセプターの発現とその機能的意義

C 型肝炎患者の末梢血 CD56 陽性細胞の 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 等の肝がん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。肝がん細胞株は K562 とは異なり NKG2A のリガンドである HLA-E を発現していた。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 細胞はこの樹状細胞および 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。

2) 慢性肝疾患における血清 sMICA/B の測定とその臨床的意義

細胞膜上の MICA/B は酵素的な切断を受け、一部の悪性腫瘍患者の血清中で検出されることが報告されている。慢性肝疾患における soluble MICA/B (sMICA/B) の意義を検討するために、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 例の保存血清を用いて、sMICA、sMICB の測定を行った。sMICA と sMICB はともに慢性肝炎患者では健常者に比し有意に高値であり、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 例のサンプルを用いて検討すると、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 の濃度に寄与する独立した因子であった。なお、血清 sMICA と sMICB の間には有意な相関はみられなかった。ヒト肝がんおよび肝硬変組織を用いて sMICA/B の免疫染色を行うと、sMICA/B は肝がんのみならず肝硬変組織でも発現がみられ、肝臓から sMICA/B が分泌

されていることが示唆された。

3) sMICA/B の機能的意義

肝がん患者のなかで sMICA が高値であった患者と低値であった患者の CD56 陽性細胞における NKG2D の発現を FACS 解析すると、sMICA 低値の肝がん患者の NKG2D の発現レベルは健常者と同程度であったが、sMICA 高値の肝がん患者ではその発現が低下していた。

そこで、sMICA が NKG2D の発現低下に関与しているのかどうかをみるために、*in vitro* の検討を行った。健常者の CD56 陽性細胞を 10% の患者血清で 48 時間処理し、その後の NKG2D の発現を検討すると、sMICA 高値の HCC 患者血清で処理することにより NKG2D の発現が有意に低下した。患者血清中の sMICA が NKG2D の低下に関与しているかどうかを検討するために、血清処理時に MICA の $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ドメインを認識する抗体を添加し NKG2D の発現を解析した。MICA 中和抗体の添加により血清処理による NKG2D の低下が解除されたことから、患者血清中の sMICA が NKG2D の発現低下に関与していることが示された。さらに、クロムリリースアッセイにより sMICA 高値患者の CD56 陽性細胞は低値患者のそれに比し、Hep3B 肝がん細胞に対して NKG2D 依存性の傷害活性が減弱していた。

最後に sMICA が NK 細胞による肝がん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。健常者の NK 細胞を sMICA 高値血清あるいは低値血清で 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、CD86 の発現レベルを検討した。sMICA 低値血清

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、sMICA 高値血清で刺激した NK の場合はこの成熟活性が減弱していた。

D. 考察と結論

肝がん細胞に対する NK 細胞の反応性は CD94/NKG2A からの抑制シグナルと NKG2D からの活性化シグナルのバランスにより規定されている。C 型肝炎患者では CD94/NKG2A の発現頻度が増加することにより、NK 細胞の肝がん細胞に対する反応性が抑制されていた。また、肝硬変・肝がんでは sMICA/B の血清レベルが増加し、これにより NKG2D の発現レベルが低下すると考えられた。

以上のことは肝がんに対する生体の認識機構は C 型肝炎ウイルスの感染や肝疾患の進展に伴う NK レセプターの発現変化により減弱していることを示している。C 型肝炎や進行した肝疾患からの高率な発がんにはこのような免疫学的な要因が関与していることが推察される。

MICA/B はいくつかの抗がん剤により発現誘導がおこることや、NKG2D の発現は IL-15 により増強することが報告されている。NK レセプターを介した肝がんに対する認識機構に関する研究は今後肝がんに対する抗癌剤やサイトカインによる併用治療を開発していく上で示唆に富むものである。

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. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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-doseprostanoid and interferon- α as potent immune enhancers. *J Immunother* **29**: 67-77, 2006.
 9. 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.
 10. 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.
11. 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.
12. 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
13. 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.
14. 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.
15. 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)*
16. 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)*
- 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）
（総合）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

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 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、肝細胞がん組織を対象にDNAチップとSAGE法を用いてジェノミクス情報を解析し、両肝炎および発がんの病態の違いを明らかにするとともに診断・治療の標的となる分子・分子経路を明らかにした。B型およびC型慢性肝炎においては、それぞれ異なる分子が変動しており、がん化に向かう経路も両者において異なっていた。他の臓器における炎症およびがん化に共通して見られる分子・分子経路が肝臓においても同様に変動していたが、これらの経路を変動させる分子はB型およびC型慢性肝炎において包括的に異なっていた。他の臓器のがん化の経路として示されていない経路として、肝細胞がんにおいては脂質代謝経路の亢進が示された。

分担研究者 金子 周一
金沢大学大学院医学系研究科教授

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、最終的に発がんがみられる。この病態を分子レベルで解析するために、試験管内、培養細胞、あるいは実験動物を用いた解析が行われている。しかし、膨大な研究にもかかわらず、多種多様な解析結果、また、時には相反する結果が得られ、ヒトにおいて生じている分子病態が何であるか、どれが診断や治療の標的とすべき重要な分子や分子経路であるかを明らかにすることは容易でない。

そこで、ヒトにおける分子病態をバ

イアスなしで数理的に明らかにするために、本研究では最新のジェノミクス技術を導入して、包括的に、どの分子および分子経路が臨床的に重要であるかを明らかにし、病態を解明することを目的とした。さらには、診断および治療の標的とすべき重要な分子および分子経路の解析を目的とした。

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、肝細胞がん組織、非がん部組織を対象とした。組織の全体を解析に使用するだけでなく、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て解析した。

DNA チップは約 1 万の選択された肝臓解析用遺伝子を搭載した自家製チップを使用した。包括的な 5' 末 mRNA の解析には 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

約 1 万の肝臓発現遺伝子を搭載した DNA チップを用いた解析においても 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进行分类する唯一の有意な判別因子となり ($p < 0.001$)、炎症およびがん化の際に変動する遺伝子を搭載した DNA チップを用いた我々の前回の解析結果 (Gastroenterology 2001) と同様であった。

マイクロダイセクションによって得られた浸潤リンパ球および肝細胞の解析から、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- κ B, IRF-1, STAT-1 の系が有意に変動していた。

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。

C 型肝炎ウイルスの増殖が細胞回転にあわせて亢進することを報告した (Gastroenterology 2000) が、この細胞回転が亢進する際に発現が上昇し、HCV-IRES 活性を亢進させる宿主蛋白の重要なひとつが La 蛋白であるこ

とを同定した。

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。

また、HCV の複製機構そのものも宿主蛋白の影響をうけ、肝炎状態において、HCV の複製が活発になる根拠のひとつが示された。この結果は、感染モデルのない肝炎ウイルス感染において、ヒト体内におけるウイルスの生活環を明らかにした結果であった。

変動している分子・分子経路は両肝炎において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る機序について解析した。血管新生といった臨床および病理所見をきたす重要な分子として VEGF が知られている。この分子はがん化において共通に認められる重要な分子であるが、両肝炎においても共通して発現が亢進していた。本研究によって、この分子の発現を亢進させる分子経路が両肝炎によって明確に異なることが示された。このように、臨床材料を包括的に分子レベルで解析することによって、従来から種々の研究によって示されてきた分子経路の重みづけが可能であった。また、ヒトにおいて実際に変動している分子が何であるか、その違いをきたす共通の分子が何であり、異なる

分子が何であるかが明らかにされた。こうした研究の意義は大きいことが示された。

従来から肝細胞がんが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分子と異なる分子を分け、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. T Yamashita, M Honda, H Takatori, R Nishino, N Hoshino, and S Kaneko. Genome-wide transcriptome mapping analysis identifies organ-specific gene expression patterns along human chromosomes. Genomics 84(5):867-75, 2004.
2. Y Nakamoto, T Suda, T Momoi and S Kaneko. Different procarcinogenic potentials of lymphocyte subsets in a transgenic mouse model of chronic hepatitis B. Cancer Res 64(9):3326-3333, 2004.
3. 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.
4. A Daiba, N Inaba, S Ando, N Kajiyama, H Yatsuhashi, 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.
5. 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

- Hepatology 3(12):1253-9, 2005.
6. 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.
 7. 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.
 8. 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 α -Fetoprotein-Producing Hepatocellular Carcinoma. Gut 54(6):843-51, 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.
 10. M Honda, T Yamashita, T Ueda, H T, R Nishino, and S Kaneko. Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. Hepatology 44(5):1122-1138, 2006.
 11. 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.
 12. 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

Gankyrin と DP1/B-MYB のヒト肝臓癌における検討

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：肝細胞癌(HCC)より単離された癌遺伝子 Gankyrin に対する siRNA を発現するレトロウイルス・ベクターでサイレンシングを行うと肝癌細胞株にアポトーシスが惹起された。Gankyrin は免疫組織化学的検討で早期の肝癌症例で陽性率が高く、進行例では陽性率が低下した。Gankyrin 陽性肝癌は陰性肝癌に比して被膜浸潤、門脈浸潤、肝内転移が少なかった。Membrane array を用いた検討では肝癌以外の多くの癌で Gankyrin の mRNA が高発現していた。Gankyrin を過剰発現させ microarray で mRNA の変化を検討すると insulin like growth factor binding protein 5(IGFBP5)の mRNA が高発現していた。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。

DP1 遺伝子(TFDP1)は HCC において遺伝子増幅しており、TFDP1 の発現量は腫瘍径増大と有意に相関し、TFDP1 の発現を抑制すると肝癌細胞株の増殖が抑制された。DP1 は E2F ファミリーと heterodimer を形成し、細胞周期の進行に必要な遺伝子群を活性化する。B-MYB 遺伝子(MYBL2)は転写因子 E2F1/DP1 の下流遺伝子として HCC で活性化を受けており、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) を活性化した。1) 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考えられた。

分担研究者 伊藤義人

教授 岡上 武

京都府立医科大学大学院医学研究科

京都大学医学研究科分子病診療学教室

消化器病態制御学 講師

A. 研究目的

共同研究者

1. われわれの共同研究者である

京都府立医科大学大学院医学研究科

藤田らは Gankyrin を肝細胞癌

消化器病態制御学

(HCC)より単離し、Gankyrin の

助手 安居幸一郎

mRNA が HCC で過剰発現している

大学院生 榎村敦詩、中島知明

ことを初めて報告した。また、

Gankyrin を線維芽細胞に過剰発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)。

近年の分子生物学的手法の導入により、発癌を遺伝子の異常な発現と理解することが可能となり、異常な遺伝子を標的とした分子標的療法が提唱されている。この分子標的療法の標的分子の候補は、(1)癌で特異的に発現し、(2)機能を修飾されることで癌細胞の死滅をきたす分子であることが肝要であると考えられる。以上のことは、Gankyrin が分子標的療法の標的分子として有力な候補であることを示唆している。

われわれは今回の検討で(1) Gankyrin が肝癌の増殖を促進する新たな機序について検討するとともに、(2)肝癌における Gankyrin の発現がどのような臨床的パラメーターと関連するかを検討した。

2. CGH (comparative genomic hybridization) 法は、複雑な染色体異

常を呈する固形腫瘍でも、全染色体を鳥瞰して、染色体の特定領域の欠失あるいは増幅を検出できる。とりわけ、遺伝子増幅領域の検出に優れている。

現在、分子標的治療薬として臨床応用されている乳癌治療の抗 ERBB2 抗体(Herceptin)や肺癌治療の EGRF チロシンキナーゼ阻害薬(Iressa)の標的である ERBB2 や EGRF は、いずれも遺伝子増幅によって活性化を受けることが知られている。よって、閾値を越えた活性化を導く変異である遺伝子増幅の標的を同定することは、癌発生の分子機構の解明に寄与するだけでなく、癌細胞を選択的に傷害する分子標的治療薬の開発という側面からも重要である。

われわれは今回の検討で、HCC の病態解明と治療標的分子の検索を目的に、HCC に生じた DP1 遺伝子の下流の遺伝子に関して検討した。

B. 研究方法

1. Gankyrin に対する特異的 siRNA の塩基配列を検討し、Gankyrin の siRNA (siGankyrin) を産生するレトロウイルスベクターを作成した。ヒト肝癌細胞株にこのベクターを感染させ、siGankyrin のヒト肝癌細胞株の細胞周期やアポトーシスに与える影響を in vitro の実験系で検討した。