

Recombinant human gankyrin に対するマウスのモノクローナル抗体を作成し、Western blotting や ELISA で検定を行った。

肝癌組織における Gankyrin の免疫組織化学的検討は HCC 臨床検体 43 例を用いて以下のように行った。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。insulin like growth factor binding protein 5 (IGFBP5) の肝癌組織における発現も同様の方法で検討した。

生体肝移植レシピエントの摘出肝（肝不全 2 例、肝癌 3 例、自己免疫性肝炎 1 例、原発性胆汁性肝硬変 1 例）を用いて Western blotting を行い、肝組織における Gankyrin の発現量を検討した。

241 例のヒト癌組織（乳癌、大腸癌、胃癌、肺癌など）より抽出した RNA より作成した cDNA を用い、市販の membrane array で Gankyrin の mRNA 発現を非癌部のものと比較検討した。

ヒト osteosarcoma の cell line である U2OS 細胞で Gankyrin を過剰

発現させ RNA を抽出し cDNA を作成、3 万個のヒト遺伝子を搭載した市販の microarray で増幅した mRNA を検討した。また、その結果を Western blotting で確認した。今回の検討では insulin like growth factor に関連した遺伝子発現の検索のみを提示する。

2. HCC に生じたゲノム異常を CGH 法で網羅的にスクリーニングし、新規の遺伝子増幅領域について、共通増幅の最小単位 (amplicon) を限局化し、amplicon 内の増幅標的遺伝子を同定した。それら標的遺伝子の増幅あるいは発現亢進の程度を、サザン・ノザン法や real-time RT-PCR 法で測定し、種々の臨床病理学的因子との相関を検討した。

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. siGankyrin を感染させた肝癌細胞株 HuH7 では、感染 4 日後にはコントロールの HuH7 細胞と比べて細

胞数が有意に減少した。siGankyrin に感染した細胞では、コントロールの HuH7 細胞に比べて細胞内の Gankyrin が有意に減少することが Western blotting で示された。フローサイトメトリーによる検討で siGankyrin を感染させた HuH7 細胞では、subG1 期の細胞が 4.5% から 28% に増加していた。さらに、Annexin V 染色で HuH7 細胞のアポトーシスを検討したところ、Annexin V 陽性細胞が 2.4% から 37% に増加していることが示された。

43 例の HCC 臨床検体を用いた免疫組織化学的検討では Gankyrin は癌部では非癌部に比べてその発現が亢進していた。また、Gankyrin は主に肝癌細胞の細胞質に強く発現しており、一部では核にも染色されていた。肝癌 43 例のうち Gankyrin は 27 例の細胞質に陽性であり、16 例では陰性であった。Gankyrin 陽性例は TNM 分類の stageⅠ、stageⅡに属する割合が陰性例に比べて有意に高く

($P=0.0106$)、陰性例に比し被膜浸潤 ($P=0.0468$)、門脈浸潤 ($P=0.0398$)、肝内転移 ($P=0.0236$) の頻度が低かった。IGFBP5 の免疫組織化学的検討では Gankyrin 同様、癌部では非癌部に比べてその発現が亢進していた。

肝移植レシピエント (肝不全 2 例、肝癌 3 例、自己免疫性肝炎 1 例、原発性胆汁性肝硬変 1 例) の摘出肝における Gankyrin の発現を Western blotting で検討した。肝不全 2 例における Gankyrin の発現は僅かであったが肝癌組織においては Gankyrin の発現が強かった。また、肝癌症例では癌部以外の非癌部でも Gankyrin の発現が強かった。

241 例のヒト癌組織より作成した市販の membrane array で行った Gankyrin mRNA の検討では乳癌、大腸癌、直腸癌、胃癌、膵癌、肺癌、甲状腺癌、前立腺癌など多くの癌の癌部でその発現が非癌部に比して亢進していた。

U2OS 細胞で Gankyrin を過剰発現させ 3 万個のヒト遺伝子を搭載した市販の microarray で増幅した mRNA を検討すると IGFBP5 の発現がコントロールに比して 5.28 倍亢進しており、今回検索した中で最も亢進していた。また、Western blotting でもその結果が確認された。

肝癌組織において Gankyrin は 43 例中 16 例で陰性であったが、そのうち IGFBP5 陽性例は 3 例のみであった。また、肝癌組織において gankyrin は 27 例で陽性であり、そのうち 15 例で

は IGFBP5 が陽性であった。

2. 第 13 番染色体長腕 13q34 領域に新たな遺伝子増幅を検出した。その標的遺伝子の 1 つは DP1 遺伝子(TFDP1)であった。TFDP1 の発現量は腫瘍径増大と有意に相関した。TFDP1 を発現亢進している肝癌細胞株で TFDP1 の発現をアンチセンス法で抑制すると、肝癌細胞株の増殖が抑制された。また、E2F1 と TFDP1 の発現量は 7 種類の下流遺伝子 (TYMS, DHFR, PCNA, RRM1, CCNE1, CDC2, MYBL2) の発現量と有意に相関した。

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、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. 肝癌細胞株において Gankyrin を抑制することによりアポトーシスが誘

導されることが明らかになった。今後、HCC において Gankyrin がどのようなメカニズムでアポトーシスの回避に関わっているかを検討する必要がある。

今回われわれは Gankyrin 陽性肝癌が TNM 分類の stage□、stage□、すなわち早期の肝癌に有意に多いことを明らかにした。また、Gankyrin が陰性の肝癌では被膜浸潤、門脈浸潤、肝内転移が多く臨床的に予後が悪いと考えられた。すなわち Gankyrin は予後良好な肝癌を含めた悪性腫瘍のマーカーとなる可能性があると考えられ、今後他の腫瘍マーカーとの関連性を検討することが望まれた。

2. 市販の microarray を用いた検討および Western blotting で Gankyrin は IGFBP5 の産生を亢進させることが明らかになった。IGFBP5 は癌の悪性転化に関わるとの報告もあり、Gankyrin は IGFBP5 の発現を亢進させ肝癌の進展に関わる可能性が示唆された。

3. 共同研究者の藤田らはヒトの肝癌組織において Gankyrin が過剰発現しており、Gankyrin が RB や p53 の不活化に関わることを明らかにしている。今回の検討で Gankyrin の肝癌

進展における新たなメカニズムが示唆された。

E. 結論

1. gankyrin は初期の肝癌で高発現していた。

2. gankyrin は IGFBP5 の発現を亢進させ肝癌の進展に関わる可能性が示唆された。

3. 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想定され、格好の治療標的分子候補と考えられた。

G. 研究発表

論文発表

- 1) Makiyama A, Itoh Y, Kasahara A, Imai Y, Kawata S, Yoshioka K, Tsubouchi H, Kiyosawa K, Kakumu S, Hayashi N, Okanoue T. Characteristics of patients with chronic hepatitis C who develop hepatocellular carcinoma after a sustained response to interferon therapy. *Cancer* 101(7), 1616-1622, 2004.
- 2) Minami M, Daimon Y, Mori K, Takashima H, Nakajima T, Itoh Y, Okanoue T. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic genetic change leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene*. 24 (27): 4340-8, 2005.
- 3) Okanoue 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) Nishikawa T, Nakajima T, Moriguchi M, Jo M, Sekoguchi S, Ishii M, Takashima H, Katagishi T, Kimura H, Minami M, Itoh Y, Kagawa K, Okanoue T. A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins. *J Hepatol* 44: 1074-1082, 2006.

5) Yamaguchi K, Itoh K, Masuda T, Umemura A, Baum C, Itoh Y, Okanoue T, Fujita J. In vivo selection of transduced hematopoietic stem cells and little evidence of their conversion into hepatocytes in vivo. *J Hepatol* 45: 681-687, 2006.

H. 知的所有権の取得状況

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

HCV 抗体陽性者の 10 年間のコホート研究と
HCV 関連肝疾患患者血清のプロテオーム解析

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：本研究では、肝炎ウイルス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を目的として、HCV高浸淫地区のHCV抗体陽性者を対象とした10年間の臨床経過を明らかにし、さらに、ウイルス関連肝細胞癌患者血清のプロテオーム解析を行った。コホート研究ではALT値は肝癌発症を予測する因子の一つであり、ALT高値者は肝癌で死亡する可能性が高かった。また、ALT持続正常者ではフェリチン、HFE遺伝子の一塩基多型(H63D)はALT上昇と関連した。さらに、HLA解析からDRB1*0101とDQB1*0501がHCV持続感染に関連すること、TNF- α 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があることを明らかにした。次に、SELDIプロテインチップシステムを用いて、HCV関連肝疾患患者血清のプロテオーム解析を行い、感度・特異度が非常に優れた肝癌判別法を確立し、この方法は肝癌の早期発見にも有用である可能性を見出した。また、HBV関連肝癌とHCV関連肝癌では血清中の蛋白発現パターンが異なっており、そのうちの蛋白ピークの一つがC3a fragmentであることを見出した。C3aのピーク値はALT、腫瘍径、AFP、PIVKA-IIと明らかな相関は無いものの、肝癌治療後には低下する傾向であった。以上のことから、HCV高浸淫地区住民からえられた情報や検体は、C型慢性肝炎の病態解明に有用な解析対象であること、患者血清を用いたプロテオーム解析は肝癌診断に有用であるだけでなく、病態進展に関わる分子を同定できる可能性があると考えられた。

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
健康科学専攻人間環境学講座消化器疾患
生活習慣病学 教授

共同研究者
宇都浩文 鹿児島大学大学院
消化器疾患・生活習慣病学 講師
桶谷 真 鹿児島大学大学院
消化器疾患・生活習慣病学 講師
井戸章雄 京都大学医学部附属病院
探索医療センター 助教授
林 克裕 宮崎大学医学部医学教育
改革推進センター 教授
上村修司 宮崎大学医学部内科学講座
消化器血液学分野 医員
楠元寿典 宮崎大学医学部内科学講座
消化器血液学分野 助手

肝細胞癌の診断や病態解明を目指して、新しいプロテオーム解析手法を用いて検討した。

B. 研究方法

(1) 1993年～1995年までにHCV高浸淫地区住民検診に参加し、HCV抗体陽性かつHCVコア抗原もしくはHCV RNA測定者を対象とした(男性316名、女性500名、1995年の平均年齢64.1歳)。

(2) HCV持続感染かつ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(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比較検討した。

(3) 2000年まで4回以上検診を受診し、すべての検査でALTが34以下であった対象者の2001年以降4年間のALT上昇について解析した。さらに、2000年までALT正常が持続し、2001年以降にALTが上昇(flare-up)した対象者とALTが上昇しなかった対象者について鉄関連遺伝子HFE(H63D、C282Y)などの一塩基多型(SNP)を検討した。

A. 研究目的

本研究では、肝炎ウイルス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を目的として、HCV高浸淫地区のHCV抗体陽性者を対象としたコホート研究を行った。また、ウイルス関連

(4) 無作為に抽出したウイルス陽性者のうち ALT 持続正常 74 名と、ALT 異常 211 名について TNF- α 、IL-10 の SNP およびハプロタイプについて検討した。
(5) SELDI プロテインチップシステムを用いて非肝癌患者と比較し、C 型肝炎ウイルス関連肝癌の早期診断法を確立した。また、肝癌患者において発現の亢進している蛋白を同定し、臨床的意義を検討した。

倫理面の配慮(昨年度までと同様である)

- a. 個人の人権の擁護:1) 研究内容について十分な説明を行い、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、従来通り診療を受けることができることを示す。2) 検診参加者は肝疾患について詳細なフォローアップを得ることができる。また、検診終了後、検査結果報告書と担当医への依頼書を手渡し、参加者にはかかりつけ医または地域の中核病院を受診するようにアドバイスするので、参加者の利益となる。3) 研究参加者のデータは、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: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) HCV 持続感染者の 10 年間の累積全死亡率は 25.3% (うち肝癌死亡率 6.3%) で、HCV 既感染者 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、肝疾患以外の死亡率に差はなかった。また、HCV 持続感染者のうち、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、ウイルス量、セロタイプには差がなかった。
- (2) 1996 年以降 10 年間の累積肝癌発症率は 1995 年の ALT 値が 19 以下 0%、20-34 は 2.8%、35-49 は 6.3%、50 以上は 21.0% で、ALT 値により有意に肝癌発症率は異なっていた。
- (3) 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 60 名と比較し、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。また、

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)がヘテロ(63HD)である頻度が高かった。

(4) TNF- α (-238) の SNP が GA である対象者は GG 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。

(5) HCV 関連肝癌を感度 82%、特異度 81% で肝癌を診断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、この方法が肝癌の判別や早期診断法となる可能性を明らかにした。また、HBV 関連肝癌と HCV 関連肝癌で発現に差が見られた約 8100 Dalton の蛋白が C3a fragment であることを見出した。この蛋白ピーク値は、ALT、腫瘍径、AFP、PIVKA-II と明らかな相関は無かったが、肝癌が明らかになる前から徐々に高値を示し、治療後に低下する傾向であった。

D. 考察

日本には HCV 高侵淫地区が散在し、我々の地域も含めて、セロタイプ 1 の頻度が高く、HCV 既感染者は女性が多いことなどが共通している。また、現在の日本の HCV 持続感染者は高齢化しており、60 歳以上が多くを占めるようになっているが、今回我々が解析した対象者の 1995 年の平均年齢は約 64 歳であることを考えると、この地区の対象者の今までの経過は、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。

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 持続感染者からの肝発癌の頻度は少ないことを明らかにしたが、ALT が持続正常であっても、経過中に ALT が上昇 (flare-up) することがある。本研究では、そのような ALT 上昇に血清フェリチン濃度が関連することを示した。C 型慢性肝炎では血清フェリチン濃度と肝内鉄含有量は相関することから、肝内鉄含有量の増加が酸化ストレスを増大させ、ALT 上昇を誘導すると考えられた。今までに、HFE 遺伝子 SNP と C 型慢性肝炎の病態進展との関連性は既に報告されている。本研究では ALT 持続正常者を対象とした場合には、HFE 遺伝子 H63D の SNP が ALT の上昇と関連することを示したが、その SNP 頻度は低く、HFE 遺伝子 H63D の SNP だけで ALT 上昇を説明するのは難しいと考えられた。今後さらに症例を蓄積し、これらの SNP と HCV 感染者の病態との関連性を検討する必要がある。

SELDI プロテインチップシステムを用いた検討では、微量の血液から再現性よく低分子蛋白もしくはペプチドの発現プロフィールが得られ、HCV による肝癌の診断法や肝癌に関連する可能性のある蛋白を同定した。このような SELDI プロテインチップシステムによる血清中の蛋白質発現解析は、病態解明や癌の診

断マーカーの網羅的な探索に有用であると考えられた。

E. 結論

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 10 年間のコホート研究で明らかにした。また、ALT の上昇にはフェリチン値、HFE(H63D)が一部関連する可能性があると考えられた。さらに、プロテオーム解析による肝炎ウイルス関連慢性肝疾患患者血清の網羅的タンパク質発現解析は肝癌診断に有用であるだけでなく、病態進展に関わる分子を同定でき、新しい分子標的治療法の開発につながる可能性があると思われた。

F. 研究発表

・論文発表

- 1) Kanmura S, et al. Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology* 2007 (in press).
- 2) Nakaya Y, et al; Hepatic Nutritional Therapy (HNT) Study Group. BCAA-enriched snack improves nutritional state of cirrhosis. *Nutrition*. 2007 ;23 :113-20.
- 3) Suruki R, et al. Host immune status and incidence of hepatocellular carcinoma among subjects infected with hepatitis C virus: a nested case-control study in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 ;15:2521-5.
- 4) Kusumoto K, et al. Interleukin-10 or tumor necrosis factor- α polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan. *Cytokine*. 2006;34:24-31.
- 5) Birmann BM, et al. Patterns of serum type 1 and type 2 immune markers in healthy carriers of HTLV-I. *J Med Virol*. 2006;78:847-52.
- 6) Wang Y, et al. Enhanced cell-substratum adhesion of E-cadherin-expressing cells is mediated by activation of the small GTPase protein, Rac1. *Int J Mol Med*. 2006;17:637-42.
- 7) Suruki R, et al. Alanine aminotransferase level as a predictor of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma incidence in a community-based population in Japan. *Int J Cancer*. 2006 ;119:192-5.
- 8) Kim ID, et al. 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.
- 9) Uto H, et al. Spontaneous elimination of hepatitis

C virus RNA in individuals with persistent infection in a hyperendemic area of Japan. *Hepatology Res*. 2006;34:28-34.

- 10) Ogata K, et al. Timing of interferon therapy and sources of infection in patients with acute hepatitis C. *Hepatology Res*. 2006;34:35-40.
- 11) Uto H, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, pioglitazone, inhibits fat accumulation and fibrosis in the livers of rats fed a choline-deficient, l-amino acid-defined diet. *Hepatology Res*. 2005;32:235-42
- 12) Nagata-Tsubouchi Y, et al. 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. *Hepatology Res*. 2005;31:79-87.
- 13) Hayashi K, et al. Usefulness of a new immuno-radiometric assay to detect hepatitis C core antigen in a community-based population. *J Viral Hepat*. 2005;12:106-10.
- 14) Gao G, et al. 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;12:46-50.
- 15) 永田賢治、他:C型慢性肝炎に対する IFN β 先行 IFN α 2b+リバビリン併用療法の検討. *医学と薬学* 54:519-523、2005、
- 16) 森内昭博、他:C型肝炎治療の新しい展開⑤線維化防止法. *Mebio*22:75-81、2005、
- 17) Kasahara A, et al. Interferon treatment improves survival in chronic hepatitis C patients showing biochemical as well as virological responses by preventing liver-related death. *Journal of Viral Hepatitis* 11, 148-156.2004.
- 18) 堀 剛、他:肝細胞癌の経皮的治療(ラジオ波焼灼療法について). *宮崎県内科医会誌* 2-7, 2004
- 19) Raker AC, et al: HCV core antigen as an alternative to NAT to detect HCV Viremia. *Transfusion* 44, 307-308, 2004.
- 20) Onaga M, et al. Enhanced expression of growth factors and imbalance between hepatocyte proliferation and apoptosis in the livers of rats fed a choline-deficient, L-amino acid -defined diet. *Hepatology Res* 28, 94-101, 2004
- 21) Okayama A, et al: Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia /lymphoma in asymptomatic carriers. *Int J Cancer* 110, 621-625, 2004.
- 22) Birmann BM, et al: Serologic assessment of type 1

and type 2 immunity in healthy Japanese adults. *Cancer epidemiol biomarkers prev* 13: 1385-1391, 2004.

23) Kato J, et al. Transforming growth factor- β -induced stimulation of formation of collagen fiber network and anti-fibrotic effect of taurine in an in vitro model of hepatic fibrosis. *Hepato Res* 30, 34-41, 2004.

24) Onaga Y, et al. Hypermethylation of the wild-type ferrochelatase allele is closely associated with severe liver complication in a family with erythropoietic protoporphyria. *Biochem Biophys Res Commun.* 321, 851-858, 2004.

25) Makiyama A, et al: Characteristics of patients with chronic hepatitis C who develop hepatocellular carcinoma after a sustained response to interferon therapy. *Cancer* 101, 1616-1622, 2004.

26) Imai Y, et al: Interferon therapy for aged patients with chronic hepatitis C: improved survival in patients exhibiting a biochemical response. *J Gastroenterol* 39, 1069-1077, 2004.

27) Tsubouchi H: Sustained activation of epidermal growth factor receptor in cholangiocarcinoma: a potent therapeutic target? *Journal of Hepatology* 41, 859-861, 2004.

28) Sho Y, et al: Orally administered Kampo medicine, Juzen-taiho-to ameliorates anemia during interferon plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 39, 1202-1204, 2004.

・学会発表

1. 宇都浩文、他. HCV 高浸淫地区の 60 歳以上 HCV 抗体陽性者の自然経過から見た ALT 低値例への対応. 日本消化器関連学会週間 (DDW-Japan 2006)、平成 18 年 10 月
2. 高濱由香、他: ヒト初代培養肝細胞および正常リンパ球の遺伝子発現に及ぼすリバビリンの影響. 日本消化器関連学会週間 (DDW-Japan 2006)、平成 18 年 10 月
3. 楠元寿典、他: 高齢者 C 型慢性肝炎に対する IFN/Ribavirin 併用療法の検討. 日本消化器関連学会週間 (DDW-Japan 2006)、平成 18 年 10 月
4. 藤本千夏、他: B 型慢性肝炎患者における耐糖能異常の検討. 日本消化器関連学会週間 (DDW-Japan 2006)、平成 18 年 10 月
5. 蓮池 悟、他: 当科における C 型慢性肝炎の耐糖能異常の検討. 日本消化器関連学会週間 (DDW-Japan 2006)、平成 18 年 10 月
6. 黒木穰二、他: HCV 高浸淫地区住民におけるフィブrosisの肝線維化の評価法としての有用

- 性の検討. 日本消化器関連学会週間 (DDW-Japan 2006)、平成 18 年 10 月
7. 宇都浩文、他: C 型肝炎ウイルス感染者におけるインスリン抵抗性の検討. 第 3 回酸化ストレス研究会、平成 18 年 11 月
 8. 宇都浩文、他. 肝細胞癌の早期診断および病態解明を目指した血清プロテオーム解析. 第 14 回浜名湖シンポジウム. 平成 18 年 12 月 22 日
 9. Takahama Y, et al.: Genetic polymorphisms in obesity-associated genes in subjects with persistent hepatitis C virus infections from a hyperendemic area of Japan. 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)、平成 18 年 10 月
 10. Kanmura S, et al. Identification of candidate marker of hepatocellular carcinoma using a ProteinChip system. 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)、平成 18 年 10 月
 11. Uto H, 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*、平成 18 年 5 月
 12. Tsubouchi N, et al. Endoscopic ultrasonography classification of cardiac varices in liver cirrhosis and prediction of associated hemorrhage. *Digestive Disease Week 2005*、平成 18 年 5 月
 13. Kanmura S, et al. Proteomic analysis of serum protein in patients with hepatocellular carcinoma. 10 US-Japan GI and Liver meeting in 21st Century、平成 18 年 5 月
 14. Kanmura S, 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 (AASLD)、2005 年 11 月
 15. 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、
 16. 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
 17. 永田賢治、他: 難治性慢性 C 型肝炎に対する IFN β 先行 IFN α 2b/リバビリン療法の成績. 第 91 回日本消化器病学会総会、2005 年 4 月
 18. 永田賢治、他: 高齢者 (80 歳以上) 肝細胞癌患

- 者に対する経皮的 RFA の安全性の検討. 第 41 回日本肝癌研究会、2005 年 6 月
19. 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
 20. 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
 21. 永田賢治、他: 当科における肝細胞癌に対する経皮的ラジオ波焼灼療法の治療成績. 第 41 回日本肝臓学会総会、2005 年 6 月
 22. 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
 23. 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
 24. 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
 25. 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
 26. 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. DDW-Japan2005 第 9 回日本肝臓学会大会、2005 年 10 月
 27. 永田賢治、他: 慢性 C 型肝炎に対する IFN β 先行 IFN \cdot リバビリン療法の有用性の検討. 第 9 回日本肝臓学会大会、2005 年 10 月
 28. 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
 29. 楠元寿典、他: HCV 感染の自然経過に対する IL-10、TNF α 遺伝子多型の検討. 第 36 回日本肝臓学会西部会、2005 年 11 月
 30. 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
 31. 宇都浩文、他: HCV 高浸淫地区住民を対象とした ALT の変動と肝癌発症との関連の検討. 日本消化器病学会(仙台)2004 年 4 月
 32. 江藤敏治、他: 高ウイルス量かつ HCV 群別 1 の C 型慢性肝炎に対する β -IFN2回分割先行リバビリン併用療法. 日本消化器病学会総会、2004 年 4 月
 33. 永田賢治、他: 小型肝癌に対する経皮的ラジオ波焼灼療法の有用性の検討. 日本肝臓学会総会、2004 年 6 月
 34. 蓮池悟、他: B 型肝炎ウイルス関連肝硬変に対するラミブジンの長期予後に関する検討. 日本肝臓学会総会、2004 年 6 月
 35. 永田賢治、他: 進行肝細胞癌に対する少量 5-FU CDDP 肝動注化学療法の有用性. 日本肝癌研究会、2004 年 6 月
 36. 蓮池悟、他: オステオアクチビンの肝線維化・発癌に及ぼす影響の解析. 肝サイトスケレトン研究会、2004 年 7 月
 37. 蓮池悟、他: コリン欠乏アミノ酸置換(CDAA)食飼育ラット肝から単離した osteoactivin 遺伝子の発現および機能解析. 日本癌学会学術総会、2004 年 9 月
 38. Uto H et al: Analysis of a rodent model of nonalcoholic steatohepatitis. 3rd JSH Single Topic Conferens "Nonalcoholic Steatohepatitis in Asia-Oceania" 2004 年 10 月
 39. Eto T, et al. The introduction of abdominal ultra-sonography test into student annual health examination -Examination for overweight student - 3rd JSH Single Topic Conference "Nonalcoholic steato hepatitis in Asia-Oceania" 2004 年 10 月
 40. 金一徳、他: MR volumetry を用いたミニブタ肝切除後の肝再生の評価. 日本肝臓学会大会、2004 年 10 月
 41. Nakanishi C, et al. A peroxisome proliferation activated receptor γ ligand, pioglidazone, inhibits fat accumulation and fibrosis in the livers rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. 55th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(Boston)、2004 年 11 月
 42. 永田賢治、他: 従来の IFN 療法と IFN+リバビリン併用療法、PEG-IFN 療法におけるウイルス動態と治療効果-治療早期のウイルス動態からみた慢性C型肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療効果の検討-. 第 84 回日本消化器病学会九州支部例会、2004 年 12 月
 43. 坂元秀壮、他: 肝癌の自然経過、各種治療後の再発と予後-小型肝癌に対する経皮的ラジオ波焼灼療法の有用性の検討-. 第 84 回日本消化器病学会九州支部例会、2004 年 12 月
 44. Eto T et al: The trial of meal instruction and movement prescription to overweight students and one year after follow up survey. 14th Asian pacific association for the study of the liver(APASL) 2004 年 12 月
 45. Abe H, et al. Overexpression of rat osteoactivin suppresses the growth of preneoplastic nodules. 14th Asian pacific association for the study of the liver(APASL) 2004 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
【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

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
1) K. Namba, (加藤)	Establishment of hepatitis C virus replicon cell lines possessing interferon-resistant phenotype	Biochem Biophys Res Commun	323	299-309	2004
2) A. Naganuma, (加藤)	Promotion of Microsatellite Instability by Hepatitis C Virus Core Protein in Human Non-neoplastic Hepatocyte Cells	CANCER RESEARCH	64	1307-1314	2004
3) K. Abe, (加藤)	cdNA microarray analysis to compare HCV subgenomic replicon cells with their cured cells	Virus Research	107	73-81	2005
4) H. Dansako, (加藤)	Hepatitis C virus proteins exhibit conflicting effects on the interferon system in human hepatocyte cells	Biochem Biophys Res Commun	336	458-468	2005
5) Kui Li, (加藤)	Distinct Poly(I-C) and Virus-activated Signaling Pathways Leading to Interferon- β Production in Hepatocytes	The Journal of Biological Chemistry	280	16739-16747	2005
6) 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
7) K. Nara, (加藤)	Mizoribine inhibits hepatitis C virus RNA replication: Effect of combination with interferon- α	Biochem Biophys Res Commun	330	871-879	2005
8) 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	Biochem Biophys Res Commun	329	1350-1359	2005

9) 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
10) K. Yuasa, (加藤)	Zinc is a negative regulator of hepatitis C virus RNA replication	Liver International	26	1111-1118	2006
11) M. Ikeda, (加藤)	Different Anti-HCV Profiles of Statins and Their Potential for Combination Therapy With Interferon	HEPATOLOGY	44	117-125	2006
12) N. Ishii, (加藤)	Diverse Effects of Cyclosporine on Hepatitis C Virus Strain Replication	Journal of Virology	80	4510-4520	2006
13) Lin. Deng, (加藤)	NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner	Journal of General Virology	87	1703-1713	2006
14) K. Naka, (加藤)	Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing interferon- β via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes	Virology	346	348-362	2006
15) K. Naka, (加藤)	Epigenetic silencing of interferon-inducible genes is implicated in interferon resistance of hepatitis C virus replicon-harboring cells	Journal of Hepatology	44	869-878	2006
16) K. Okamoto, (松浦)	Intramembrane Proteolysis and ER retention of HCV Core Protein.	J. Virol.	78	6370-6380	2004
17) T. Suzuki, (松浦)	Identification of Basal Promoter and Enhancer Elements in an Untranslated Region of the TT Virus Genome	J. Virol.	78	10820-10824	2004
18) A. Kaimori, (松浦)	Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin	Virology	324	74-83	2004

19) R. Watanabe, (松浦)	Comparison of serum sensitivities of pseudotype retroviruses produced from newly established packaging cell lines of human and feline origins	Virus Res.	99	89-93	2004
20) Christopher T. Migliaccio, (松浦)	Evidence for a polytopic form of the E1 envelope glycoprotein of Hepatitis C virus	Virus Res.	105	47-57	2004
21) I. Hamamoto, (松浦)	Human VAP-B Is Involved in Hepatitis C Virus Replication through Interaction with NS5A and NS5B	J. Virol.	79	13473-13482	2005
22) Tian-Cheng Li, (松浦)	Essential Elements of the Capsid Protein for Self-Assembly into Empty Virus-Like Particles of Hepatitis E Virus	J. Virol.	79	12999-13006	2005
23) T. Ave, (松浦)	Involvement of the Toll-Like Receptor 9 Signaling Pathway in the Induction of Innate Immunity by Baculovirus.	J. Virol.	79	2847-2858	2005
24) Y. Kitagawa, (松浦)	Ligand-Directed Gene Targeting to Mammalian Cells by Pseudotype Baculoviruses	J. Virol.	79	3639-3652	2005
25) Y. Mori, (松浦)	Nuclear Localization of Japanese Encephalitis Virus Core Protein Enhances Viral Replication	J. Virol.	79	3448-3458	2005
26) R. Suzuki, (松浦)	Molecular Determinants for Subcellular Localization of Hepatitis C Virus Core Protein	J. Virol.	79	1271-1281	2005
27) K. Nakai, (松浦)	Oligomerization of Hepatitis C Virus Core Protein Is Crucial for Interaction with the Cytoplasmic Domain of E1 Envelope Protein	J. Virol.	80	11265-11273	2006
28) T. Okamoto, (松浦)	Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90	EMBO J.	25	5015-5025	2006
29) H. Kato, (松浦)	Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses	Nature	441	101-105	2006

30)H. Miyamoto, (松浦)	Involvement of the PA28 γ -Dependent Pathway in Insulin Resistance Induced by Hepatitis C Virus Core Protein	J. Virol.	81	1727-1735	2007
31)M. Sirakura, (松浦)	E6AP Ubiquitin Ligase Mediates Ubiquitylation and Degradation of Hepatitis C Virus Core Protein	J. Virol.	81	1174-1185	2007
32)N. Kanazawa, (榎本)	Regulation of Hepatitis C Virus Replication by Interferon Regulatory Factor 1	J. Virol.	78	9713-9720	2004
33)S. Maekawa, (榎本)	Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV replicon derived from chimpanzee-infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in Huh-7 cells	Journal of Viral Hepatitis	11	394-403	2004
34)Y. Tanabe, (榎本)	Synergistic Inhibition of Intracellular Hepatitis C Virus Replication by Combination of Ribavirin and Interferon- α	The Journal of Infectious Diseases	189	1129-1139	2004
35)M. Nakagawa, (榎本)	Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporine A	Biochem Biophys Res Commun	313	42-47	2004
36)M. Nakagawa, (榎本)	Suppression of Hepatitis C Virus Replication by Cyclosporin A Is Mediated by Blockade of Cyclophilins	Gastroenterology	129	1031-1041	2005
37)K. Hamano, (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	1401-1409	2005
38)J. Itakura, (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 Virology Hepatitis	12	594-603	2005

39)S. Maekawa, (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	J Gastroenterol	40	113-115	2005
40)P. Simmonds, (榎本)	Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes	Hepatology	42	962-973	2005
41)T. Yamashiro, (榎本)	Negative regulation of intracellular hepatitis C virus replication by interferon regulatory Factor 3	Journal of Gastroenterology	41	750-757	2006
42)Y. Itsui, (榎本)	Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication	Journal of Viral Hepatitis	13	690-700	2006
43)T. Kohashi, (榎本)	Site-specific mutation of the interferon sensitivity determining region(ISDR)modulates hepatitis C virus replication	Journal of Viral Hepatitis	13	582-590	2006
44)T. Koyama, (榎本)	Divergent activities of interferon-alpha subtypes against intracellular hepatitis C virus replication	Hepatology Research	34	41-49	2006
45)H. Miyoshi, (小池)	Methylation status of suppressor of cytokine signaling-1 gene in hepatocellular carcinoma	J Gastroenterol	39	563-569	2004
46)Y. Shintani, (小池)	Hepatitis C Virus Infection and Diabetes:Direct Involvement of the Virus in the Development of Insulin Resistance	Gastroenterology	126	840-848	2004

47) K. Koike, (小池)	Metabolic aspects of hepatitis C viral infection: steatohepatitis resembling but distinct from NASH	J Gastroenterol	40	329-336	2005
48) K. Koike, (小池)	Steatosis in chronic hepatitis C: fuel for overproduction of oxidative stress?	J Gastroenterol	40	664-665	2005
49) H. Miyoshi, (小池)	Hepatitis C virus core protein exerts an inhibitory effect on suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1 gene expression	J Hepatol	43	757-763	2005
50) K. Koike, (小池)	Hepatitis C as a metabolic disease: Implication for the pathogenesis of NASH	Hepatol Res	33	145-150	2005
51) K. Koike, (小池)	Molecular Basis of Hepatitis C Virus -Associated Hepatocarcinogenesis: Lessons From Animal Model Studies	Clin Gastroenterol Hepatol	3	S132-S135	2005
52) K. Koike, (小池)	Hepatitis C Virus Infection can Present with Metabolic Disease by Inducing Insulin Resistance	Intervirology	49	51-57	2006
53) K. Koike, (小池)	Oxidative stress and hepatitis C viral infection	Hepatol Res	34	65-73	2006
54) K. Koike, (小池)	Oxidative stress and apoptosis in hepatitis C: the core issue	J Gastroenterology	41	292-294	2006
55) C. Okuse, (小池)	Risk factors for retinopathy associated with interferon Alpha-2b and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C	World J Gastroenterol	12	3759-3759	2006

56) K. Koike, (小池)	Antiviral treatment of hepatitis C: present status and future prospects	J Infect Chemother	12	227-232	2006
57) H. Takahashi, (小池)	Molecular epidemiology of hepatitis A virus in metropolitan areas in Japan	J Gastroenterol	41	981-986	2006
58) K. Koike, (小池)	Prevalence of coinfection with human immunodeficiency virus and hepatitis C Virus in Japan	Hepatol Res	37	2-5	2007
59) H. Miyamoto, (小池)	Involvement of the PA28 γ -Dependent Pathway in Insulin Resistance Induced by Hepatitis C Virus Core Protein	J. Virol.	81	1727-1735	2007
60) K. Moriishi, (小池)	Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus γ -associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis	Proc Natl Acad Sci USA	104	1661-1666	2007
61) A. Okumura, (各務)	Changes in natural killer T cells subsets during therapy in type C hepatitis and hepatocellular carcinoma	Hepatology Research	32	213-217	2005
62) Li Shen, (各務)	The SHAP-hyaluronan complex in serum from patients with chronic liver diseases caused by hepatitis virus infection	Hepatology Research	34	178-186	2006
63) M. Ayada, (各務)	Alteration of serum cytokine balances among different phases of chronic hepatitis B virus infection	Hepatology Research	34	214-221	2006
64) 井廻 道夫	C型肝炎の発症機序とHCV持続感染	総合臨牀	54	503-511	2005

65) S. Ishii, (井廻)	Dendritic cell therapy With interferon- α synergistically suppresses outgrowth of established tumors in a murine colorectal cancer model	Gene Therapy	13	78-87	2006
66) A. Hiraide, (井廻)	Cytidine-phosphate -guanosine Oligodeoxynucleotides and Interferon-alpha- expressing Tumor Cell Effectively Induce Dendritic Cell Maturation In Vitro	ANTICANCER RESEARCH	26	211-218	2006
67) 井廻 道夫	C型肝炎ウイルス感染に おける免疫応答	Frontiers in Gastroenterology	11	12-24	2006-7
68) K. Ohkawa, (林)	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
69) A. Kaimori, (林)	Pseudotype hepatitis C virus enters immature myeloid dendritic cells through the interaction with lectin	Virology	324	74-83	2004
70) N. Hiramatsu, (林)	The significance of interferon and ribavirin combination therapy followed by interferon monotherapy for patients with chronic hepatitis C in Japan	Hepatol Res	29	142-147	2004
71) H. Ishida, (林)	Involvement of p38 signaling pathway in interferon- α -mediated anti viral activity toward hepatitis C virus	Biochem Biophys Res Commun	321	722-727	2004
72) T. Toyama, (林)	Ninjurin1 increases p21 expression and induces cellular senescence in human hepatoma cells	J Hepatol	41	637-643	2004

73) T. Takehara, (林)	Hepatocyte-Specific Disruption of Bcl-xL Leads to Continuous Hepatocyte Apoptosis and Liver Fibrotic Responses	Gastroenterology	127	1189-1197	2004
74) T. Miyagi, (林)	Concanavarin A Injection Activates intrahepatic innate Immune Cells to Provoke an Antitumor Effect in Murine Liver	Hepatology	40	1190-1196	2004
75) M. Jinushi, (林)	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
76) T. Kanto, (林)	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
77) F. Nakanishi, (林)	Alteration in Gene Expression Profile by Full-Length Hepatitis B Virus Genome	Intervirology	48	77-83	2005
78) M. Jinushi, (林)	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
79) T. Takehara, (林)	Viral covalently closed circular DNA in a non-transgenic mouse model for chronic hepatitis B virus replication	J Hepatol	44	267-274	2006
80) M. Sakakibara, (林)	Quick Generation of Fully Mature dendritic Cells From Monocytes With OK432, Low-Dose Prostanoid and Interferon- α as Potent Immune Enhancers	J Immunother	29	67-77	2006