

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得： 特願 2008-063642、H B
s ペプチド融合体、上田啓次（申請中）
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（病態班））
分担研究報告書

オステオアクトチンの肝障害、肝線維化における役割の解析
研究分担者 井戸章雄 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 准教授

研究要旨：オステオアクトチンは傷害組織においてマクロファージなどの抗原提示細胞で発現し、炎症の持続、傷害組織の再生・修復、炎症性発癌などに関与していることが推測されている。本研究では、慢性 C 型肝炎から肝硬変、肝発癌への過程におけるオステオアクトチンの役割を解析することを目的に、C 型肝炎ウイルス(HCV)抗体陽性者におけるオステオアクトチン遺伝子 5' 上流領域の SNP (rs858239 および rs3757450) について解析した。HCV-RNA の有無との関連性は認められなかったが、rs858239 TT では、 γ グロブリン($p=0.047$)、VI 型コラーゲン 7S($p=0.009$)が有意に上昇し、rs3757450 AG および GG では、血清フェリチン($p=0.028$)、VI 型コラーゲン 7S($p=0.025$)が有意に上昇していた。一方、rs3757450 AG および GG では ALT 値上昇または動揺例が有意に多かった($p=0.029$)。また、オステオアクトチンの役割の分子機構を解明するためにコンディショナルノックマウスの作出を進め、ネオマイシン配列が除去されたホモマウスを獲得した。今回解析したオステオアクトチン遺伝子 5' 上流領域の SNP 近傍には複数の転写因子結合領域が存在し、オステオアクトチンの発現レベルが慢性 C 型肝炎の病態に関与している可能性が考えられた。

共同研究者

宇都浩文 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 講師
桶谷 真 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 講師
長谷川将 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 講師
森内昭博 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 助教

A. 研究目的

オステオアクトチンは大理石骨症ラットから単離された遺伝子で骨芽細胞の分化に関与している。我々は、コリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラット肝臓において発現亢進している遺伝子群から同遺伝子を単離し、ヒト肝硬変および肝細胞癌組織においても発現していることを見出した。さらに、ヒト肝癌組織および非肝癌硬変肝組織においてもオステオアク

チンが発現増強し、肝癌細胞において強発現させたオステオアクトチンはその浸潤、転移を促進することを報告した。

オステオアクトチンはヒト乳癌細胞から単離された glycoprotein nmb (gpnmb)、マウス樹状細胞から単離された DC-HIL のラットホモログであり、最近、急性肝障害モデルの肝マクロファージにおいて発現していることが報告された。さらに、マクロファージなどの抗原提示細胞で発現されるオステオアクトチンは炎症のフィードバック調節因子として作用していること、また乳癌や多形性膠芽腫に発現するオステオアクトチンはその転移、進展に関与していることも報告された。

以上の報告から、オステオアクトチンは傷害組織において抗原提示細胞に発現し、炎症の持続、傷害組織の再生・修復、炎症性発癌に関与し、さらに慢性炎症を背景に発生した癌細胞で発現するオステオアクトチンはその進展、転移に関与していることが

推測される。本研究の目的は、慢性 C 型肝炎患者において、持続する肝炎から肝硬変に進展し、さらに肝癌が発生する過程において、肝障害時に抗原提示細胞で発現し、また肝発癌時には肝癌細胞で発現するオステオアクチビンの役割を明らかにすることである。

B. 研究方法

1. 慢性 C 型肝炎患者におけるオステオアクチビン遺伝子プロモーター領域の SNP 解析

1994 年～2005 年に C 型肝炎ウイルス (HCV) 高感染地区住民検診を受診した HCV 抗体陽性者 1125 人のうち、2002 年に遺伝子解析に同意の得られた 441 人を対象として、下記の 2 群でオステオアクチビン遺伝子 5' 上流領域に存在する SNP (rs858239 (日本人では C : 71.1%, T : 28.9%), rs3757450 (A : 93.3%, G : 6.7%)) について解析した。

2. 遺伝子改変動物を用いたオステオアクチビンの機能解析

マウスオステオアクチビン遺伝子のエクソン 1 の開始コドン上流とイントロン 1 に lox P 配列を挿入したターゲティングベクターを作成し、コンディショナル・ノックアウトマウスの作出を継続した。

C. 研究結果

1. 慢性 C 型肝炎患者におけるオステオアクチビン遺伝子プロモーター領域の SNP 解析

対象者の臨床背景を表 1 に示す。HCV キャリア (HCV-RNA 陽性者) は HCV-RNA 陰性者に比して、輸血歴があり ($p=0.0280$)、AST 値 ($p<0.001$)、ALT 値 ($p<0.001$)、インスリン値 ($p=0.0002$) が有意に高く、血小板数 ($p<0.001$)、 α グロブリン値 ($p<0.001$)、中性脂肪 ($p=0.040$)、総コレステロール値 ($p<0.001$) は有意に低かった。rs858239 および rs3757450 はいずれも HCV-RNA の有無とは関連性を認めなかった。一方、rs858239 TT では、 α グロブリン ($p=0.047$)、VI 型コラーゲン 7S ($p=0.009$) が有意に上昇していたが、HCV キャリア例における ALT 値の上昇とは関連が認められ

なかった。rs3757450 AG および GG では、血清フェリチン ($p=0.028$)、VI 型コラーゲン 7S ($p=0.025$) が有意に上昇しており、HCV キャリア例においては、rs3757450 AG および GG では ALT 値上昇または動揺例が有意に多かった ($p=0.029$)。

2. 遺伝子改変動物を用いたオステオアクチビンの機能解析

相同組換えアレルを有した F1 マウスと FLP 発現マウスを交配させ、ネオマイシン配列が除去されたマウスを獲得した。さらに得られたネオマイシン配列除去マウス動詞を交配させ、ネオマイシン配列が除去されたホモマウスを獲得した。

D. 考 察

オステオアクチビン遺伝子 5' 上流領域に存在する二つの SNP (rs858239, rs3757450) 解析から、マクロファージなどの抗原提示細胞で発現するオステオアクチビンが肝炎の持続あるいは程度に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。特に rs3757450 近傍には CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)、AP-1 など重要な転写因子の結合領域が存在し、rs3757450 の SNP がオステオアクチビンの発現調節にどのような影響を及ぼし、オステオアクチビンの発現レベルが慢性 C 型肝炎の進展にどのように関わっているかを明らかにすることが重要と考えられた。

一方、オステオアクチビンのコンディショナル・ノックアウトマウスを用いた研究では、ネオマイシン配列が除去されたホモコンディショナル・ノックアウトマウスの作出に時間を要したが、交配を繰り返すことでようやく目的の個体 (雌・雄) を得ることができた。今後、組織特異的なオステオアクチビン・ノックアウトマウスを作成し、肝障害 (肝炎) におけるオステオアクチビンの役割を明らかとし、慢性 C 型肝炎患者におけるオステオアクチビン遺伝子の SNP 解析の結果を分子レベルで裏付けることが必要と考えられた。

E. 結 論

慢性C型肝炎患者を対象にオステオアクチビン遺伝子5'上流領域に存在する二つのSNP(rs858239, rs3757450)解析を行い、これらのSNPが肝炎の進展に関与している可能性が示唆された。オステオアクチビンは抗原提示細胞で発現するため、肝炎の持続あるいは程度に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahama Y, Uto H, Kanmura S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagaa K, Hayashi K, Stuver S, Okayama A, Tsubouchi H. Association of a genetic polymorphism in ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 with hepatitis C virus infection and hepatitis C virus core antigen levels in subjects in a hyperendemic area of Japan. *J Gastroenterology* 2008; 43: 942-50.
2. Kodama M, Uto H, Numata M, Hori T, Murayama t, Sasaki F, Tsubouchi N, Ido A, Shimoda K, Tsubouchi H. Endoscopic characterization of the small bowels in patients with portal hypertension evaluated by double balloon endoscopy. *J Gastroenterol* 2008; 43: 589-96.

2. 学会発表

1. 佐々木文郷 宇都浩文, 上村修司, 楠元寿典, 林克裕, 藤田浩, 山元隆文, 桶谷 真, 井戸章雄, 坪内博仁: HCV 高感染地区における HCV 抗体陽性者の血清 C3a 濃度と生命予後の関連. ポスター 第 105 回日本内科学会総会(2008 年 4 月 11-13 日)東京
2. 熊谷公太郎, 宇都浩文, 玉井 努, 重信秀峰,

森内昭博, 長谷川 将, 桶谷 真, 井戸章雄, 永田賢治, 林 克裕, 坪内博仁: HCV 高感染地区におけるアンケート調査結果から見た HCV 抗体陽性者の C 型慢性肝炎の理解度: 第 94 回日本消化器病学会総会(2008 年 5 月 8-10 日)福岡市

3. 熊谷公太郎, 宇都浩文, 玉井 努, 重信秀峰, 森内昭博, 長谷川 将, 桶谷 真, 井戸章雄, 楠元寿典, 林 克紀, 坪内博仁: HCV 持続感染者の HCV コア抗原変動に関する検討: ポスター第 44 回日本肝臓学会総会(2008 年 6 月 5-6 日)松山
4. 佐々木文郷, 宇都浩文, 佐藤悠子, 熊谷公太郎, 玉井 努, 森内昭博, 長谷川 将, 桶谷 真, 井戸章雄, 中島知明, 岡上 武, 坪内博仁: C 型肝炎ウイルス感染 ALT 正常持続者血清のプロテオーム解析: ポスター 第 12 回日本肝臓学会大会 (第 16 回 JDDW) (2008 年 10 月 1-4 日)東京

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 臨床背景

<i>Characteristics</i> (2002年)	<i>HCV carrier</i> (n=339)	<i>HCV-RNA negative</i> (n=102)	<i>p value</i>
Age	70.7 ±9.5	69.5 ±10.9	0.5671
Gender (male / female)	120 / 219	35 / 67	0.8406
Body mass index	23.1±3.0 (283)	23.2 ±3.3 (80)	0.7981
Alcohol (daily / stop / none)	182 / 29 / 117	58 / 5 / 36	0.4694
blood transfusion (yes/no)	47 / 271	23 / 71	0.0280
HCV core antigen (fmol/L)*	5047 ±4922.2 (321)	-	-
HCV Serotype (I / II)***	216 / 123	-	-
AST (IU/L)	51.1 ±38.3	26.8 ±9.2	<0.0001
ALT (IU/L)	48.0 ±47.2	20.5 ±10.9	<0.0001
□-globulin (IU/L)	21.4 ±4.4 (337)	22.6 ±28.1 (79)	<0.0001
PLT (x10 ⁴)	19.1 ±6.3 (338)	24.2 ±5.8	<0.0001
TG (mg/dl)	108.6 ±55.6 (245)	127.3 ±60.6 (80)	0.0040
Total cholesterol (mg/dl)	171.2 ±34.9 (245)	193.1±31.4 (80)	<0.0001
HbA1c (%)	5.3 ±0.7 (245)	5.5 ±1.0 (79)	0.0943
Glucose (mg/dl)	96.1 ±31.0 (274)	95.4 ±22.7 (76)	0.9041
Insulin	11.4 ±11.4 (274)	8.6±11.1 (76)	0.0002

† Data are shown as means ± SD (number of subjects examined). * Excluding subjects whose HCV core antigen levels was below the cut-off value. *** Excluding subjects whose HCV serotype was undetermined.

厚生労働科学研究費補助金(平成20年度肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書

ウイルス性肝炎・肝がんにおける免疫制御に関する研究

研究分担者 中本 安成 金沢大学附属病院消化器内科 講師

研究要旨

これまで我々が確立した世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースを用いて、がん組織に特異的な遺伝子がコードするタンパクの免疫原性を評価した。肝がん組織において発現が亢進している Multidrug Resistance-Associated Protein 3 (MRP3) に注目して、アミノ酸配列に含まれるHLA結合モチーフに対して、Tリンパ球の反応性を解析するとともに臨床病態との関連を検討した。肝がん患者の末梢血から MRP3 特異的なTリンパ球が誘導可能であり、肝がん細胞に対する障害(CTL)活性を示した。臨床経過との関連では、肝がんの早期からMRP3特異的CTLが誘導されることが明らかとなり、MRP3タンパクの肝がん組織における発現レベルとCTLの割合は逆相関していた。これより、MRP3タンパクが肝がんに対する免疫治療の標的抗原となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースに基づいて、がん組織に特異的な遺伝子がコードするタンパクの免疫原性の解析を進めてきた。本研究では、腫瘍拒絶抗原である可能性が報告されているキャリアー型輸送タンパクMultidrug Resistance-Associated Protein 3 (MRP3) に注目して、肝がん組織における発現と同タンパクに対する免疫反応を検討した。

B. 研究方法

103名の肝がん患者を対象として、がん組織におけるMRP3 mRNAの発現をリアルタイムPCR法にて測定した。

HLA-A24拘束性MRP3由来ペプチドを用いて末梢血より細胞障害性Tリンパ球(CTL)を誘導し、肝がん細胞株に対する障害活性を測定した。また、ELISPOTアッセイによってCTLの割合を測定した。

C. 研究結果

肝がん組織におけるMRP3の発現レベルは、非がん組織に比べて有意に亢進していた。がん患者からMRP3特異的CTLの誘導が可能であり、肝がん細胞株に対する障害活性を示した。がん患者の末梢血中におけるMRP3特異的CTLの割合は、ELISPOTにて $20-50/3 \times 10^5$ であり既報の腫瘍拒絶抗原に対する反応と同等であった。臨床背景との関連性

については、CTL が肝がん発症早期においても誘導されることが明らかになった。また、MRP3 タンパクの発現レベルは、特異的 CTL の割合と逆相関を示した。さらに、肝動脈塞栓療法(TAE)やラジオ波焼灼療法(RFA)に伴って CTL の割合が増加することが観察された。

D. 考察

MRP3タンパクは、肝がんに対する免疫治療の標的となりうることが示唆された。

肝がん組織におけるMRP3の発現レベルと特異的CTLの割合が逆相関を示したことはMRP3を産生する肝がんに対する免疫プレッシャーの存在を示唆する所見と考えられた。

E. 結論

MRP3タンパクが肝がんに対する免疫治療の標的抗原となる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iida, N., Nakamoto, Y., Baba, T., Kakinoki, K., Li, Y. Y., Wu, Y., Matsushima, K., Kaneko, S., and Mukaida, N: Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice. *J. Leukoc. Biol.*, 84: 1001-1010, 2008.
2. Mizukoshi, E., Honda, M., Arai, K., Yamashita, T.,

Nakamoto, Y., and Kaneko, S: Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 49: 946-954, 2008.

3. Sakai, Y., Honda, M., Fujinaga, H., Tatsumi, I., Mizukoshi, E., Nakamoto, Y., and Kaneko, S: Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res.*, 68: 10267-10279, 2008.
4. Tsuchiyama, T., Nakamoto, Y., Sakai, Y., Mukaida, N., and Kaneko, S: Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation. *Cancer Sci.*, 99: 2075-2082, 2008.

2. 学会発表

1. Nakamoto Y., Mizukoshi E, Kitahara M, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: #125; Prolonged recurrence-free survival following combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; **第59回American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California)**: Hepatology 48 (4, Suppl.) 361A; 一般(parallel); oral: Nov. 2, 2008
2. Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y. Honda M, Kaneko S: #82; Cellular immune responses to multidrug resistance-associated protein 3 in the patients with hepatocellular carcinoma.; **第25回Internal Association for the Study of the Liver (IASL) Biennial Meeting (San Francisco, California)**: Hepatology 48 (4, Suppl.) 343A; 一般(parallel); oral: Nov. 2, 2008

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
3. その他: なし

厚生労働科学研究費補助金（平成 20 年度肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

消化器癌に対するインターフェロン α と樹状細胞による免疫療法
研究分担者 広石 和正 昭和大学医学部消化器内科 講師

研究要旨

消化器癌に対する新規治療の一つとして免疫療法が期待されている。一般に消化器癌は免疫原性に乏しいため、担癌患者に強力な免疫賦活作用を誘導するような治療が必要であり、樹状細胞と IFN- α 、CpG による免疫治療を検討した。マウス消化器癌細胞株と樹状細胞、CpG を混合培養したところ、樹状細胞の成熟が確認された。また、消化器癌細胞株を皮下接種しあらかじめ皮下腫瘍を形成したマウスに対し、樹状細胞と IFN- α 遺伝子導入癌細胞、CpG を用いて治療を行ったところ、野生株腫瘍に対する抗腫瘍効果が認められた。腫瘍に縮小には IL-12 が関与しており、生体内の NK 細胞、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞が誘導され抗腫瘍効果を示すことがわかった。この治療の臨床への応用が期待された。

A. 研究目的

末期消化器癌に対しては、副作用が少なくかつ効果的な新規治療の開発が急務であるが、その一つの候補として免疫療法が期待されている。しかし、消化器癌は一般的に低免疫原性であり、さらに進行癌患者では免疫機能も低下していることが予想される。これまでの臨床試験からも、消化器癌に対する免疫治療は比較的效果が乏しいことが考えられる。そこで我々は、強力な免疫を誘導するため、樹状細胞と IFN- α 、CpG 併用による免疫治療の抗腫瘍効果、ならびにその作用機序を検討した。

B. 研究方法

消化器癌細胞株として、マウス大腸癌細胞株 MC38 を用いた。樹状細胞と、IFN- α

遺伝子を導入した MC38 細胞

(MC38-IFN α)、CpG とを混合培養し、樹状細胞のフェノタイプ、サイトカイン産生やアロリンパ球刺激能を測定した。*In vivo* の治療モデルとして、野生株腫瘍を皮下接種して腫瘍を形成したマウスに対し、樹状細胞と MC38-IFN α 、CpG を投与した後、野生株腫瘍の大きさを測定した。同モデルで野生株腫瘍内に浸潤している免疫細胞を、免疫組織染色で観察した。また、抗体で生体内の免疫細胞を除去したマウスに対し、樹状細胞と MC38-IFN α 、CpG を投与した後に、野生株腫瘍を接種し、皮下腫瘍の形成を観察した。さらに、樹状細胞と MC38-IFN α 、CpG で免疫したマウスの脾臓から、腫瘍特異的 CTL の誘導を試みた。

(倫理面への配慮)

昭和大学動物実験委員会に動物実験実施申請書を提出し、倫理規定と照合された結果、実験実施の承認を得た。

C. 研究結果

MC38-IFN α との混合培養後、樹状細胞は成熟していた。*In vivo*の実験系で、樹状細胞とMC38-IFN α 、CpGによる治療は、腫瘍形成予防効果や、既存の腫瘍の発育抑制効果を認めた。腫瘍に縮小にはIL-12が関与しており、生体内のNK細胞、CD4陽性細胞、CD8陽性細胞が誘導され抗腫瘍効果を示すことがわかった。

D. 考察

MC38-IFN α 、CpGとの混合培養で樹状細胞は形態的、機能的成熟が認められた。さらに、実際の*in vivo*の実験でも、予防や治療において抗腫瘍効果が確認された。成熟した樹状細胞は未成熟なものと比較し、より高い抗腫瘍効果が期待できる。今後の臨床への応用も期待できると考えられた。

E. 結論

樹状細胞とIFN- α 遺伝子導入細胞、CpGの併用療法は、マウス消化器癌に対し抗腫瘍効果が認められ、今後、臨床応用が期待できると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Intrahepatic status of regulatory T cells in

autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis. Sakaki M, Hiroishi K, Baba T, Ito T, Hirayama Y, Saito K, Tonoike T, Kushima M, Imawari M. *Hepatology* 38 (4): 354-361, 2008.

2) Immune Responses in HCV Infection and Mechanisms of HCV Persistence. Hiroishi K, Ito T, Imawari M. *J Gastroenterol Hepatol* 23 (10): 1473-1482, 2008.

3) Dendritic cells stimulated with CpG oligodeoxynucleotides and IFN-alpha-expressing tumor cells effectively reduce outgrowth of established tumors *in vivo*. Hiraide A, Hiroishi K, Eguchi J, Ishii S, Doi H, Imawari M. *Cancer Sci* 99 (8): 1663-1669, 2008.

2. 学会発表

1) Efficacy and mechanism of dendritic cell-based immunotherapy with CpG and IFN-alpha-expressing tumor cells for murine colorectal cancer. Doi H, Hiroishi K, Hiraide A, Eguchi J, Ishii S, Matsumura T, Sakaki M, Imawari M. 2008 American Association of Cancer Research 99th Annual Meeting.

2) 樹状細胞とインターフェロン α 、CpG併用療法による抗腫瘍効果の作用機序。広石和正、平出綾子、江口潤一、坂木理、土肥弘義、井廻道夫。第94回日本消化器病学会総会

3) 肝細胞癌患者の治療前後における各種腫瘍抗原に対する細胞性免疫応答。江口潤一、広石和正、井廻道夫。第44回日本肝臓学会総会

4) C型急性肝炎におけるHCV特異的 CTL応答の解析. 土肥弘義、広石和正、井廻道夫. 第12回日本肝臓学会大会. シンポジウム「肝炎ウイルス感染と免疫」

5) Magnitude of HCV-specific CD8+ T cell responses and severity of hepatitis do not determine the outcome in acute HCV infection. Doi H, Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Imawari, M.

The Liver Meeting 2008, The 58th Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases

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
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（肝炎分野）
分担研究報告書

肝がんの MICA shedding における ADAM10 の意義

研究分担者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨：MHC Class I-related chain A (MICA) の肝がん細胞からの分泌は細胞膜上の MICA 発現の低下と免疫細胞の NKG2D 発現の低下を引き起こし肝がんに対する生体の認識機構を障害する。これを媒介する MICA sheddase についてその実態が十分理解されていなかったが、肝がん細胞を用いた a disintegrin and metalloproteinases (ADAM) ファミリーのノックダウン実験により、ADAM10 が関与していることを明らかにした。さらに、肝がんに対する TACE 治療で汎用される epirubicin が ADAM10 の発現を転写レベルで低下させ、これにより MICA の分泌を阻害することを明らかにした。

A. 研究目的

肝がんでは MICA (MHC class I-related chain A) が高発現しており、NK 細胞における NKG2D 活性化レセプターがこれを認識することにより免疫系が活性化される。しかし、肝がんでは疾患が進行するに伴い、MICA が不明の機序で細胞膜上で切断され、これが血中に放出される。この MICA shedding は肝がんにおける細胞膜上の MICA 発現量を低下させるとともに、可溶性の MICA が NKG2D をダウンレギュレーションすることにより、免疫系の反応性を低下させる。肝がんにおける MICA sheddase を同定することは、新規の免疫治療法を構築する上で重要であると考えられる。

B. 研究方法

肝がん細胞株において siRNA を用いて種々の ADAM (a disintegrin and metalloproteinases) ファミリー蛋白のノックダウンを行った。培養上清中の可溶性 MICA を ELISA にて測定し、膜結合型 MICA の発現を FACS で評価した。MICA のリーダーシーケンスと $\alpha 1$ ドメインの間に Myc-Tag を挿入したプラスミドを作成した。これを細胞株にトランスフェクションすることにより、細胞内の MICA と培養上清中の MICA のサイズを免疫沈降ウエスタン法にて検討した。TACE 治療で汎用される epirubicin を肝がん細胞株に添加し、ADAM10 の発現および MICA shedding を

検討した。

C. 研究成果

HepG2、PLC/PRF/5 細胞株において ADAM10 をノックダウンすると培養上清中の可溶性 MICA 濃度が低下し、膜結合型 MICA の発現が増強した。この際、MICA mRNA の発現レベルに変化はみられなかった。培養上清中あるいは細胞内の Myc-MICA は糖鎖修飾を受けており、N-glycanase 処理により前者は SDS-PAGE 上 36 kDa、後者は 43 kDa であり、翻訳後修飾を受けていることが示された。HepG2、PLC/PRF/5 細胞株に non-toxic dose の epirubicin を添加すると ADAM10 の発現が mRNA および蛋白レベルで低下し、MICA shedding が低下した。肝がん細胞株に ADAM10 siRNA を導入し epirubicin 処理をすると、ADAM10 欠損細胞では epirubicin による MICA shedding の低下が消失した。

D. 考察と結論

肝がん細胞における MICA shedding には ADAM10 が関与していた。Epirubicin は肝がん細胞における ADAM10 の発現を低下させ、これにより MICA shedding を阻害した。我々は肝がんに対する TACE 治療が血中可溶性 MICA を低下させ、NK 細胞や CD8 陽性細胞の NKG2D 発現を改善することを報告しているが、このメカニズムとして epirubicin による ADAM10 低下作用が介在することが示唆された。ADAM10 は肝がんの免疫病態を改善する治療標的となる可能性がある。

E. 研究発表

論文発表

1. Toyama T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Oze T, Nakanishi F, Mochizuki K, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. A New Prognostic System for Hepatocellular Carcinoma Including Recurrent Cases: A Study of 861 Patients in a Single Institution. *J Clin Gastroenterol* 42: 317-322, 2008
2. Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Hikita H, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Ohkawa K, Hayashi N. Dendritic cell-based vaccines suppress metastatic liver tumor via activation of local innate and acquired immunity. *Cancer Immunol Immunother* 57: 1861-1869, 2008.
3. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Kasugai T, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Serum levels of soluble MHC class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and the changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 99 1643-1649, 2008
4. Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Yamamoto M, Fujita Y, Miyagi T, Ohkawa K, Hayashi N. Decreased expressions of CD1d molecule on liver dendritic cells in subcutaneous tumor bearing mice. *J Hepatol* 49:779-786, 2008 .

学会発表

The American Association for the Study of Liver Diseases, 59th Annual Meeting AASLD, October 31-November 4, 2008, San Francisco

- EFFICACY OF THE IMMUNOTHERAPY WITH POLY γ -GLUTAMIC ACID NANOPARTICLES IN MOUSE LIVER TUMOR. Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Yamamoto M, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Koga K, Uemura A, Sakamori R, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Akagi T, Akashi M, Hayashi N.
- EXPRESSION OF NKG2D ACTIVATING RECEPTOR ON NATURAL KILLER CELLS IN CHRONIC HEPATITIS C. Shimizu S, Takehara T, Miyagi T, Kodama T, Yamamoto M, Hikita H, Sakakibara M, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Ishida H, Tatsumi T, Ohkawa K, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N.
- ACTIVATED LIVER DENDRITIC CELLS ARE MORE IMMUNOGENIC THAN SPLEEN DENDRITIC CELLS AFTER α -GALCER TREATMENT. Sasakawa A, Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi Y, Yamamoto M, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Kohga K, Sakamori R, Uemura A, Miyagi T,

Ishida H, Ohkawa K, Hayashi N.

- SN38 INHIBITS SHEDDING OF MHC CLASS1-RELATED CHAIN A, A LIGAND OF NKG2D IMMUNORECEPTOR IN HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS. Kohga K, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Yamamoto M, Hikita H, Sasakawa A, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Ohkawa 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

C型慢性肝疾患、肝癌における制御性T細胞の意義

研究分担者 考藤 達哉 大阪大学大学院医学系研究科樹状細胞制御治療学寄附講座准教授

研究の要旨

C型慢性肝疾患における肝病変の進展、肝発癌などには、HCVや癌細胞に対する免疫応答の低下が関与する。HCVや癌による免疫細胞機能低下の機序を解明し、その制御方法を開発することで肝病変の進展や発癌を抑制することが可能となる。制御性T細胞（Regulatory T cell, T_{reg}）は免疫抑制機能を持ち、難治性ウイルス疾患や癌の病態形成に関与している。本年度はC型慢性肝疾患の病態、肝癌に対する治療におけるT_{reg}の関与を検討した。C型慢性肝疾患では、慢性肝炎、肝硬変、肝癌と病期が進展するにつれてT_{reg}頻度が増加した。経カテーテル動脈塞栓術（TAE）やラジオ波焼灼術（RFA）によって完全に腫瘍壊死が得られた群ではT_{reg}頻度は減少したが、十分な腫瘍壊死が得られなかった群では減少しなかった。肝癌治療後に一旦T_{reg}が減少しても再上昇した症例では、その後画像検査で再発が確認された。以上よりC型慢性肝疾患において肝発癌とT_{reg}頻度が関連しており、T_{reg}は肝癌治療の効果判定や再発の指標となる可能性が示唆された。

A.研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は、持続感染が成立すると自然に排除される可能性は極めて低く、慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと進展する。肝癌に対する新たな治療を開発するためには、1)HCV初感染時の持続感染阻止、2)慢性肝炎から肝硬変への進展抑制、3)肝硬変からの発癌抑制、4)肝癌治療後の再発抑制、といった各段階における包括的な対策が必要となる。HCVや癌細胞は種々の免疫細胞の機能異常を来し、持続感染や癌の進展、再発に関与する。HCV感染者や癌患者において、免疫抑制細胞である制御性T細胞（T_{reg}）の増加が報告されている。C型肝癌患者の免疫病態を改善するためには、T_{reg}の臨床的意義を解明し、その制御方法を開発する必要がある。本年度はC型慢性肝疾患患者を対象として、病期進展、肝癌に対する治療効果や再発におけるT_{reg}の意義を明らかにすることを目的とした。

B.研究方法

C型慢性肝疾患患者（慢性肝炎、肝硬変、肝癌患者）と非感染者より採血し、末梢血中のNatural T_{reg}（CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺細胞）の頻度を比較検討した。また高速ソーティングによりNatural T_{reg}を高純度で分取し、CD4⁺T細胞反応に対する抑制機能を病期群間で評価した。肝癌に対する治療（TAE、RFA）前後でT_{reg}頻度と機能を測定し、臨床経過（腫瘍マーカーの変動、肝癌再発など）との関連性を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は大阪大学医学部倫理委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的

問題はないと考える。

C.研究結果

HCV感染者におけるNatural T_{reg}頻度は非感染者に比べ増加していた。また慢性肝炎、肝硬変、肝癌と病期が進展するにつれて頻度は増加した。肝癌患者に限っても、T_{reg}頻度はStage I/IIよりStage III/IVのほうが高く、臨床病期の進展と相関していた。T_{reg}頻度はAFP、PIVKA-IIとは相関しなかった。分取したT_{reg}はCD4⁺T細胞反応を強く抑制したが、病期群間での機能差は認めなかった。肝癌治療により十分な局所腫瘍壊死効果が得られた群では、治療後T_{reg}頻度は低下したが、壊死効果不十分の群では低下しなかった。また治療後にT_{reg}が再度上昇した症例では、その後画像検査で肝癌の再発が認められた。

D.考察

C型慢性肝疾患において、肝発癌、肝癌の進展、肝癌治療効果や再発とT_{reg}頻度が相関することが明らかになった。T_{reg}は癌細胞に対するNK細胞、細胞障害性T細胞（CTL）やTh1細胞の機能を抑制することが知られており、T_{reg}が肝癌に対するEffectorの機能を抑制することで、癌の発症・進展に関与していると考えられる。

E.結論

C型肝癌の発症・進展にT_{reg}が関与しており、肝癌治療効果判定や再発予測のBiomarkerとしても有用であることが示された。

F.健康危険情報 なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Kanto T. Virus-associated innate immunity in liver. *Front Bioscience* 2008. 13. 6183-6192
- 2) Miyazaki, M., et al. Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I. *J Med Virol* 2008. 80: 980-988.
- 3) Kohga, K., et al. Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008. 99: 1643-1649.
- 4) Toyama, T., et al. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma including recurrent cases: a study of 861 patients in a single institution. *J Clin Gastroenterol* 2008. 42: 317-322.
- 5) Kanada, A., et al. Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatology Res* 2008. 38: 622-628.
- 6) Kurashige, N, et al. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of the YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatology Res* 2008, 38: 450-456.
- 7) Shinzaki, S., et al. IgG oligosaccharide alterations are a novel diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2008. 103: 1173-1181.
- 8) Egawa, S., et al. Upregulation of GRAIL is associated with remission of ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008. 295: G163-G169.

2. 学会発表

- 1) Kanto, T: NK and NKT-dendritic cell interactions in HCV infection
Hepatic Inflammation and Immunity 2008
(Galveston, TX, USA 1.25~27 2008)
- 2) Kanto, T: Dendritic cell as a versatile controller of innate and adaptive immune response against hepatitis C virus
The 10th International Symposium on

Dendritic Cells

(Kobe, Japan 10.1~5 2008)

- 3) Miyazaki, M: Impaired TLR/RIG-I-mediated innate immunity in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C patients (poster award)
The 10th International Symposium on Dendritic Cells
(Kobe, Japan 10.1~5 2008)
- 4) Sakakibara M: Novel mature dendritic cells inducible from monocytes with OK432, PGE1 and IFN- α serve as potent vaccine vehicles for gastrointestinal cancers (poster award)
The 10th International Symposium on Dendritic Cells
(Kobe, Japan 10.1~5 2008)
- 5) Itose, I: Dynamic changes of regulatory T cell subsets in patients with chronic HCV infection in relation to the degree of liver inflammation
The Liver Meeting AASLD 59th Annual Meeting and Postgraduate Course
(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)
- 6) Takebe, S: IL-7 as a booster of Th2 differentiation by modulating myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection
The Liver Meeting AASLD 59th Annual Meeting and Postgraduate Course
(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)
- 7) Kakita, N: Natural regulatory T cells as biomarker for the assessment of hepatocellular carcinoma in local ablation therapy
The Liver Meeting AASLD 59th Annual Meeting and Postgraduate Course
(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特に予定なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Hiramatsu N, (林)	Early decline of hemoglobin can predict progression of hemolytic anemia during pegylated interferon and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C.	Hepato Res	38	52-59	2008
Kurashige N, (林)	Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine.	Hepato Res	38	450-456	2008
Toyama T, (林)	A New Prognostic System for Hepatocellular Carcinoma Including Recurrent Cases: A Study of 861 Patients in a Single Institution.	J Clin Gastroenterol	42	317-322	2008
Miyazaki M, (林)	Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-1.	J Med Virol	80	980-988	2008
Yamaguchi S, (林)	Dendritic cell-based vaccines suppress metastatic liver tumor via activation of local innate and acquired immunity.	Cancer Immunol Immunother	57	1861-1869	2008
Tanaka H, (林)	Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990 to 2003.	Ann Intern Med	148	820-826	2008

Kohga K. (林)	Serum levels of soluble MHC class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and the changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma.	Cancer Sci	99	1643-1649	2008
Ohkawa K. (林)	Supportive role of p core and preS2 genomic changes on establishment of lamivudine-resistance hepatitis B virus.	J Infect Dis	198	1150-1158	2008
Tatsumi T. (林)	Decreased expressions of CD1d molecule on liver dendritic cells in subcutaneous tumor bearing mice.	J Hepatol	49	779-786	2008
Okamoto K., (松浦)	Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation.	J. Virol.	82	8349-8361	2008
Masaki T., (松浦)	Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles.	J. Virol.	82	7964-7976	2008
Aizaki H., (松浦)	A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection.	J. Virol.	82	5715-5724	2008
Okamoto T., (松浦)	A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication.	J. Virol.	82	3480-3489	2008
Tagawa S., (松浦)	Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication.	J. Virol.	82	2631-2641	2008

Tanaka N, (小池)	PPAR-alpha activation is essential for HCV core protein-induced hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma in mice.	J Clin Invest	118	683-694	2008
Newell P, (小池)	Experimental models of hepatocellular carcinoma.	J Hepatol	48	858-879	2008
Koike K, (小池)	Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis.	J Gastroenterol Hepatol	23	S87-91	2008
Ishizaka N, (小池)	Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening	Hepatol Res	38	775-783	2008
Nagase Y, (小池)	Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus.	Hepatol Res	38	252-258	2008
Koike K, (小池)	Prevalence of hepatitis B Virus infection in Japanese patients with HIV.	Hepatol Res	38	310-314	2008
Tanaka N, (小池)	Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis.	Int J Cancer	122	124-131	2008
Ichibangase T, (小池)	Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics.	Biomed Chromatogr		Nov 27. [Epub ahead of print]	2008
Ishizaka N, (小池)	Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test.	Atherosclerosis		Oct 30. [Epub ahead of print]	2008
Koike K. (小池)	Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in Hepatitis C Viral Infection.	J Gastroenterol	44	S82-88	2008
Yanagimoto S, (小池)	A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signal transduction and subcellular localization.	J Biol Chem		Dec 8. [Epub ahead of print]	2008

Hongo M, (小池)	Administration of angiotensin II, but not catecholamines, induces accumulation of lipids in the rat heart.	Eur J Pharmacol		Dec 10. [Epub ahead of print]	2008
上田啓次 (上田)	Kaposi肉腫-最新の知見	皮膚病診療	30	1344-1348	2008
Ohsaki, E., (上田)	Accumulation of LANA at Nuclear Matrix fraction is important for Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Replication in Latency.	Virus Research	139	74-84	2009
Takahama Y. (井戸)	Association of a genetic polymorphism in ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 with hepatitis C virus infection and hepatitis C virus core antigen levels in subjects in a hyperendemic area of Japan.	J Gastroenterology	43 (12)	942-950	2008
Kodama M. (井戸)	Endoscopic characterization of the small bowels in patients with portal hypertension evaluated by double balloon endoscopy.	J Gastroenterology	43 (8)	589-596	2008
Iida, N., (中本)	Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice.	J. Leukoc. Biol.	84 (4)	1001-1010	2008
Mizukoshi, E., (中本)	Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma.	J. Hepatol.	49 (6)	946-954	2008