

200831015A

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

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する 新規診断・治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

平成21(2009)年3月

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

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する
新規診断・治療法の開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成21（2009）年 3月

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

研究組織

研究代表者		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
研究分担者		
竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学	准教授
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
前川 伸哉	山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座	講師
田中 靖人	名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学	准教授
花田 賢太郎	国立感染症研究所細胞化学部	部長
菅 裕明	東京大学先端科学技術研究センター	教授
堀本 勝久	産業技術総合研究所生命情報工学研究センター	研究チーム長

目 次

I. 総括研究報告

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

金子 周一 ----- 1

II. 分担研究報告

1. C型肝炎におけるインターフェロン治療と免疫細胞のシグナル伝達

竹原 徹郎 ----- 9

2. ヒト肝組織および末梢血を用いたプロテオーム診断法の開発

宇都 浩文 ----- 12

3. 末梢血ジェノミクスを用いたウイルス性肝炎医療の開発

前川 伸哉 ----- 15

4. B型肝炎ウイルス感染キメラマウスおよび培養細胞系を用いたジェノミクス解析

田中 靖人 ----- 18

5. 脂質代謝系解析を用いたウイルス性肝炎に対する医療開発研究

花田 賢太郎 ----- 21

6. ジェノミクス技術による新規薬剤リードの探索研究

菅 裕明 ----- 23

7. 統計的因果推定法に基づくジェノミクス解析法の研究	
堀本 勝久	25
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	35

I. 総括研究報告

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）
総括研究報告書（平成 20 年度）

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

研究代表者：金子周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：

ウイルス性肝炎における包括的転写産物および蛋白解析、包括的脂質解析、包括的薬物探索、統計的ジェノミクス解析を実施した。研究の技術的要素は、1) トランスクリプトーム（翻訳）研究、2) プロテオームおよびリポドーム研究、3) ジェノミクス情報処理の研究に分類され、解析対象は治療前後のウイルス肝炎肝組織（肝細胞）、キメラマウス肝臓、肝細胞がん、血液、および免疫系を用いた。本研究は3年計画で進行しており、2年目にあたる本年度の成果を記載した。

金子はB型およびC型肝炎を構成する micro-RNA の違いを明らかにした。また、インターフェロン前後の肝組織および末梢血を用いた発現遺伝子解析から、インターフェロン反応性に関連する遺伝子を明らかにし、血液を用いた診断の候補遺伝子を抽出した。前川は、PEG-IFN/RBV 併用療法開始前に採取した末梢血単核球の解析において、無効例では ISG15、USP18 の末梢リンパ球での発現が有意に亢進し、一方 RIG-I/IPS-1 比は逆に、無効例で低下していることを示した。竹原はC型慢性肝炎ではNK細胞においてインターフェロン反応性が低下していることを示した。NK細胞におけるIFN- α 刺激による誘導遺伝子発現は、健常者に比しC型慢性肝炎で、pSTAT1シグナル下流の *Sox1* が有意に増強、pSTAT4シグナル下流の *Ifn- γ* が有意に減弱していた。宇都は、SELDIプロテインチップを用いた肝細胞がんの早期診断の可能性を示し、さらにMALDI-TOF/MS解析によって血清MnSOD測定が肝病変の進展マーカーである可能性を示した。また、ALT正常の慢性肝炎症例に有意に見出されるマーカーを明らかにした。田中は、免疫状態がヒトと大きく異なるヒトキメラマウスのHBV感染系を作成し、HBVの違いによって肝線維化が生じることを明らかにした。線維化にかかわるウイルス責任領域の解析、線維化と関連する発現遺伝子プロファイルの解析を行った。花田は、JFH-1株HCV産生の評価系を構築し、脂肪代謝に関連する各種阻害剤の影響を検討した。堀本は、肝細胞がんにいなるネットワーク解析を行い、特殊な条件下で活性化される分子の特定を行った。菅はNS3およびNS5領域を対象としたRaPID探索を行った。

A. 研究目的

ウイルス性慢性肝炎に対する治療法は、高額で長期にわたり、また副作用も大きい。

しかるにその治療効果は限られており、個々の患者に適した治療法を選択することはむずかしい。そこで本研究は、最新の科学

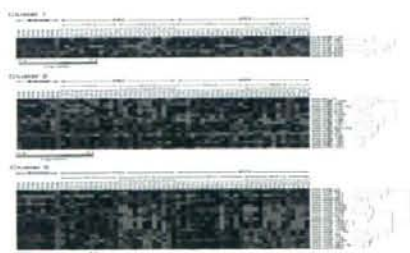
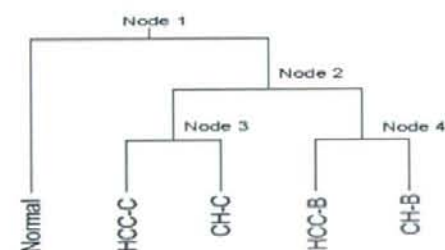
技術を用い、1) 最適な治療法を選択するための分子指標を用いた診断法の開発、2) 治療効果の正確な予測を行うための分子を用いた診断法の開発、3) 分子を用いた新たな治療法の研究開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法と結果

以下に、研究要素毎の研究方法及結果を示した。

(1) B型およびC型肝炎におけるmicro-RNA分子の解析(金子)

12例のB型慢性肝炎、14例のC型慢性肝炎における肝細胞がんおよび背景肝病変を対象として188種類のmicro-RNAを解析した。包括的な解析では下図に示すようにhierarchical clustering解析にて、B型およびC型の慢性肝炎および肝細胞がんが分類された。



それらは、上図に示すように、正常と慢性肝疾患はcluster 1 micro-RNAによって、B

型とC型はcluster 2 micro-RNAによって、さらに慢性肝炎と肝細胞がんはcluster 3 micro-RNAによって分類されていた。このように、B型およびC型の慢性肝炎および慢性肝炎と肝細胞がんの病態はmicro-RNAによっても分類されることから、micro-RNAの発現が疾病の成立に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

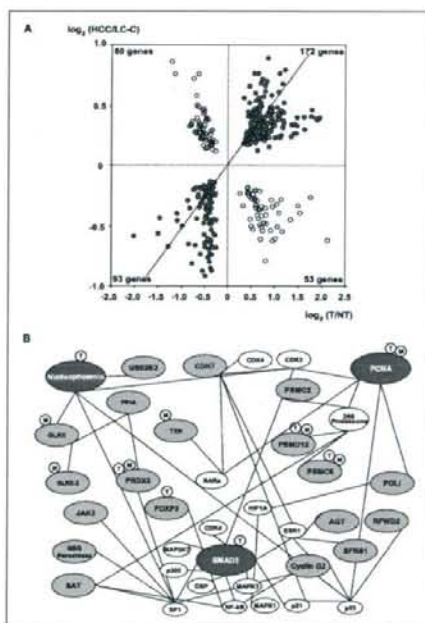
(2) 慢性肝炎および肝細胞がんにおける発現遺伝子解析と末梢血単核球における発現遺伝子解析(金子、前川)

30例のC型慢性肝炎症例を用いて、インターフェロン投与前後において肝組織における包括的な発現遺伝子解析を行った。またレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いて、肝細胞および浸潤リンパ球を分離し、それぞれにおける発現遺伝子解析を行った。インターフェロン投与によってウイルス量が低下しない群ではインターフェロン治療前においてすでにインターフェロン誘導遺伝子群の発現が高く、インターフェロン投与後のインターフェロン誘導遺伝子群の発現上昇は低かった。末梢血単核球を用いた解析でも同様の結果が得られた(金子)。

武蔵野赤十字病院において、PEG-IFN/RBV併用療法を施行したGenotype 1b、高ウイルス量HCV患者の末梢血単核球内自然免疫遺伝子群の発現と治療奏効率との関連について検討した症例群の治療開始前血清を用い、HCV全ゲノムを解析した。PEG-IFN/RBV併用療法開始前に採取した末梢血単核球の解析において、無効例ではISG15、USP18の末梢リンパ球での発現が有意に亢進し、一方RIG-I/IPS-1比は逆に、無効例で低下し

ていた。これら自然免疫分子発現と HCV 遺伝子変異との関連を明らかにするため、現在はこれら症例群 130 例の治療前血清を用いて HCV 全ゲノム解析を行っている。一方、PEG-IFN/RBV 併用療法を行った山梨大学の症例において治療反応性と HCV ゲノムの関連を検討したところ、コア蛋白領域と NS5A 領域における HCV ゲノム多型が治療効果と密接な関連を持つことが明らかとなった（前川）。

肝細胞がんに浸潤しているリンパ球と末梢血単核球における発現遺伝子プロファイルを解析した。外科切除を行った 12 例の C 型慢性肝炎を背景として発症した肝細胞がん材料と、肝細胞がんを伴った C 型慢性肝炎 30 例、肝細胞がんを伴わない 32 例の末梢血単核球を解析した。



それらは上図に示すように、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いて、肝細胞がん細胞および浸潤リンパ球を

分離し、それぞれにおける発現遺伝子解析を行った。その結果、末梢血単核球における発現遺伝子のプロファイルは肝細胞がんに浸潤しているリンパ球のプロファイルを反映しており、そのスクータープロットを図の A に示した。さらに、個々の遺伝子発現の解析から、B に示すごとく、肝細胞がんに浸潤しているリンパ球と末梢血単核球は相互に関連していた。

(3) C 型肝炎におけるインターフェロン治療と免疫細胞のシグナル伝達の研究（竹原）

C 型肝炎患者（遺伝子型 1 型、高ウイルス量；CHC）を対象とし、末梢血単核球を単離した。細胞表面マーカーとして CD56、CD3 により免疫細胞をサブセット毎に区別し、IFN- α によって伝達される細胞内シグナルを phospho-STAT1 (pSTAT1)、pSTAT4 の発現量で、IFN- α により誘導される遺伝子発現の程度を、STAT1 の発現量で FACS 解析にて、*Socs1*、*Inf- γ* 、*Perforin*、*Granzyme-b* 遺伝子発現で Real-time PCR にて評価した。細胞内 STAT1 発現量は、NK 細胞において HC に比し CHC で有意に高かった。NKT 細胞や T 細胞においては有意差を認めなかった。NK 細胞における IFN- α 刺激で誘導される pSTAT の程度は、HC に比し CHC で pSTAT1 は有意に増強、pSTAT4 は有意に減弱し、STAT1 発現量とそれぞれ有意な正相関、逆相関関係を示した。IL-12 や IFN- γ 刺激では有意差を認めなかった。NK 細胞における IFN- α 刺激による誘導遺伝子発現は、HC に比し CHC で、pSTAT1 シグナル下流の *Socs1* が有意に増強、pSTAT4 シグナル下流の *Inf- γ* が有意に減弱していた。*Perforin*、

Granzyme-b は減弱傾向を認めた。

(4) ヒト肝組織および末梢血を用いたプロテオミクスによるウイルス性肝疾患のバイオマーカー探索 (宇都)

肝がん患者血清中に出現する分子量約 8100Da の C3a 断片の出現メカニズムの検討するために、HepG2 もしくは huH 7 細胞の培養上清に分子量約 9100Da の C3a タンパクを添加し、培養上清中のタンパク質を SELDI TOF/MS により解析した。分子量が約 8900 Da のピーク値が出現するものの、分子量 8100 Da のタンパクピークは出現しなかった。

慢性肝炎患者よりも ALT 持続正常者で血清中の発現ピーク値が有意に高値であった Complement component 4 (C4) 断片と同定した。9 年間経過観察が可能であった HCV 感染既往 (HCV 抗体陽性、HCV RNA 陰性) 者と HCV 関連肝疾患 16 例 (ALT 持続正常 4 例、慢性肝炎 6 例、肝硬変 6 例) の血清を用いて C4a 濃度を再度評価した。9 年間の ALT 値の推移は、HCV 感染既往者と比較して、HCV 感染 ALT 持続正常者では有意に C4a 濃度が高値であった。一方、HCV 感染による慢性肝炎や肝硬変では C4a 濃度は ALT 持続正常者よりも有意に低値であった。

初代培養ヒト肝細胞に過酸化水素を用いて酸化ストレスを負荷し、誘導されたタンパクのうちの一つを MnSOD と同定した。そこで、MnSOD 濃度を HCV 関連肝疾患患者で比較検討した。血清 MnSOD 濃度は健常者と慢性肝炎患者では有意差がなく、肝がん患者は健常者もしくは慢性肝炎患者と比較し、それぞれ有意に高値であった。

(5) 脂質代謝系解析を用いたウイルス性肝炎に対する医療開発研究 (花田)

HCV 産生に対する各種宿主脂質代謝 (制御) 過程について、主に脂質代謝制御剤を用いた解析を行った。評価系としては培養細胞を用いた HCV 産生系を利用した。ヒト肝細胞由来の Huh7. 5. 1 細胞を用いて JFH-1 株 HCV 産生の評価系を構築した。Huh7. 5. 1 細胞に HCV を感染後、経時的に培養液中及び細胞中のウイルス産生を調べた。この系を用いて阻害剤の影響を検討した。PPAR α のアゴニストまたはアンタゴニストで細胞を処理した際の HCV 産生に対する影響を調べたところ、PPAR α アゴニストでは HCV 産生に対して全く影響を示さなかった。しかし、PPAR α アンタゴニスト GW6471 は IC₅₀ < 10 μ M で有意に HCV 産生を阻害した。様々な PPAR γ アゴニストを用い、HCV 産生阻害能について検討した。その結果、Troglitazone, Ciglitazone, Rosiglitazone, GW1929 など調べた全ての化合物で有意に HCV 産生が阻害された。また、これら化合物は HCV 複製を (少なくとも) 阻害することも明らかとなった。また、PPAR γ の生理的なりガンドと考えられている 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15-dPGJ₂) も HCV 産生を阻害した。PPAR γ アンタゴニスト GW9662 では影響を受けなかった。15-dPGJ₂ 以外にも高度不飽和脂肪酸代謝物で HCV 産生阻害能があるものはないかと、様々な高度不飽和脂肪酸代謝物の HCV 産生に対する影響を調べた。その結果、8, 15-di-HETE 等いくつかの代謝物で HCV 産生阻害活性が認められた。

(6) B型肝炎ウイルス感染キメラマウスおよび培養細胞系を用いたジェノミクス解析 (田中)

HBV 感染後のキメラマウス肝臓組織を病理学的・分子生物学的に解析し、臨床病態で観察されている遺伝子の変化と HBV 遺伝子型や点変異が肝臓に及ぼす影響を比較検討した。キメラマウス肝臓から RNA を抽出しマイクロアレイによる解析に使用した。線維化進展群と非進展群、非感染群を用意し遺伝子発現プロファイルの比較解析を行った。感染期間が6ヶ月経過した群での線維化進展群では TIMPs、MMPs、COL1a2 といった線維化関連遺伝子の発現の亢進が見られ、非線維化進展群に対して有意差を示した。HBV 抗原の蓄積と肝細胞の病理学的形態変化も線維化亢進群において多く観察された。

感染期間が3ヶ月での検討では、線維化関連遺伝子の発現はすでに見られ、非線維化群に対して有意差を示した。しかしながら、HBV 抗原蓄積と肝細胞の形態変化はわずかであり、これらの変化は時間に依存したものであると考えられた。続いて、キメラマウス肝臓の遺伝子発現解析を行い、線維化進展群と非進展群の比較を行ったところ、線維化進展群では脂質、カルボン酸、アルコール、酸化代謝といった代謝に関連する経路の活性が全般に減少していた。一方で、発現が亢進した経路としては、WNT、NOTCH 及び TGF- β 1 シグナル経路が見出された。線維化非進展群ではタンパク合成に関わる経路が亢進していた。

(7) 統計的因果推定法に基づくジェノミクス解析法の研究 (堀本)

2つの細胞内ネットワーク構造変化解析手法を開発した。手法の一つは、計測データから時間的に異なるネットワーク構造を推定する方法であり、もう一つは、文献データに基づいて構築された既知ネットワーク構造とその構成分子に関する計測データとの整合性を評価する方法とした。構造推定法により肝臓がん進展過程において肝硬変から肝臓がん疾患が進展する遺伝子群間の因果関係を推定した。構造評価方法によって、複数のネットワーク構造を収納したネットワークデータベースに対し、ある特定の条件下で計測したデータとの整合性を網羅的に評価し、活性化ネットワークの検索が可能になることを示した。

(8) ジェノミクス技術による新規薬剤リードの探索研究 (菅)

RaPID (Random Peptide Integrated Discovery) システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてた。また、昨年開発に成功した RaPID ディスプレイ法を用い、標的蛋白質への阻害剤の迅速探索を行った。RaPID ディスプレイ法を用いて、HCV 関連標的 NS3 プロテアーゼ(-HisT)、NS5A(-HisT)、LEL(-GST-biotin) ドメインに対し、特殊環状ペプチド阻害剤の探索を行った。いずれの標的に対しても、特殊環状ペプチドの濃縮に成功し、前者2つの標的に関しては、既に特殊ペプチドの配列情報も取得した。後者については、現在進行中。今後、これらの代表的なペプチドに関して化学合成を行い、その生理活性を探る予定である。

C. 考察

肝組織内の肝細胞、浸潤リンパ球、免疫担当細胞、および血液をジェノミクス解析

することにより、ウイルス慢性肝炎におけるウイルスと宿主の反応が検討された。また、インターフェロン投与時における、これら細胞における変化と治療抵抗性との関連が解析研究された。

これまで包括的な発現遺伝子解析（トランスクリプトーム）によって得られた結果に加え、これらの発現遺伝子の発現に大きく関与すると考えられる micro-RNA の発現解析が行われた。本研究によって、micro-RNA の発現においても、感染しているウイルスの違い、病態の違いが明確に示されたことは、micro-RNA 研究が疾病の病態を理解する上に重要であるだけでなく、これを標的とする治療法の開発や診断法の開発に有用であることが示された。

インターフェロン投与によって、宿主の遺伝子発現が変動し、インターフェロン治療効果と関連することが報告されてきた。今回の解析によって、さらにインターフェロン治療抵抗性の病態が詳細に解明されただけでなく、末梢血単核球を用いたインターフェロン反応性診断に必要な遺伝子群が抽出された。また、末梢血 NK 細胞内のシグナル伝達を測定することによりインターフェロン反応性診断の可能性が示された。今後さらに、ウイルスのゲノム情報を付加される予定である。

本研究により、肝細胞がんと浸潤リンパ球および末梢血単核球の解析から胆がん状態の免疫状態を知ることが出来た。加えて、末梢血単核球の解析により肝細胞がんの早期診断や病態診断が可能であることが示唆された。

プロテオーム解析によっても血液を用いた新たな肝細胞がんの診断、慢性肝炎の診断の可能性が示された。すでに、測定を分子が同定されており、今後、多数例の検体を対象とした臨床的な有用性を検証できるレベルにある。

HCV 感染系を用いた脂質代謝を阻害する

薬物の検索、および免疫状態が異なる HBV 感染キメラマウスを用いた肝線維化研究から、新規の治療薬開発の標的となる分子が同定されつつあり、さらにジェノミクス技術と合わせた新たな解析を進めることが重要であると考えられる。

こうしたジェノミクス情報を駆使した新規の診断薬・治療薬候補を抽出する際に情報処理の方法が問題となる。従来の方では多数の遺伝子が候補となるものの、断片的な病態にもとづく結果であったため、候補遺伝子の重要性を検定することが困難であった。今回、造評価法方法によって特定の条件下で計測したデータとの整合性を網羅的に評価することによって、活性化しているネットワークの検索が可能になることが示された。また、ジェノミクス情報をもとに、候補遺伝子を選択し、さらに RaPID 法という新たな方法によって薬物候補が選択できることが示された。今後、さらに重要な分子を対象とした薬物候補が得られることが期待される結果であった。

D. 結論

(1) B 型および C 型肝炎の違いを構成する RNA, micro-RNA 分子から診断の候補マーカーを抽出した。

(2) 末梢血を用いて、インターフェロン反応性予測、および肝がん診断が可能であることを示した。

(3) C 型慢性肝炎では NK 細胞においてインターフェロン反応性が低下していることを示し、治療効果の予測マーカーを探索した。

(4) プロテオーム解析から、肝細胞がんの早期診断マーカー、肝病変の進展マーカーが見出された。ALT 正常の慢性肝炎症例に有意に見出されるマーカーを明らかにした。

(5) HCV 複製系を確立し、複製を阻害する薬物を解析した。

(6) HBV 感染キメラマウスと線維化との関連を明らかにした。

(7) 肝がん にいたるネットワーク解析から特殊な条件下で活性化される分子の特定を行った。

(8) NS3 および NS5 領域を対象とした RaPID 探索を行っている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

「研究成果の刊行に関する一覧」に記載

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし

II. 分担研究報告

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

C型肝炎におけるインターフェロン治療と免疫細胞のシグナル伝達

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：C型肝炎ウイルス感染による慢性化の成立機序および抗ウイルス治療に対する抵抗性メカニズムの解明には、宿主側因子として、免疫担当細胞におけるシグナル伝達や遺伝子発現について包括的に理解する必要がある。今回我々は、NK細胞、NKT細胞、T細胞といった免疫エフェクター細胞におけるIFN- α により伝達されるシグナルや遺伝子発現について解析した。C型肝炎患者（遺伝子型1型、高ウイルス量；CHC）を対象とし、末梢血単核球を単離した。対照に健常者（Healthy control; HC）由来末梢血単核球を用いた。CD56、CD3により免疫細胞を分画毎に区別し、IFN- α による細胞内シグナル伝達をphospho-STAT1(pSTAT1)、pSTAT4、STAT1の発現量でFACS解析にて評価した。IFN- α により誘導される遺伝子発現をReal-time PCRにて評価した。現在までの解析で以下のことが明らかになった。細胞内STAT1発現量は、NK細胞においてHCに比しCHCで有意に高かった。NKT細胞やT細胞においては有意差を認めなかった。NK細胞におけるIFN- α 刺激で誘導されるpSTATの程度は、HCに比しCHCでpSTAT1は有意に増強、pSTAT4は有意に減弱し、STAT1発現量とそれぞれ有意な正相関、逆相関関係を示した。IL-12やIFN- γ 刺激では有意差を認めなかった。NK細胞におけるIFN- α 刺激による誘導遺伝子発現は、HCに比しCHCで、pSTAT1シグナル下流の*Socs1*が有意に増強、pSTAT4シグナル下流の*Ifn-g*が有意に減弱していた。*Perforin*、*Granzyme-b*は減弱傾向を認めた。ウイルス排除に重要な役割を果たすNK細胞においてシグナル伝達や誘導遺伝子発現を含めたIFN- α 反応性が、CHCでは障害されていることが明らかになった。

共同研究者

林 紀夫 大阪大学消化器内科学 教授
宮城琢也 同 特任助教

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスは、高頻度に慢性肝炎を引き起こし、最終的には肝細胞癌を発生させること、また、最先端の抗ウイルス療法でも著効率は5割程度にとどまり治療抵

抗性であることから、C型肝炎ウイルス感染症は大きな健康問題の一つである。抗ウイルス療法の柱はインターフェロン- α (IFN- α)であり、IFN- α により誘導される抗ウイルス蛋白による直接的作用と、IFN- α により誘導される免疫調節作用を介した免疫細胞によるウイルス感染細胞排除作用とによると考えられている。従って、治療抵抗性メカニズムの解明には、免疫細胞におけるIFN- α シグナル伝達や遺伝子発現について包括的に理解する必要がある。本研究においては、免疫細胞、特にNK細胞、NKT細胞、T細胞といったエフェクター機能を有する細胞におけるIFN- α により伝達されるシグナルや遺伝子発現について解析することとした。

B. 研究方法

C型肝炎患者（遺伝子型1型、高ウイルス量；CHC）を対象とし、末梢血単核球を単離した。対照として健常者（Healthy control; HC）由来の末梢血単核球を用いた。細胞表面マーカーとしてCD56、CD3により免疫細胞をサブセット毎に区別し、IFN- α によって伝達される細胞内シグナルをphospho-STAT1(pSTAT1)、pSTAT4の発現量で、IFN- α により誘導される遺伝子発現の程度を、STAT1の発現量でFACS解析にて、*Socs1*、*Inf- γ* 、*Perforin*、*Granzyme-b* 遺伝子発現でReal-time PCRにて評価した。

C. 研究成果

細胞内STAT1発現量は、NK細胞においてHCに比しCHCで有意に高かった。NKT細胞やT細胞においては有意差を認めなかった。NK細胞におけるIFN- α 刺激で誘導さ

れるpSTATの程度は、HCに比しCHCでpSTAT1は有意に増強、pSTAT4は有意に減弱し、STAT1発現量とそれぞれ有意な正相関、逆相関関係を示した。IL-12やIFN- γ 刺激では有意差を認めなかった。NK細胞におけるIFN- α 刺激による誘導遺伝子発現は、HCに比しCHCで、pSTAT1シグナル下流の*Socs1*が有意に増強、pSTAT4シグナル下流の*Inf- γ* が有意に減弱していた。*Perforin*、*Granzyme-b*は減弱傾向を認めた。

D. 考察と結論

今後は、対象をPEG-IFN- α 2b/Ribavirin治療を受けるC型肝炎患者（遺伝子型1型、高ウイルス量）まで広げ、今回検討したIFN- α 反応性についてさらに検討を加える。

すなわち、治療開始前と開始後で末梢血単核球を単離し、実際に治療としてIFN- α が投与された生体におけるシグナル伝達や誘導遺伝子発現について同様の解析を行う。治療前後での結果を比較することにより、治療前にIFN- α 反応性が予測可能かを検討する。また、治療を受けた患者間において、IFN- α によるシグナル伝達様式やシグナル伝達下流の遺伝子発現誘導様式にどのような差異が認められるか、またそれら差異と実際の治療効果との関係をみることにより、治療抵抗性メカニズムの解明や治療効果予測マーカーの探索を行う。

さらに、IFN誘導遺伝子の発現を、今回定量可能となったSTAT1も含めて網羅的に解析することにより、phospho-STATの発現量により示されるIFN- α 反応性の程度と、その下流にある遺伝子発現の程度との関連を、免疫細胞サブセット間および個体間で検討していく予定である。

E. 研究発表

論文発表

1. 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**: 779-86. 2008.
 2. Ohkawa K, Takehara T, Kato M, Deguchi M, Kagita M, Hikita H, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Hayashi N. Supportive Role Played by Precore and PreS2 Genomic Changes in the Establishment of Lamivudine Resistant Hepatitis B Virus. *J Infect Dis.* **198**: 1150-8. 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 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.* **99**: 1643-9. 2008.
- #1518 Critical role of IFN- γ produced from NK cells in IL-12-mediated NK cell activation and anti-tumor effect in the liver. Uemura A, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Yamamoto M, Hikita H, Sasakawa A, Kohga K, Sakamori R, Yamaguchi S, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N.
 - #1587 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, Sasakawa A, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Yamaguchi S, Ishida H, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N.
 - #1803 SN38 inhibits the shedding of MHC class-I 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.

学会発表

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

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

ヒト肝組織および末梢血を用いたプロテオーム診断法の開発
～プロテオミクスによるウイルス性肝疾患のバイオマーカー探索～

研究分担者 宇都浩文

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 講師

研究要旨:今までにプロテオミクスを用いて肝疾患患者血清もしくは初代培養肝細胞から肝癌マーカーC3a-8100、肝機能正常と関連するC4a、酸化ストレスマーカーMnSODを同定している。本年度はそれらのマーカーの意義もしくは臨床的有用性をさらに検証した。肝癌培養細胞にC3a(約9100Da)を添加し、24時間培養後の培養上清中のタンパクを解析すると、分子量が約8900Daのピーク値が出現するものの、分子量8100Daのタンパクピークは出現せず、肝癌患者血清中に出現する分子量約8100DaのC3a断片は肝癌細胞による直接的な作用で出現するものではないことが推察された。また、HCV高感染地区住民から得られた血清を用いてC4aについて検証したところ、以前のデータと同様にC4aはHCV感染により血中濃度が高くなり、特に肝機能正常者で高値となることを再確認した。さらに、HCV感染者における血清MnSOD濃度は非癌患者と比較し、肝癌患者で有意に高値であった。以上のことから、プロテオーム解析を用いたバイオマーカー探索は、肝疾患の新しい診断マーカーや病態と関連する分子を同定できる可能性がある。

A. 研究目的

今までにプロテオミクスを用いて肝疾患患者血清もしくは初代培養肝細胞から肝癌マーカーC3a-8100、肝機能正常と関連するC4a、酸化ストレスマーカーMnSODを同定している。本研究では同定したタンパクの発現メカニズムやC型肝炎ウイルス(HCV)関連肝疾患患者の血清を用いて、同定したタンパクの肝疾患のバイオマーカーとしての有用性を検証することが目的である。

B. 研究方法

1) 肝癌患者血清中に出現する分子量約8100DaのC3a断片の出現メカニズムの検討

培養ヒト肝癌細胞 HepG2 もしくは huH7細胞の培養上清に分子量約9100DaのC3aタンパクを添加し、24時間培養後の培養上清中のタンパク質を SELDI TOF/MSにより解析した。

2) HCV感染ALT持続正常者におけるC4a濃度の再検討

慢性肝炎患者よりもALT持続正常者で血清中の発現ピーク値が有意に高値であった分子量1749m/zのピーク蛋白を Complement component 4(C4)断片と同定している。そこで、9年間経過観察が可能であったHCV感染既往(HCV抗体陽性、HCV RNA陰

性)者とHCV関連肝疾患16例(ALT持続正常4例、慢性肝炎6例、肝硬変6例)の血清を用いてC4a濃度を再度評価した。

3) 初代培養ヒト肝細胞から同定したMnSODのHCV関連患者血清中における臨床的意義の検討

初代培養ヒト肝細胞に過酸化水素を用いて酸化ストレスを負荷し、誘導されたタンパクのうちの一つをMnSODと同定した。そこで、MnSOD濃度をHCV関連肝疾患患者で比較検討した。

C. 研究結果

1) 肝癌培養細胞にC3a(約9100Da)を添加し、24時間培養後の培養上清中のタンパクを解析すると、分子量が約8900Daのピーク値が出現するものの、分子量8100Daのタンパクピークは出現しなかった。

2) 9年間のALT値の推移は、HCV感染既往者と比較して、HCV感染ALT持続正常者では有意にC4a濃度が高値であった。一方、HCV感染による慢性肝炎や肝硬変ではC4a濃度はALT持続正常者よりも有意に低値であった。

3) 血清MnSOD濃度は健常者と慢性肝炎患者では有意差がなく、肝癌患者は健常者もしくは慢性肝炎患者と比較し、それぞれ有意に高値であった。

D. 考察

今までに肝疾患、特に肝癌と関連する可能性のあるタンパク質・ペプチドを数種類同定している。その中で、肝癌患者血清中に出現する C3a 断片(約 8100Da)は、肝癌細胞が直接産生しているわけではなく、また、肝癌から分泌される酵素が直接 C3a の断片化(約 8100Da)に作用している可能性も低いと推察された。免疫学的機序の関与など、さらに検討が必要である。

HCV 感染者の病態は患者により異なり、HCV 感染にもかかわらず、肝炎の活動性はほとんどなく、ALT の正常値が持続し、肝硬変や肝癌に進展する可能性が低い患者が存在する。しかし、その病態は十分解明されていないため、ALT 持続正常者と ALT が高値である慢性肝炎患者血清を用いてプロテオーム解析し、発現量に違いのある C4 断片を見出した。また、プロテオーム解析で得られたタンパクピーク値と ELISA で測定した血清中のタンパク濃度は必ずしも相関しないため、本研究で同定した C4 断片のピーク値と ELISA で測定した C4a 濃度との相関を確認した。さらに、他のサンプルを使って ALT 持続正常 HCV 感染者の C4a 濃度が高値であることを再検証できた。C4a 濃度が ALT 持続正常 HCV 感染者で高値となる機序は解明できていないが、C4a はセリンプロテアーゼなどにより C4 から分解されることが知られており、C4 は肝細胞で産生されることも知られている。HCV 感染によるタンパク分解酵素の誘導などによる C4a 増加や肝障害による肝細胞での産生低下による C4a 低下などの関与が推察されるが、詳細な解析が今後必要である。

C 型慢性肝炎や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)などの病態進展には酸化ストレスが関与する。in vitro で初代培養ヒト肝細胞に酸化ストレスを負荷し、細胞中の MnSOD が酸化ストレスにより増加することを明らかにした。MnSOD は酸化ストレスで増加することや、MnSOD が分泌タンパクであることはすでに知られていたが、HCV 感染者における血清 MnSOD 濃度の臨床的意義は十分明らかにされていなかった。本研究では血清 MnSOD 濃度が肝癌患者で高値となることを明らかにし、血清 MnSOD が HCV 感染者の肝癌マーカーとして有用であると考えられた。NASH でも MnSOD 濃度は高値となる可能性もあり、他の肝疾患を含めた検討や、他の酸化ストレスマーカーと MnSOD との関連についても検討を継続する。

E. 結論

血清中の分子量約 8100Da の C3a 断片、MnSOD は HCV 感染者における肝癌の診断に有用である可能性がある。また、血清 C4a は HCV 感染者の病態進展と関連する可能性がある。このような解析から同定

したタンパクは、肝疾患の病態解明にも役立つ可能性がある。

F. 研究発表

・論文発表

1. Kanmura S, Uto H, Numata M, Hashimoto S, Moriuchi A, Fujita H, Oketani M, Ido A, Kodama M, Ohi H, Tsubouchi H. Human neutrophil peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis. 2009 (in press)
2. Takahama Y, Uto H, Kanmura S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata N, 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 Gastroenterol* 2008, 43: 942-50.
3. 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 bowel in patients with portal hypertension evaluated by double balloon endoscopy. *J Gastroenterol* 2008, 43: 589-596.

・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. 第 105 回日本内科学会総会. 2008 年 4 月(東京都)
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(福岡市)
3. 長谷川将, 熊谷公太郎, 玉井努, 重信秀峰, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷真, 井戸章雄, 坪内博仁: 低体重または肥満を背景とする肝細胞癌の臨床的特長と予後~肝細胞癌の予後予測因子としての BMI の意義. 第 94 回日本消化器病学会総会. 2008 年 5 月(福岡市)
4. 佐藤悠子, 宇都浩文, 高見陽一郎, 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: 血清プロテオーム解析で同定したキニンノーゲン断片は非アルコール性脂肪性肝疾患で増加する. 第 44 回日本肝臓学会総会. 2008 年 6 月(松山市)

5. 児玉真由美, 宇都浩文, 村山貴信, 宮内明美, 岩満章浩, 坂元秀壮, 稲田由紀子, 堀 剛, 沼田政嗣, 坪内直子, 佐々木文郷, 井戸章雄, 坪内博仁:ダブルバルーン内視鏡を用いた門脈圧亢進症患者における小腸病変の評価:第44回日本肝臓学会総会. 2008年6月(松山市)
 6. 高見陽一郎, 宇都浩文, 高濱由香, 玉井 努, 熊谷公太郎, 重信秀峰, 森内昭博, 長谷川 将, 桶谷 真, 井戸章雄, 坪内博仁:[13C]-NBS安定同位体標識法を用いた肝細胞酸化ストレスマーカーの探索:第44回日本肝臓学会総会. 2008年6月(松山市)
 7. 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:第44回日本肝臓学会総会. 2008年6月(松山市)
 8. 赤松絵奈, 宇都浩文, 熊谷公太郎, 須藤正幸, 小原道法, 玉井 努, 重信秀峰, 森内昭博, 長谷川将, 桶谷真, 井戸章雄, 坪内博仁:C型肝炎ウイルス複製を抑制する高機能性食品の探索:第44回日本肝臓学会総会. 2008年6月(松山市)
 9. 石田 洋一, 榊原陽一, 須藤正幸, 竹下正彦, 宇都浩文, 水光正仁, 坪内博仁, 片岡寛章:機能性食品分野におけるプロテオーム解析;エビガロカテキン-3-ガラクト(EGCG)の新規ターゲット蛋白質の同定;日本ヒトプロテオーム機構第6回大会. 2008年7月(大阪市)
 10. 宇都浩文. B型肝炎に対する抗ウイルス療法のガイドライン案. 第50回日本消化器病学会大会. 2008年10月(東京都)
 11. 宇都浩文, 永田賢治, 坪内博仁:男女別に見たHCV抗体陽性者の長期予後:第12回日本肝臓学会大会. 2008年10月(東京都)
 12. 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:第12回日本肝臓学会大会. 2008年10月(東京都)
 13. 呉 建, 山崎成博, 橋口正史, 玉井 努, 宇都浩文, 桶谷 真, 井戸章雄, 藤崎邦夫, 坪内博仁:当院における高齢者肝細胞癌治療の現状と問題点:第12回日本肝臓学会大会. 2008年10月(東京都)
 14. 児玉真由美, 宇都浩文, 村山貴信, 岩満章浩, 坂元秀壮, 稲田由紀子, 堀 剛, 沼田政嗣, 坪内直子, 佐々木文郷, 井戸章雄, 坪内博仁:ダブルバルーン内視鏡を用いた肝硬変患者における小腸病変の評価:日本門脈圧亢進症学会. 2008年11月(福岡市)
 15. 長谷川将, 熊谷公太郎, 呉 建, 馬渡誠一, 玉井努, 重信秀峰, 山崎成博, 森内昭博, 宇都浩文, 桶谷誠, 井戸章雄, 坪内博仁:治療アルゴリズムに基づく当科肝細胞癌治療成績と改善点の検討:第92回日本消化器病学会九州支部例会. 2008年11月(大分市)
 16. 今村也寸志, 桶谷 真, 宇都浩文. 脂肪肝は内臓脂肪の指標になりえるか. 第94回日本消化器病学会総会. 2008年5月(福岡市)
 17. 今村也寸志, 平峯靖也, 樋脇卓也, 馬場芳郎, 田原憲治, 窪菌 修, 草野 健, 桶谷 真, 宇都浩文, 井戸章雄, 坪内博仁. 脂肪肝形成のメカニズムについて(健診データの解析から). 第91回日本消化器病学会九州支部例会. 2008年6月(福岡市)
 18. Uto H, Sato Y, Tanoue S, Ishida Y, Tamai T, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouti H. A fragment of high molecular weight kininogen is upregulated in patients with non-alcoholic fatty liver disease. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease(AASLD). 2008年11月(サンフランシスコ, 米国)
 19. Takami Y, Uto H, Takahama Y, Ishida Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the [13C]-2-nitrobenzenesulfonyl stable isotope labeling method. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease(AASLD). 2008年11月(サンフランシスコ, 米国)
 20. Sasaki F, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hayasi K, Sherri O Stuver, Okanoue T, Tsubouchi H. Characterization of hepatitis C virus carriers with persistently normal alt levels human leukocyte antigen alleles and proteomics. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease(AASLD). 2008年11月(サンフランシスコ, 米国)
- G.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)なし。