

200831022A

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

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の
治療法に関する研究

平成20年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 佐田 通夫

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究1
佐田 通夫

II. 分担・協力研究報告

1. 血管内皮前駆細胞を用いた肝再生療法5
研究代表者 佐田通夫 研究協力者 中村 徹
2. グレリンの肝細胞増殖作用8
研究分担者 児島将康 研究協力者 細田洋司
3. ペプチドワクチンによる肝発癌・病態進展抑制
—複数の HLA タイプ拘束性に細胞性免疫応答を誘導できる HCV コアタンパク質
由来 T 細胞エピトープペプチド—11
研究分担者 伊東恭悟 研究協力者 七條茂樹
4. 九州地域における肝癌発生状況に関する検討16
研究分担者 八橋弘 研究協力者 田浦直太
5. 非B非C慢性肝炎・肝硬変における肝発癌要因解明のための病理形態学的研究・・19
研究分担者 矢野博久 研究協力者 中島收
6. 全C型慢性肝疾患症例の最終転帰22
研究協力者 山崎一美
7. C型肝細胞癌におけるB型肝炎ウイルスの関与27
研究分担者 横須賀收
8. 自己免疫性肝炎における肝硬変進展に関する病態解析32
研究分担者 大平弘正 研究協力者 阿部和道
9. 自己免疫性肝炎における肝癌発生例の検討35
研究分担者 井出達也

10. 肝疾患患者におけるピブリオ・バルニフィカス感染の認識と対策について ー14 医療機関の共同研究からー 慢性肝疾患患者における口腔カンジダ症 ーとくにインターフェロン治療前後の比較ー	41
研究分担者 長尾由美子	
11. C型肝炎を有する乾癬患者の治療の現状調査及び治療方針の確立	48
研究協力者 今福信一	
12. C型肝炎に対する除鉄による肝発癌制御	51
研究分担者 加藤淳二 研究協力者 宮西浩嗣	
13. 分岐鎖アミノ酸のインスリン抵抗性におよぼす影響	55
研究分担者 川口巧	
14. 分岐鎖アミノ酸製剤の肝硬変患者投与時における酸化ストレス、炎症反応に及ぼす 影響について	60
研究協力者 大野智義	
15. 脾臓摘出による肝臓における脂質代謝への影響	62
研究分担者 清家正隆 研究協力者 井上恵・後藤孔郎	
16. 肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究における 生物統計学的解析	64
研究分担者 角間辰之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	67
IV. 研究成果の刊行物	73

I. 総括研究報告

研究要旨

前癌状態及び肝不全に移行する前段階としての肝硬変に対する病態の進展予防及び治療法の確立は早急に実施すべき重要な研究課題である。B型及びC型慢性肝炎、肝硬変に対する抗ウイルス療法については抗ウイルス剤の開発・治療への導入によって病態の進展阻止が可能となったが、まだ完全なものではなく検討すべき多くの問題点も残されている。このような問題点を解決するために肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法の開発と病態進展を阻止するための対策及び予防法を確立することが目的である。我々の研究は2つのコンセプトによって構成されており、その1つは新規治療法の開発であり、血管内皮前駆細胞を用いた肝再生療法のヒトへの応用と治療法の確立と、C型肝炎に対するペプチドワクチンによる病態進展阻止と発癌予防法の確立である。もう一つは合併症に対する臨床病態を解析することによって慢性肝炎、肝硬変の病態進展阻止及び改善をはかるための対策及び治療法を確立することである。このような研究成果は早急に国民に還元する必要があるため市民に公開講座などを通じた啓発活動にも重点をおいている。

研究分担者（所属施設名・職名）

横須賀 收	千葉大学大学院医学研究院	教授
児島 将康	久留米大学医学部 分子生命研究科学研究所	教授
大平 弘正	福島県立医科大学医学部 内科学第二講座	教授
角間 辰之	久留米大学医学部 バイオ統計センター	教授
伊東 恭悟	久留米大学医学部 免疫・免疫治療学講座	教授
矢野 博久	久留米大学医学部 病理学講座	教授
八橋 弘	国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター	治療研究部長
加藤 淳二	札幌医科大学 第四内科	教授
清家 正隆	大分大学医学部 肝疾患相談センター	診療准教授
長尾 由実子	久留米大学医学部 消化器疾患情報講座	准教授
川口 巧	久留米大学医学部 消化器疾患情報講座	講師
井出 達也	久留米大学医学部 内科学講座消化器内科部門	講師

研究協力者（所属施設名・職名）

山崎 一美	奈良尾病院	院長
大野 智義	社会保険中京病院	部長
今福 信一	福岡大学医学部 皮膚科学講座	講師

A. 研究目的

肝細胞癌の背景肝病変であり、肝不全の前段階としての肝炎・肝硬変に対する既存の抗ウイルス療法とは異なる病態進展予防策の確立と新規治療法の開発を目的とする。

肝疾患患者には種々の合併症が認められ、また多くの病態進展要因が存在する。そこで種々

の合併症や病態進展に関わる要因を明らかにするための大規模疫学調査を実施する。この調査によって得られた病態促進因子を除去、改善するための治療法の開発を目指す。ここで実施する調査・解析には生物統計学を専門とする共同研究者の介入を基本とする。

我々はこれまで血管内皮前駆細胞を用いた肝再生療法の確立に向けた基礎研究を継続し、

成果を挙げた。久留米大学倫理委員会の承認を得て、ヒトへの応用が既に開始されているが、本研究班でヒトへの臨床応用をさらに推進し、治療法の改善に向けた臨床研究をおこなう。また我々は C 型肝炎患者への投与可能なペプチドワクチンの開発に成功し、既に多数の C 型肝炎患者に対して臨床応用がなされ、抗ウイルス効果も確認している。このペプチドワクチンを複数の HLA タイプに対応し得るよう改良し、この新型ペプチドワクチンを用いた肝癌発症予防を視野に入れた臨床試験を実施する。

B. 研究方法

1. 肝臓移植を希望しない非代償性肝硬変症患者を対象に自己末梢血単核球細胞移植による肝再生療法を実施する。消化管ホルモンであるグレリンが肝細胞増殖に及ぼす影響を基礎と臨床の両面から検討し、肝再生療法への応用を目指す。
2. 異なるグループ HLA タイプにまたがって CTL 誘導能を有する HCV ペプチドワクチンを開発し、臨床への導入を検討する。
3. 非 B 非 C 型肝炎の発生状況と成因、特徴、病理形態学的特徴を疫学、臨床、病理学的面から解析を行う。
4. C 型肝炎患者の長期予後、死因を疫学調査によって明らかにし、病態進展に関わる因子を明らかにする。
5. C 型肝炎細胞癌における B 型肝炎ウイルスの関与を明らかにする。
6. 自己免疫性肝炎の中で肝硬変、肝癌に進展する例の実態を明らかにし、進展阻止に向けた治療、予防法を検討する。
7. 慢性肝炎、肝硬変の生命予後に関わることが示されているピブリオ・バルニフィカス感染症に対する患者の認知度をアンケート調査し、この感染症を予防するための指針作りを目指す。

す。

8. 慢性肝疾患患者の QOL、予後の改善を目指した口腔及び皮膚疾患の病態解明と特異的治療法の開発を目指す。
9. 慢性肝疾患の病態進展や肝発癌に関わることが指摘されている肝細胞内への鉄貯蔵とインスリン抵抗性について検討すると共に、これらの病因を改善するための治療法の開発を行う。
10. 肝硬変の病態におよぼす脾摘の効果について検討する。

C. 研究結果

1. 非代償性肝硬変患者 3 名に対して自己末梢血単核球細胞移植療法を施行した。現時点では肝再生に関する統計学的有意差を検討できる段階ではないが child-Pugh スコア、MELD スコアの改善傾向を確認している。グレリンの肝細胞増殖作用では、このホルモンの副交感神経系を介する肝血流増加作用と DMN 肝障害モデル動物での肝障害改善作用が確認された。
2. ペプチドワクチンでは異なる HLA タイプに合わせたペプチドワクチンを用意しなければならないという問題点があった。HCV コア蛋白由来ペプチドが HLA-A2 以外にも、HLA-A24 拘束性キラー T 細胞誘導活性を有することが立証され、このことから少数のペプチドでより多く患者に対してワクチン投与ができる可能性が示唆された。
3. 九州地区の肝疾患専門施設 (21 施設) における 1990 年から 2008 年までの過去 13 年間の肝疾患患者状況についての調査研究を実施した。登録症例 7579 例のうち HCV 関連肝癌 68.6% (5198 例)、HBV 関連肝癌 15.0% (1137 例)、非 B 非 C 肝癌 15.0% (1134 例)、B+C 関連肝癌 1.5% (110 例) であった。これらの症例の解

析によって HCV 関連肝癌の頻度が減少し、HBV 関連肝癌は変化がなく、非 B 非 C 関連肝癌が有意に増加している。またいずれの肝癌も診断時の年齢が高齢化していることが明らかになった。一方、非 B 非 C 型肝癌のリスク因子の探索を生物統計学の手法を用いて現在解析を行っている。増加が予想される非 B 非 C 型肝癌の発癌要因を解明するために、九州地区で経験された非 B 非 C 肝癌例の病理組織像を検討した。その結果、発癌要因として糖尿病を含む代謝性疾患、NASH などの病態が関与している可能性が示唆されたが、他の病因についても今後詳細に検討する必要があることが推察された。

4. HCV-RNA 陽性が確認された C 型慢性肝疾患患者 812 例の長期観察結果が明らかにされた。観察期間中 336 名の死亡例が確認され、その中の肝癌死 129 例 (38.4%)、肝不全死 21 例 (6.3%)、消化管出血死 3 例 (0.9%)、他病死 174 例 (51.8%)、死因不明 9 例 (2.7%) で、他病死の中で最も多い死因は悪性腫瘍であった。一方、死亡した 336 例の中で 172 例 (51.2%) が肝硬変に進展していることが明らかになった。

HCV 関連肝癌において血中 HBc 抗体又は HBs 抗体陽性者の 63% (16 例中 10 例) に HBV-DNA が検出された。一方、integrated form を検出し得る Alu 配列と HBV-DNA の配列との PCR では増幅は認められていない。

6. 自己免疫性肝炎における肝硬変進展例の実態を明らかにするための調査表が作成され、症例の登録が開始された。これまでに 161 例の登録がなされており、今後も登録が続けられ、その症例をもとに病態の解析がなされる。

一方、後方視的研究として自己免疫性肝炎 180 例を対象に肝発癌例 6 例についての解析が行われた。肝癌 6 例はいずれも肝硬変進展例であ

り、ALT 値異常持続例であったことが明らかにされた。

7. 全国 14 の医療機関において、肝疾患を有する患者がピブリオ・バルニフィカス感染について知識があるかなどのアンケート調査を実施した。その結果、同感染症に対する認知度は低く感染予防に対する認知度も低く、不十分である事実が明らかになった。そこで肝疾患々々者へのピブリオ・バルニフィカス感染症に対する正しい知識を普及するための小冊子を作成し、関連医療機関などに配布した。

8. 肝疾患患者に対するオーラルメディシンを確立し広めることを目的に C 型肝炎患者での口腔カンジダ感染に対する前方視的研究を開始した。

C 型肝炎における乾癬の合併頻度を明らかにし、乾癬の治療に用いられるシクロスポリンの C 型肝炎への影響や IFN 療法と乾癬との関連を明らかにするための全国アンケート調査が実施された。

9. 除鉄療法が C 型慢性肝炎の病態進展、肝発癌阻止に有効であるか否かのコーホート研究が実施された。その結果、長期の除鉄療法は C 型慢性肝炎からの肝発癌予防に寄与することが示された。インスリン抵抗性の改善が慢性肝疾患進展阻止に対する重要な治療標的であるとの考えから BCAA 食品によるインスリン抵抗性改善作用についての臨床試験が実施され、BCAA がインスリン抵抗性を改善することが証明された。BCAA 食品による有効性評価については現在、生物統計学的手法による解析が進められている。また BCAA 製剤を C 型肝硬変患者に服用させると慢性炎症と酸化ストレスが減少し、肝発癌の抑制に寄与する可能性を示唆する結果が示された。

10. 肝硬変症に対して脾摘や動脈塞栓術が実施されるが、脾摘が脂質・糖代謝及び肝に及ぼす影響が検討された。その結果、脾摘によって肝に脂肪化をはじめとする脂質代謝異常が出現することが示された。

D. 考察

1. 肝硬変症に対する肝再生療法としての血管内皮前駆細胞を用いた治療をヒトに応用することができた。肝再生をさらに強力に促進するための新たな基礎的知見を得ることが出来た。C型慢性肝炎、肝硬変に対する肝癌発生予防を視野にいれた新たなペプチドワクチンが準備できた。

2. 肝硬変の治療戦略、肝発癌予防、QOL改善、肝疾患の進展阻止を考えるための疫学、基礎、臨床研究の結果が得られつつある。

3. 肝硬変患者の肝発癌阻止、QOL改善、進展阻止に寄与する可能性が高く、また臨床応用可能な治療法が示された。

4. 非A非B型肝炎の増加が我国における今後の問題点であり、発症要因、病態解明は極めて重要である。これらの検討課題を解明するための非B非C型肝炎症例の集積がなされた。

5. 本研究班で得られた、国民に広く知らせる必要のある情報に関しては、啓発活動が実施されたと思われる。

E. 自己評価

1. 達成度については当初設定した目標について、各項目について、ほぼ目標通りの研究が実行されている。

2. 研究成果の学術、国際、社会的意義については患者の増加が予想される肝硬変・肝癌についての抗ウイルス療法以外の治療法の開発は国際的にみても有意義である。

3. 今後の展望については、この一年間で研究班の目標を達成するための多くの基礎資料、

患者登録などの準備がなされたので、今後の研究の展開が確実に、積極的になされると期待している。

F. 結論

肝炎、肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法の確立は病態進展阻止、肝発癌予防、QOLの改善、医療経済の面からも重要な検討課題である。

G. 健康危険情報

なし

Ⅱ. 分担・協力研究報告

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者：佐田通夫 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 教授

研究協力者：中村 徹 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 助教

研究：血管内皮前駆細胞を用いた肝再生療法

研究要旨：肝硬変症の進展に伴う肝不全による本邦での死者数は年間9,200人にのぼる。さらに、B型・C型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者の多くは肝細胞癌を発症する。肝細胞癌による年間死亡者数は年々増加し、2002年には34,000人となっており、肝硬変症に関連した年間死亡者数は40,000人を超える計算になる。また、肝硬変患者の中には、最近マスコミなどで取り上げられているような医療行為によってC型肝炎ウイルスに感染した患者も多く含まれており、これらの患者に対して十分な対策を講じることは急務と考える。しかし、進行した肝硬変症に対する根本的な治療法は肝移植しかなく、その肝移植も慢性的なドナー不足に悩まされ一般的な治療法として普及していないのが現状である。我々は最近の研究において、血管内皮前駆細胞（将来、あらゆる臓器の血管の内皮細胞になることを運命づけられた細胞）は、血管を形成するばかりでなく、様々な増殖因子、線維を溶かす線溶系酵素を産生することが分かった。その細胞を障害肝臓へ移植することにより、肝硬変・肝機能の改善と肝臓再生の促進、さらに死亡率を有意に低下させることが分かり、2007年米国消化器病学会雑誌に掲載した。今回ヒトへの臨床応用を目的とし、自己末梢血単核球細胞移植による非代償性肝硬変患者に対する肝臓再生を目指した臨床研究を開始した。単核球細胞には血管内皮前駆細胞が多く含まれている。本研究により、患者自身の末梢血から採取した単核球細胞を肝硬変患者に移植することで患者の予後が改善できれば、細胞移植で用いる細胞に関する倫理的問題はないため、極端なドナー不足や高額な医療費のため肝移植を受けることのできない患者を救済する治療法となることが期待され、社会的貢献度も大きいものと推測される。

A. 研究目的

肝臓は優れた予備能力を有しており肝硬変症に進展しても肝全体の70～80%が障害されない限り殆ど症状なく日常生活を送ることが可能である。また、肝硬変症では原因の如何にかかわらず慢性の肝細胞障害と再生不全、活性化された肝星細胞による肝線維化の進展、偽小葉形成、血流障害が疾患の本体をなしている。よ

って、肝硬変症の病態を形成するこれらの因子をわずかでも改善できれば、完治はできないまでも肝硬変患者の予後を改善することは十分に可能と考えられる。

近年、骨髄由来の一部の細胞には血球細胞以外にも様々な種類の細胞に分化する能力が存在することが証明され、これを契機に骨髄由来の細胞を用いた再生療法の基礎的研究が多くの臓器において精力的になされ、その一部はす

で臨床応用もなされている。血管内皮前駆細胞は 1997 年に浅原らによって末梢血中から発見された骨髄由来で将来内皮細胞に分化することを運命づけられた細胞であるが、この細胞は炎症部位や腫瘍部位へ特異的に遊走して血管の形成に関与することが分かっている。

このような背景を踏まえ、我々はヒト肝硬変症患者を対象とし、患者自身の末梢血から採取した血管内皮前駆細胞（本年は血管内皮前駆細胞を含む細胞集団、単核球細胞を用いる）を投与することで肝機能、予後の改善がみられるか否かを明らかにしたい。

B. 研究方法

本研究の治療プロトコルを示す。

[治療適応基準]

①非代償性肝硬変症患者、②同意取得時の年齢が 20 歳以上、75 歳以下の患者（性別不問）、③血清アルブミン濃度が 3.0g/dL 未満の患者、④食道・胃静脈瘤や腹水、浮腫の合併の有無は問わない、⑤肝移植治療を望まない患者、⑥6 カ月以上の生存が期待できる患者

1) 上記治療適応基準を満たし、この治療法についての承諾を得られた患者に対し治療前検査（採血検査、腹部・胸部超音波検査、全身 CT 検査、腹部 MRI 検査、上部消化管内視鏡検査、骨髄検査、肺機能検査等）をおこなう。

2) 入院後、5 日間連続して G-CSF 製剤を皮下投与する。

3) G-CSF 投与開始 4 日目に、末梢血単核球細胞を採取する。採取は 2 日間連続して行うが、1 回で有核細胞数 100 億個に達していれば採取は 1 日で終了とする。

4) G-CSF 投与開始 5 日目に採取した末梢血単核球細胞（2 日分）すべてを点滴静注する。

5) 移植後 1 週間は副作用や合併症を生じないかどうか慎重に経過観察を行い、問題ないことが確認できたら、入院 14 日目に退院とする。

6) 治療後は 1 ヶ月ごとに肝機能の評価（採血等にて）、3 ヶ月ごとに門脈血行動態の評価（血管造影検査、腹部超音波検査、腹部 CT 検査等にて）を行い、治療前の患者の肝機能、門脈血行動態と比較する。

（倫理面への配慮）

2006 年 9 月より、「自己末梢血単核球細胞移植による非代償性肝硬変症患者に対する肝臓再生療法の試み」と題して、久留米大学倫理委員会にて審査・承認のもと、研究を行った。

C. 研究結果

2008 年 11 月までに 3 症例（HCV:2 例、アルコール:1 例）を経験した。

1) 現時点では統計学的な有意差はないものの、肝予備能の指標とされる Child-Pugh スコア、MELD スコアの改善傾向を示した。

2) 現時点では統計学的な有意差はないものの、血清アルブミン値やプロトロンビン時間の上昇傾向を示した。

3) 現時点では統計学的な有意差はないものの、肝線維化の血清学的マーカーであるヒアルロン酸値、IV型コラーゲン値、プロコラーゲン 3 ペプチド(P-3-P) 値の低下傾向を示した。

4) 腹部超音波検査にて、門脈血流量の明らかな増加を認めた。

5) 腹水を認めた患者に対しては、腹水量の低下、内服利尿剤の減量を可能にした。

6) 現時点で治療後に合併症が生じた症例は 1 例あり、本治療との因果関係は不明であるが肝癌が発生した。

D. 考察

現在、ヒト末梢血由来の血管内皮前駆細胞の閉塞性動脈硬化症に対する有用性が臨床において確認され、その機序は血管新生の促進によると考えられている。我々は研究においてヒト末梢血由来血管内皮前駆細胞は血管を形成するばかりでなく、様々な増殖因子を産生することを明らかにした。期待される効果として、血管内皮前駆細胞 (CD34 陽性細胞) が投与されることで、繰り返し肝炎がおこっている肝臓に移植され、肝機能の改善、肝の線維成分の減少、門脈圧亢進症の改善に伴う食道・胃静脈瘤の改善、腹水や浮腫が改善されることが期待される。現在行っている単核球細胞移植と比較し、今後(次年度以降)、不要な細胞 (CD34 陰性細胞) を取り除くことが出来れば、投与細胞数を減らすことができるだけでなく、肝臓近くからの投与(経肝動脈的)が可能となり、より安全でかつ有効性が増すと考えている。

E. 結論

現時点では統計学的な有意差はないものの、肝予備能の指標とされる Child-Pugh スコアの改善や、肝での合成能を示す血清アルブミン値、プロトロンビン時間の上昇を確認した。腹水を認めた患者に対しては、腹水量の減少、内服利尿剤の減量を可能にし、期待される治療効果が示されつつある。しかし、先に示したように、本治療との因果関係は不明であるが、現時点で治療後に肝臓が1例発生した。今後は症例数を重ねていき、治療の有効性を示すとともに、安全性についても今まで以上に慎重に経過観察を続けて確認したい。もちろん、その症例数を

重ねていく中で、より効率の良い治療法に向けての基礎研究も続けていきたい。特に、投与経路については現在行われている末梢からの全身投与ではなく肝臓近くからの投与、すなわち肝動注投与あるいは門脈投与を検討したいと考えている。

F. 健康危険情報

現時点で治療後に合併症が生じた症例は1例あり、本治療との因果関係は不明であるが肝臓が発生した。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1. 中村徹, 血管内皮前駆細胞を用いた肝硬変症に対する肝臓再生療法 -基礎研究から臨床研究へ-, 第1回 肝疾患と肝再生研究会, 東京, 2008.
2. 中村徹, 血管内皮前駆細胞を用いた肝硬変の治療, 第1回 福岡県医学会総会, 福岡, 2009.

G. 知的所得権の所得状況

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）
研究報告書（平成20年度）

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者： 児島将康 久留米大学分子生命科学研究所 教授

研究協力者： 細田洋司 国立循環器病センター研究所生化学部 研究員

研究： グレリンの肝細胞増殖作用

研究要旨：胃から分泌される摂食亢進性ペプチドホルモンのグレリンには、全身のエネルギー消費・代謝の調節、肥満との関連、循環調節系における心血管の保護作用など、幅広い生理的役割がある。今回、研究分担者はグレリンの肝細胞増殖作用について検討した。その結果、グレリンには肝血流量増加作用があり、この作用はアトロピン投与によって抑制されることから、副交感神経系を介したものであると考えられた。また四塩化炭素、ジメチルニトロソアミン投与による肝障害のモデル動物において、グレリンは肝障害の程度を改善した。

A. 研究目的

研究分担者らは1999年に胃組織から新規のペプチド・ホルモン、グレリン (ghrelin) を発見した。グレリンは強力な成長ホルモン (GH) 分泌促進活性をもつホルモンで、胃がグレリンの主な産生臓器であり、胃から分泌されたグレリンが血流を介して下垂体に作用し、GH分泌を刺激するという、新しいGH分泌調節経路を示した。またグレリンが強力な摂食亢進作用を有し、慢性投与によって肥満を誘発することを見出した。さらにグレリンは全身のエネルギー消費・代謝の調節、肥満との関連、循環調節系における心血管の保護作用など、幅広い生理的役割が明らかにされており、摂食障害や心不全などでグレリンの補充による治療応用が期待されている。今回、分担者らは肝炎・肝硬変に対するグレリンの治療法としての可能性を検討した。

B. 研究方法

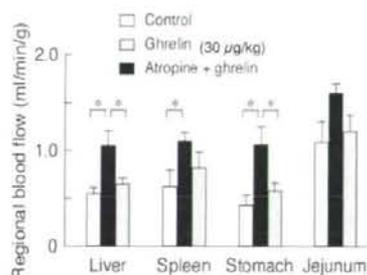
- ①グレリンは自律神経を介しておよび血管内皮細胞への直接作用によって血管を拡張させ、血流量を増加させる。そこで、グレリンの投与によって肝血流量がどのようになるのかを検討した。
- ②生体内でCC13ラジカルを発生する四塩化炭素 (CC14) を実験動物に長期間投与すると、肝細胞の炎症性壊死を起し、肝細胞壊死から肝線維化に至り、これは慢性肝炎・肝硬変のモデルとしてよく知られている。四塩化炭素を投与して誘発した肝障害において、グレリン投与によって障害はどのようになるのかを検討した。
- ③ジメチルニトロソアミン (DMN) を実験動物に一定期間投与すると、肝細胞壊死を伴わない肝線維化が発症する。このようなモデル動物において、グレリン投与によって肝線維化や肝機能はどうなるのかを検討した。

本研究は久留米大学および国立循環器病センターが定める動物実験規定に沿って行われた。

C. 研究結果

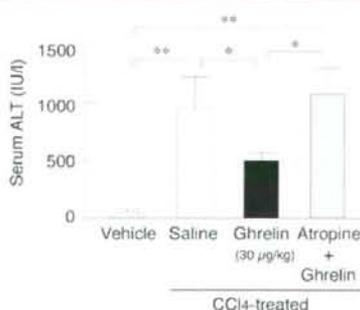
①グレリン投与によって肝血流量が増加した。このグレリン投与による肝血流量増加はアトロピンの投与によって抑制された。また脾臓や胃でもグレリン投与によって血流量が増加し、アトロピンによってこの血流量増加は抑制された。(図1)

図1 グレリン静注による肝血流量増加作用



②四塩化炭素投与による肝障害を血清ALTで評価した。グレリン投与によって血清ALTの値はコントロールに比べて約半分に抑制された。このグレリンによる血清ALT上昇抑制はアトロピンの投与によって抑制された。(図2)

図2 グレリンによる四塩化炭素誘発肝障害の抑制効果



③ジメチルニトロソアミン投与による肝障害モデル動物において、グレリン投与によって白血球数が減少し、また血小板数が増加した。また凝固因子のフィブリノーゲン濃度が増加し、ヘパプラスチン・テストの値が改善された。(図3, 4)

図3

Hematological examination in DMN-treated rats

Group	WBC (x10 ³ /ml)	RBC (x10 ⁶ /ml)	PLT (x10 ⁴ /ml)
Normal (n=4)	3.9 ± 0.4	7.5 ± 0.2	75.6 ± 7.9
DMN-treated			
Saline (n=4)	7.9 ± 1.6 ^b	6.5 ± 0.2 ^b	50.9 ± 8.4 ^a
Ghrelin 3 µg/kg (n=6)	7.3 ± 0.6 ^a	6.4 ± 0.2 ^b	52.3 ± 6.2
Ghrelin 30 µg/kg (n=6)	6.6 ± 1.2	6.8 ± 0.3	89.6 ± 5.5 ^x

Data were obtained from rats on the day 35 of the experiment-1. Each value represents the mean ± SE. ^aP<0.05 and ^bP<0.02 vs respective normal group. ^xP<0.005 vs respective DMN-treated saline group.

図4

Coagulation factors in DMN-treated rats

Group	Fibrinogen (g/l)	Hepaplastin test (sec)
Normal (n=4)	2.5 ± 0.1	67.8 ± 3.1
DMN-treated		
Saline (n=4)	1.5 ± 0.2 ^c	100.2 ± 14.2 ^a
Ghrelin 3 µg/kg (n=6)	1.7 ± 0.1 ^b	86.2 ± 11.8
Ghrelin 30 µg/kg (n=6)	2.1 ± 0.2 ^x	77.8 ± 3.2

Data were obtained from rats on the day 35 of the experiment-1. Each value represents the mean ± SE. ^aP<0.05, ^bP<0.005 and ^cP<0.001 vs respective normal group. ^xP<0.01 vs respective DMN-treated saline group.

D. 考察

①グレリン投与によって肝血流量が増加することがわかった。この肝血流量増加はアトロピンの投与によって抑制されることから、副交感神経を介した作用であると考えられた。

②グレリン投与によって四塩化炭素による肝障害が抑制された。この抑制作用はアトロピン投与によって消失することから、副交感神経を介した作用であると考えられた。

③ジメチルニトロソアミン投与による白血球増加と血小板減少は、グレリン投与に寄って抑制された。このことからジメチルニトロソアミン投与による肝臓での炎症は、グレリン投与によって抑制されると考えられる。またフィブリノーゲン濃度の正常化やヘパラスチン・テストが正常値になることから、グレリン投与によって肝障害が改善されたと考えられる。

E. 結論

グレリンは肝血流量を増加させる作用がある。四塩化炭素やジメチルニトロソアミン投与によって誘発された肝障害は、グレリン投与によって改善された。グレリンは肝障害の改善薬として応用可能であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato T, Kurokawa M, Nakashima Y, Ida T, Takahashi T, Fukue Y, Ikawa M, Okabe M, Kangawa K, Kojima M. Ghrelin deficiency does not influence feeding performance. Regul Pept. 2008;145(1-3):7-11.

2. 学会発表

1. Kojima M. Phenotypic analysis of ghrelin knockout mouse. Keystone symposium on GPCR. Killarney, Ireland, May 2008.

2. 佐藤貴弘、御船弘治、井田隆徳、中島

義基、高橋知子、寒川賢治、児島将康：グレリンによる自律神経機能の調節メカニズムの解明、第81回日本内分泌学会学術総会、青森市、青森県、2008年5月

3. 井田隆徳、佐藤貴弘、児島将康：ニューロメジンS遺伝子欠損マウスの機能解析、第81回日本内分泌学会学術総会、青森市、青森県、2008年5月

G. 知的所得権の所得状況

なし

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者： 伊東恭悟 久留米大学医学免疫・免疫治療学講座 教授

研究： ペプチドワクチンによる肝発癌・病態進展抑制

—複数の HLA タイプ拘束性に細胞性免疫応答を誘導できる HCV コアタンパク質由来 T 細胞エピトープペプチド—

研究要旨：ペプチドワクチンの問題点の一つは患者によって異なるHLAタイプに合わせてペプチドを用意しなければならないことにある。そこで、HCVペプチドワクチンに使用するペプチドとして複数のHLAタイプに対応しうるペプチドが無いか検討し、特にHCVコア蛋白由来ペプチド（C35-44）が、HLA-A2以外にも、HLA-A24拘束性キラーT細胞誘導活性を有することを立証した。このように、異なるグループのHLAタイプにまたがってCTL誘導能を有するペプチドを複数用意できれば、少数のペプチドでより多くの患者に対してワクチン投与できる可能性が示唆された。

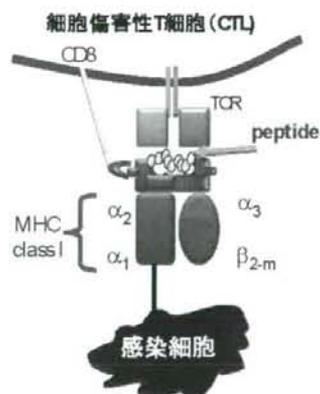
A. 研究目的

HCV 感染は世界で約 1 億 8 千万人の患者が存在し、肝硬変や肝癌になるリスクを抱えている深刻な感染症である。現在知られている 11 種類の HCV ジェノタイプのうち、1b は日本人の患者で最も多くそのうち 60%がインターフェロン治療に抵抗性である。従って新しい治療法の開発が待たれている。HCV を排除する最も重要な役割を持っているのが CD8⁺細胞傷害性 T 細胞

(CTL) であることから、ペプチドを基盤とした特異免疫療法がその一つになりえると考えられる。

過去 10 年間に HLA-クラス I-A 拘束性 CTL を誘導可能な HCV 由来のペプチドが多数同定され、これらのペプチドを用いた臨床試験が行われてきた。しかしながら、ペプチドを基盤とした CTL 誘導特異免疫療法は全蛋白を用いた免疫療法に比較して少なくとも 2 つの欠点がある。そのうちの 1 つは各 HLA クラス I に結合する異なるペプチドを準備する必要があることである。もう 1 つは、HCV に対する抗体を B 細胞に産生させる CD4⁺ヘルパー T 細胞を活性化できないことである。

我々は HCV のコア領域由来で HLA-A2 拘束性 CTL を誘導可能な C35-44 ペプチドに対して特異的な IgG が HCV 感染者のほとんどに有意なレベルで存在することを先に報告した。このことから我々は C35-44 ペプチドが日本人で最も多い HLA-A24 に結合するか、さらに HLA-A24 タイ



ブのHCV感染患者からCTLを誘導できないか検討することにした。

B. 研究方法

1.1 患者および試料

本研究に用いた末梢血単核球 (PBMC) および血症(または血清)は久留米大学倫理委員会で承認された研究プロトコールに基づき、書面で患者よりインフォームドコンセントをとって使用した。

1.2 抗体

本研究では抗HLA-A2 (clone BB7.2)、抗HLA-A24、抗MHC Class I (W6/32) モノクローナル抗体 (mAb) を使用した。フローサイトメトリー解析には二次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いた。陰性対照として抗CD4 (Nu-Th/I)、抗CD8 (Nu-Ts/c)、抗CD14 (JML-H14)、抗MHC class II (H-DR-1) をそれぞれ用いた。

1.3 細胞株

RMA-S (a Transporter associated with antigen processing [TAP]-欠損マウス細胞株)、C1R cells (ヒトBリンパ芽球化細胞株) および T2 cells (T-B リンパ芽球ハイブリドーマ細胞株) は 10%FCS 加 RPMI 1640 培養液で維持した。RMA-S-A*2402/K^b (住友製薬研究所高須先生より供与) は 0.75 mg/ml of Geneticin (Calbiochem) を含む 10%FCS 加 RPMI 1640 培養液で維持した。また、C1R-A*2402 細胞 (熊大滝口先生より供与) は 0.5 mg/ml Hygromycin (Wako, Osaka, Japan) を含む 10%FCS 加 RPMI 1640 培養液で維持した。

1.4 ペプチド

C35-44 ペプチドは Good Manufacturing Practice (GMP) レベルで、純度 >99.5% のもの

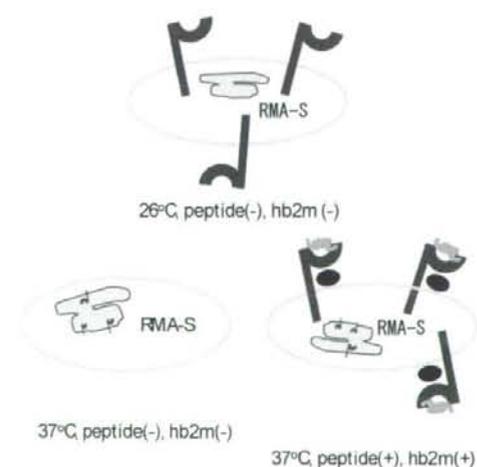
を委託合成した。それ以外の対照ペプチドは 90%以上の純度のものを準備し、最終濃度が 10 mg/ml になるように DMSO で溶解し使用まで -80°C で保存した。

1.5 ペプチドの HLA 結合能

C35-44 ペプチドの HLA-A*0201 および -A*2402 に対する結合能の検定は既報に従って stabilization assay を用いて行った。

RMA-S 細胞株は 26°C で 18-20 時間培養すると導入したタイプの HLA 抗原を発現する。しかしながら、37°C でさらに培養すると HLA 分子は分解される。この際、この HLA 分子に結合可能なペプチドが存在するとその結合力に応じて安定化され、それをフローサイトメーターで測定することによりペプチドの各 HLA 分子に対する結合能を比較できる。

ペプチドの結合量を Mean fluorescence intensity (MFI) で表し、その増加率を次の数式で計算した。MFI increase % = [(MFI induced by the C35-44 peptide - MFI induced by DMSO) / (MFI induced by DMSO)] × 100 %.



1.6 インターフェロン産生およびクロム遊離反応による細胞傷害活性の測定

HCV 感染者末梢血リンパ球を C35-44 ペプチド存在下で培養し、C35-44 ペプチド特異的細胞傷害活性を有する T 細胞 (CTL) が誘導できるかどうかは以下の方法で調べた。ペプチド特異的 CTL 活性は IFN 産生能とクロム同位元素遊離反応で行った。標的細胞は対応する各 HLA タイプを安定導入し、ペプチドをパルスした C1R 細胞株を用いた。また、HLA 拘束性は抗 CD8 および抗 HLA クラス I モノクローナル抗体による抑制実験で行った。

(倫理面への配慮)

本研究は久留米大学倫理委員会の承認を得、インフォームドコンセントを行った後患者本人の書面による同意を得て採血した末梢血を用いた。

C. 研究結果

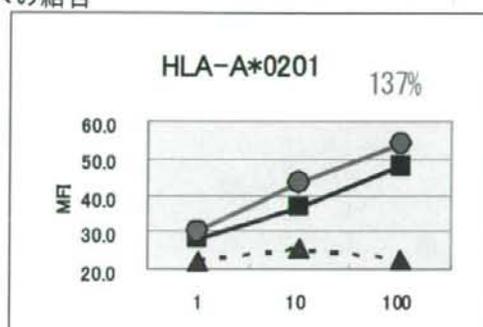
(1) C35-44 ペプチドの HLA-A24 タイプに対する結合能を Stabilization assay で測定した。抗原処理に関与する分子に欠損があるため、細胞表面 MHC クラス I 分子の発現が減少するマウス由来の変異株 RMA-S 細胞に、あらかじめ各種ヒト HLA 遺伝子をそれぞれ導入した。この細胞を 26°C で培養するとペプチドが結合していない空の HLA 分子が発現する。この分子は 37°C で更に培養を続けると壊れる。ところが、対応する HLA 分子にペプチドが結合すると HLA 分子が安定化致し、フローサイトメーターで検出することができる。

そこで RMA-S 細胞に加えるペプチドの濃度を変えて、各種 HLA 分子の発現量の変化を調べた。陰性コントロールを青三角、C35-44 ペプチドを添加したときの HLA 量を赤丸、および陽性コントロールを黒四角で表し、陰性コントロールに対する C35-44 ペプチドによって安定化した HLA 量の相対的割合を % で示した。この

値が 12.5% 以上を有意な結合と判定した。

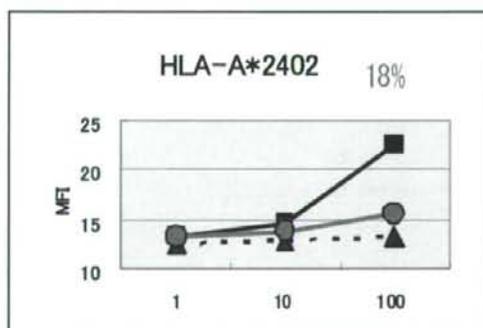
まず、本実験形の陽性コントロールとして HLA-A*0201 への結合を調べた結果を図 1-1 に示した。

図 1-1 C35-44 ペプチドの HLA-A*0201 への結合



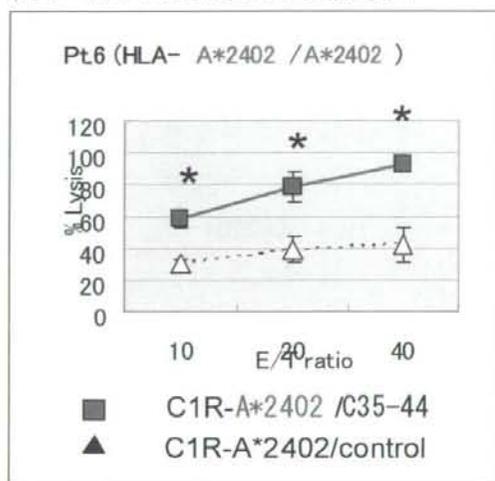
C35-44 ペプチドは HLA-A*0201 に比べて結合量は少ないものの HLA-A*2402 にも有意 (12.5% 以上) 結合することが分かった (18%、図 1-2)。

図 1-2 C35-44 ペプチドの HLA-A*2402 への結合



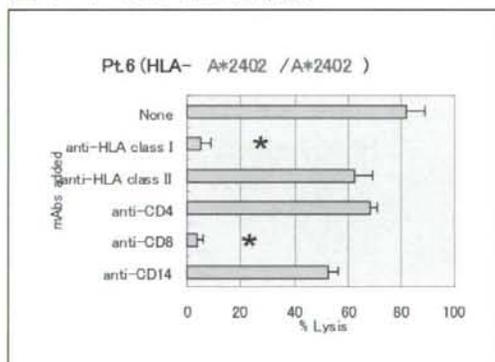
(2) 次に、患者末梢血を C35-44 ペプチドで刺激して誘導した T 細胞の細胞傷害活性をクロム同位元素遊離反応で調べた。いずれの T 細胞も C35-44 ペプチドにより、統計学的に有意な細胞傷害活性が認められ、CTL 誘導能があることが証明された (図 2)。

図2 HLA-A24 拘束性 CTL 誘導能



この活性は、それぞれ HLA クラス I および CD8 に対する抗体で特異的に抑制されたことから、MHC 拘束性であることが示唆された(図3)。

図3-1 HLA-A24 拘束性



D. 考察

本研究では、C35-44 ペプチドが HLA-A*0201 以外に、全くグループが異なる HLA-A*2402 に対して結合能を有しかつこれらの HLA タイプ拘束性に CTL 誘導能があることを明らかにした。

治療ワクチンに用いるペプチドは特定の MHC 分子に結合するため通常 9 ないし 10 個の

アミノ酸より構成されており、対応する MHC 拘束性にかん細胞やウイルス感染細胞に反応する CTL を活性化できる。ペプチドと MHC の結合は、以前は非常に特異的だと考えられていたにもかかわらず、最近の研究は元々信じられていたように限られたあるいは特異的なものではないことを示している。Sidney と彼の共同研究者たちはこれまで調べられた 945 種類の異なる HLA-A および-B アレルのうち 80% 以上は 9 種類に分類されるスーパータイプのうち一つに結合するが、残りは複数のスーパータイプに関連しているだろうと指摘している。このことは、一つのペプチドがいくつかの異なる HLA アレルに結合できることを示唆している。事実、この現象は多くの研究者によって報告されている。この研究により、我々は C35-44 ペプチドが日本人の主要な HLA タイプである HLA-A*2402 に結合することができるということを明らかにした。

C35-44 ペプチドの HLA-A24 分子に対する結合活性は HLA-A0201 に対する結合量とは異なるが、試験管内での CTL 誘導能は両者とも同等に誘導できることから、HLA 分子に対する結合量と CTL 誘導能が必ずしも関連するものではないことが分かる。

なお、HCV は変異率の高いウイルスであることが知られているが、C35-44 ペプチドのアミノ酸配列は良く保存されている。

E. 結論

HLA-A*0201 の HLA タイプ拘束性に CTL 誘導能を有する HCV コアタンパク由来の C35-44 ペプチドが、日本人で最も高頻度に発現している HLA-A24 にも結合能を有し、且つ拘束性に CTL 誘導能を有することが分かった。このことから、C35-44 ペプチドは日本人の約 70% に対するワクチン用ペプチドとして有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし