

平成20年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発

課題番号：H20-肝炎一般-001

研究代表者：有井 滋樹

I. 研究の意義

肝疾患は我が国の国民病であり、その多くがウイルス慢性肝障害を基盤とする肝癌である。高危険群が明らかになりつつあるが、早期診断ができなため適切な治療時期を失した患者も多い。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 肝癌分子マーカーと画像診断の開発により、肝癌早期発見システムを構築することを目的とする。
- (2) 肝癌を精緻かつ効率よく早期発見することにより、より効果の高い治療へ貢献できる。
- (3) 肝癌の発生・進展に関わる分子機構を解明できれば、分子標的薬の開発への展開が期待される。

III. 1年間の研究成果

約3ヶ月で既に140例以上の早期肝癌症例を登録しており、予定症例は達成可能と考えられる。以下、分子マーカーおよび画像診断の解析により、新しい知見が得られている。

(1) 分子マーカーによる早期発見システムの開発 (有井、青柳、泉、佐田、坂元、稲葉、井本、田中博、田中聡) 腫瘍マーカーAFP、AFP-L3、PIVKA-IIに加え、Glypican-3、VEGF、Angiopoietin-2、IGF-II、TGF- β 1、Osteopontinの血清蛋白ELISA解析を開始した。外科手術症例の切除標本を用いた研究では、高精度CGHマイクロアレイによる包括的微小ゲノム情報解析、およびcDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析のpilot test analysisを行なった。その結果、肝癌の進展、悪性度を予測する新規分子マーカー候補を同定することに成功した。この分子を標的とした特異的阻害剤が既に開発されており、本研究により早期発見の分子マーカーのみならず、肝癌の新しい予防治療の開発へと発展できる可能性が得られたことは特筆すべきである。また、早期肝癌で特異的に発現する2種類の分子マーカー候補を検出し、幹細胞と高い関連性を認めており、発癌メカニズムの解析を進めている。

(2) 早期画像診断システムの開発 (有井、森安、飯島、泉、佐田、松井、角谷、川崎、高山、國土、山本、佐賀) 画像解析では、Gd-EOB-DTPA (EOB) 造影MRIのファントム実験にて、従来の細胞外液性造影剤と造影能を比較した至適撮像条件の検討を終了した。EOB造影MRIと病理組織像の対比について、既にデータ解析を開始している。また、癌細胞のレセプター分子を標的としたイメージング開発を進めている。さらに、Perflubutaneを用いた造影超音波検査によって、肝癌の血流動態、血管構築、腫瘍形態、肝組織の微小循環の可視化について精緻で詳細なデータを蓄積している。現在pilot test analysisとして、病理組織像との比較により、①微小病変の優れた検出能、②肝癌の血流動態と癌分化度が有意に相関すること、③腫瘍形態を明瞭に描出し周囲組織や血管への浸潤能を示すという新しい知見を得ており、非侵襲的画像検査によって癌の悪性度、進展様式を予測できる結果に高い期待が集まっている。

IV. 21～22年度の課題

[平成21年度]

(1) 分子マーカーによる早期発見システムの開発
腫瘍マーカー複合診断、肝癌悪性度分子マーカー、早期肝癌分子マーカーの臨床データを蓄積する(validation)。候補分子マーカーおよび新規分子標的の評価解析を行なう。

(2) 早期画像診断システムの開発
肝結節スクリーニング法としてRFシグナル、質的画像診断システムとして造影超音波/MRI画像に対し組織病理解析データの蓄積(validation)。さらに、新規分子イメージング候補群の解析を進める。

[平成22年度]

(1) 分子マーカーによる早期発見システムの開発
腫瘍マーカー複合診断、肝癌悪性度分子マーカー、早期肝癌分子マーカーの臨床データの検証により、分子マーカー早期発見システムを構築する。新規分子標的による予防治療を開発する。

(2) 早期画像診断システムの開発
超音波RFシグナルと結節組織の病理データの解析により肝結節スクリーニング法を構築する。造影超音波/MRI画像と組織病理データの解析により質的画像診断システムを構築する。さらに、新規分子イメージング診断を構築する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 本研究によりウイルス性肝炎のみならず、近年増加しているメタボリックシンドロームから発症する肝臓患者に対しても、効率よく治療効果の高い医療を提供できる。
- (2) 発癌予防を含めた視点から、肝炎医療対策が可能となり、国民医療への貢献も大きい。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者：有井 滋樹

1. Mahmut Y, Mizushima H, Mogushi K, Obulhasim G, Miyaguchi K, Inoue K, Nakahara I, Ohta T, Aihara A, Tanaka S, Arii S, Tanaka H. Expression of Aurora B and their alternative variant forms in hepatocellular carcinoma and the adjacent tissue. *Cancer Sci*, in press
2. Makuuchi M, Kokudo N, Arii S, Futagawa S, Kaneko S, Kawasaki S, Matsuyama Y, Okazaki M, Okita K, Omata M, Saida Y, Takayama T, Yamaoka Y. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res*, 2008
3. Kaneda M, Zhang D, Bhattacharjee R, Nakahama KI, Arii S, Morita I. Vitamin K(2) suppresses malignancy of HuH 7 hepatoma cells via inhibition of conenexin 43. *Cancer Lett*, 2008
4. Hasegawa K, Makuuchi M, Takayama T, Kokudo N, Arii S, Okazaki M, Okita K, Omata M, Kudo M, Kojiro M, Nakanuma Y, Takayasu K, Monden M, Matsuyama Y, Ikai I, for the Liver Cancer Study Group of Japan Surgical resection vs percutaneous ablation for hepatocellular carcinoma: A preliminary report of the Japanese nationwide survey. *J Hepatol*, 2008

研究分担者：松井 修

1. Miyayama S, Matsui O, Yamashiro M, Ryu Y, Takata H, Takeda T, Aburano H, Shigenari N. Detection of hepatocellular carcinoma by CT during arterial portography using a cone-beam CT technology: comparison with conventional CTAP. *Abdom Imag*, in press
2. Shinmura R, Matsui O, Kadoya M, Kobayashi S, Terayama N, Sanada J, Demachi H, Gabata T. Detection of hypervascular malignant foci in borderline lesions of hepatocellular carcinoma: comparison of dynamic multi-detector row CT, dynamic MR imaging and superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging. *Eur Radiol*, 2008
3. Kobayashi S, Matsui O, Gabata T, Sanada J, Koda W, Minami T, Kobayashi T. Hemodynamics of small sclerosing hepatocellular carcinoma without fibrous capsule: evaluation with single-level dynamic CT during hepatic arteriography. *Abdom Imag*, 2008

研究分担者：佐田 通夫

1. Ishida Y, Nagamatsu H, Koga H, Yoshida H, Kojiro M, Sata M. Hepatocellular carcinoma with a "nodule-in-nodule" appearance reflecting an unusual dilated pseudoglandular structure. *Intern Med*, 2008

研究分担者：青柳 豊

1. Kurita S, Ohkoshi S, Yano M, Yamazaki K, Suzuki K, Aoki YH, Matsuda Y, Wakai T, Shirai Y, Ichida T, Aoyagi Y. Progression of Hypermethylation of the p16 (INK4A) Gene from Normal Liver to Nontumorous Liver and Hepatocellular Carcinoma: An Evaluation Using Quantitative PCR Analysis. *Dig Dis Sci*, in press
2. Tamura Y, Yamagiwa S, Aoki Y, Kurita S, Suda T, Ohkoshi S, Nomoto M, Aoyagi Y. Serum alpha-fetoprotein levels during and after interferon therapy and the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, in press

研究分担者：森安 史典

1. Sugimoto K, Moriyasu F, Kamiyama N, Yamada M, Iijima H. Correlation between parametric imaging using contrast ultrasound and the histological differentiation of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2008
2. Shiraiishi J, Sugimoto K, Moriyasu F, Kamiyama N, Doi K. Computer-aided diagnosis for the classification of focal liver lesions by use of contrast-enhanced ultrasonography. *Med Phys*, 2008
3. Sugimoto K, Moriyasu F, Kamiyama N, Metoki R, Yamada M, Imai Y, Iijima H. Analysis of morphological vascular changes of hepatocellular carcinoma by microflow imaging using contrast-enhanced sonography. *Hepatol Res*, 2008

研究分担者：泉 並木

1. Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology*, 2008
2. Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. *J Hepatol*, 2008

研究分担者：高山 忠利

1. Takayama T, Makuuchi M, Kojiro M, Lauwers GY, Adams RB, Wilson SR, Jang HJ, Charnsangavej C, Taouli B. Early hepatocellular carcinoma: pathology, imaging, and therapy. *Ann Surg Oncol*, 2008
2. Makuuchi M, Kokudo N, Arii S, Futagawa S, Kaneko S, Kawasaki S, Matsuyama Y, Okazaki M, Okita K, Omata M, Saida Y, Takayama T, Yamaoka Y. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res*, 2008

研究分担者：國土 典宏

1. Gao FJ, Cui SX, Chen MH, Cheng YN, Sun LR, Ward SG, Kokudo N, Tang W, Qu XJ. Des-gamma-carboxy prothrombin increases the expression of angiogenic factors in human hepatocellular carcinoma cells. *Life Sci*, 2008
2. Ma M, Qu XJ, Mu GY, Chen MH, Cheng YN, Kokudo N, Tang W, Cui SX. Vitamin K(2) Inhibits the Growth of Hepatocellular Carcinoma via Decrease of Des-Gamma-Carboxy Prothrombin. *Chemother*, 2008
3. Xiang CH, Zhang W, Inagaki Y, Zhang KM, Nakano Y, Kokudo N, Sugawara Y, Dong JH, Nakata M, Tang W. Measurement of serum and tissue des-gamma-carboxyprothrombin in resectable hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res* 2008

- Hasegawa K, Imamura H, Ijichi M, Matsuyama Y, Sano K, Sugawara Y, Kokudo N, Makuuchi M. Inclusion of tumor markers improves the correlation of the Milan criteria with vascular invasion and tumor cell differentiation in patients with hepatocellular carcinoma undergoing liver resection (#JGSU-D-07-00462). *J Gastrointest Surg*. 2008
- Makuuchi M, Kokudo N, Arai S, Futagawa S, Kaneko S, Kawasaki S, Matsuyama Y, Okazaki M, Okita K, Omata M, Saida Y, Takayama T, Yamaoka Y. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatol Res*. 2008

研究分担者：稲澤 譲治

- Tanaka S, Arai S, Yasen M, Mogushi K, Su NT, Zhao C, Imoto I, Eishi Y, Inazawa J, Miki Y, Tanaka H. Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy. *Br J Surg*. 2008

研究分担者：山本 雅一

- Seimiya M, Tomonaga T, Matsushita K, Sunaga M, Oh-Ishi M, Kodera Y, Maeda T, Takano S, Togawa A, Yoshitomi H, Otsuka M, Yamamoto M, Nakano M, Miyazaki M, Nomura F. Identification of novel immunohistochemical tumor markers for primary hepatocellular carcinoma; clathrin heavy chain and formiminotransferase cyclodeaminase. *Hepatology*. 2008

研究分担者：飯島 尋子

- Wilson SR, Jang HJ, Kim TK, Iijima H, Kamiyama N, Burns PN. Real-time temporal maximum-intensity-projection imaging of hepatic lesions with contrast-enhanced sonography. *Am J Roentgenol*. 2008
- Sugimoto K, Moriyasu F, Kamiyama N, Metoki R, Yamada M, Imai Y, Iijima H. Analysis of morphological vascular changes of hepatocellular carcinoma by microflow imaging using contrast-enhanced sonography. *Hepatol Res*. 2008
- Kudo M, Zheng RQ, Kim SR, Okabe Y, Osaki Y, Iijima H, Itani T, Kasugai H, Kanematsu M, Ito K, Usuki N, Shimamatsu K, Kage M, Kojiro M. Diagnostic accuracy of imaging for liver cirrhosis compared to histologically proven liver cirrhosis. *Intervirol*. 2008
- Sugimoto K, Moriyasu F, Kamiyama N, Yamada M, Iijima H. Correlation between parametric imaging using contrast ultrasound and the histological differentiation of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, in press
- Wilson SR, Kim TK, Iijima H, Kimiyama N, Jang HJ, Burns NP. Real time temporal maximum intensity projection (MIP) imaging of liver lesions using contrast ultrasound. *Am J Roentgenol*, in press

研究分担者：田中 真二

- Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kudo A, Kurokawa T, Nakamura N, Inazawa J, Tanaka H, Arai S. Surgical contribution to recurrence-free survival in patients with macrovascular invasion-negative hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg*, in press
- Tanaka S, Arai S. Molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*, in press
- Nakajima T, Yasui K, Zen K, Inagaki Y, Fujii H, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arai S, Inazawa J, Takeshi Okanoue T. Activation of B-Myb by E2F1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, in press
- Zen K, Yasui K, Nakajima T, Zen Y, Zen K, Gen Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Mitsufuji S, Tanaka S, Itoh Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Arai S, Okanoue T, Yoshikawa T. ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer*, in press
- Gen Y, Yasui K, Zen K, Nakajima T, Tsuji K, Endo M, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Tanaka S, Minami M, Arai S, Okanoue T, Yoshikawa T. A novel amplification target, *ARHGAP5*, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*, in press
- Inagaki Y, Yasui K, Endo M, Nakajima T, Zen K, Tsuji K, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arai S, Okanoue T. *CREB3L4*, *INTS3* and *SNAPAP* are targets for the 1q21 amplicon frequently detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

1-1)腫瘍マーカーによる複合的早期発見システムの開発

臨床検体を用いた、腫瘍マーカー群の測定データの蓄積 (test cases)

↓
統計解析：データマイニングによる早期発見システムのモデル化

1-2)包括的分子解析に基づく新規早期発見マーカーの開発

臨床検体を用いた、包括的分子解析データの蓄積 (test cases)

→ 高精度 CGH マイクロアレイ、cDNA マイクロアレイ、BAMCA、miRNA マイクロアレイ、血中微量癌細胞/プロテオーム解析

↓
統計解析による新規分子マーカー候補群の抽出

→ 新しい肝癌悪性度分子マーカー、早期肝癌分子マーカーを同定

2-1)新しい肝癌スクリーニング画像法の開発

超音波 RF シグナル・データと肝結節の組織病理解析データの蓄積 (test cases)

↓
統計解析：結節鑑別スクリーニング法のモデル化

2-2)精緻な質的画像診断の開発

ソナゾイド造影超音波検査、肝細胞特異性造影剤 MRI 検査、組織病理解析の対比データの蓄積 (test cases)

↓
統計解析：質的画像診断システムのモデル化 → 肝癌の癌分化度、浸潤能の画像診断を示唆

研究代表者の研究歴等**・過去に所属した研究機関の履歴**

昭和48年 京都大学医学部卒業 同第1外科入局
 昭和57年8月 京都大学医学部第1外科 助手
 昭和59年8月 米国ニューヨーク州立ローゼンパークメモリアル研究所留学
 昭和60年12月 京都大学医学部第1外科 助手
 平成5年5月 京都大学医学部第1外科 講師
 平成10年7月 京都大学医学部第1外科 助教授
 平成12年4月 東京医科歯科大学大学院 分子外科治療学分野 肝胆膵外科 教授
 平成16年4月 分野の名称が分子外科治療学分野から肝胆膵・総合外科に変更、輸血部長併任

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

特になし。

・主な研究課題

肝胆膵外科 ・癌の分子生物学的研究 ・肝類洞壁細胞研究

・これまでの研究実績**発表業績**

1. Mahmut Y, Mizushima H, Mogushi K, Obulhasim G, Miyaguchi K, Inoue K, Nakahara I, Ohta T, Aihara A, Tanaka S, Arii S, Tanaka H. Expression of Aurora B and their alternative variant forms in hepatocellular carcinoma and the adjacent tissue. *Cancer Sci*, in press
2. Makuuchi M, Kokudo N, Arii S, Futagawa S, Kaneko S, Kawasaki S, Matsuyama Y, Okazaki M, Okita K, Omata M, Saida Y, Takayama T, Yamaoka Y. Development of evidence-based clinical guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma in Japan. *Hepatology*, 2008;38:37-51
3. Kaneda M, Zhang D, Bhattacharjee R, Nakahama KI, Arii S, Morita I. Vitamin K(2) suppresses malignancy of HuH 7 hepatoma cells via inhibition of connexin 43. *Cancer Lett*, 2008;8:761-772
4. Hasegawa K, Makuuchi M, Takayama T, Kokudo N, Arii S, Okazaki M, Okita K, Omata M, Kudo M, Kojiro M, Nakanuma Y, Takayasu K, Monden M, Matsuyama Y, Ikai I, for the Liver Cancer Study Group of Japan. Surgical resection vs percutaneous ablation for hepatocellular carcinoma: A preliminary report of the Japanese nationwide survey. *J Hepatology*, 2008;49:589-594
5. Tanaka S, Noguchi N, Ochiai T, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Kawamura T, Teramoto K, Arii S. Outcome and recurrence status of initially respectable carcinoma within the Milan criteria: Rationale for partial hepatectomy as the first strategy. *J Am Coll Surg*, 2007;204(1):1-6
6. Zhang D, Kaneda M, Nakahama KI, Arii S, Morita I. Connexin 43 expression promotes malignancy of HuH 7 hepatocellular carcinoma cells via the inhibition of cell-cell communication. *Cancer Letter*, 2007; 252: 208-215
7. Ikai I, Arii S, Okazaki M, Okita K, Omata M, Kojiro M, Takayasu K, Nakanuma Y, Makuuchi M, Matsuyama Y, Monden M, Kudo M. Reports of the 17th Nationwide Follow-up survey of primary liver cancer in Japan. *Hepatology*, 2007;37:676-69
8. Tanaka S, Wands JR, Arii S. Induction of angiopoietin-2 gene expression by Cox-2. A novel role for Cox-2 inhibitors during hepatocarcinogenesis. *J Hepatology*, 2006; 44(1):233-5
9. Tanaka S, Pero SC, Taguchi K, Shimada M, Mori M, Krag DN, Arii S. A specific peptide ligand for Grb7 signal transduction protein inhibits invasion and metastasis of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2006;98:491-498

知的財産権の取得及び申請状況

国際出願

発明の名称：臓器機能維持改善液 出願番号 PCT/JP2006/304269

出願日：平成18年3月6日

出願人：国立大学法人 東京医科歯科大学、株式会社 ミノファーゲン製薬

発明者：工藤 篤、有井 滋樹、和氣健二郎、阪野 功

研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)

科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン

平成20年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発課題番号：H20-肝炎一般-002研究代表者：中面 哲也**I. 研究の意義**

- (1) 肝がんの再発率は極めて高く、肝がん再発防止策の確立が急務である。
- (2) 肝がんの治療成績向上のためには、肝がんの超早期診断マーカーの開発や新規治療法あるいは予防法の開発も必要である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 本研究は肝細胞がんの超早期診断法と発症予防・再発予防・治療ワクチンの開発を目的とする。
- (2) 臨床第I相試験で進行肝細胞がんに対しても有効性を示したGPC3ペプチドを用いて、ワクチンや免疫細胞療法などの新規治療法、再発予防法、予防法の開発を目指すと共に、肝細胞がんの超早期診断法を開発する。
- (3) 我が国に350万人存在するともいわれている肝炎ウイルスキャリアの肝細胞がん発症の抑制と肝細胞がんの治療成績の向上を目指す。
- (4) ヒト iPS 細胞由来の樹状細胞を用いた免疫療法の開発により、iPS 細胞の有用性も社会的に広く認知されうる。

III. 1年間の研究成果

・主任研究者(中面 哲也)、分担研究者(木下 平、古瀬 純司、池田 公史、千住 覚)

- (1) 肝細胞がんの超早期診断法の開発においては、一部の慢性肝炎・肝硬変患者の末梢血中に GPC3 ペプチド特異的に IFN- γ を産生する CTL の存在や、GPC3 蛋白、抗 GPC3-IgG 抗体、さらには $\beta 2$ ミクログロブリンの検出を認めており、今後はこれらが超早期診断に有用であるかを多施設による多検体の臨床研究で検討していく。(中面)
- (2) 肝細胞がんのワクチンの開発においては、26例の進行肝細胞がん患者を対象に、GPC3 ペプチドワクチン臨床第I相試験を実施した結果から、ワクチンの安全性と免疫学的有効性を確認しており、3回投与した患者の約60%に最低2ヶ月間は腫瘍を増悪させない効果、腫瘍マーカーPIVKA-IIの低下が認められた。一部の症例においては腫瘍の縮小、消失、懐死などの臨床的な効果も見られ、30mg3回投与の1例には劇的な臨床効果が出現した。またこれらの効果には、事前のマウスでの研究結果と同様に投与量依存性が示唆された。GPC3 ペプチドワクチンが進行肝細胞がんにも有効であることが示され、今後は第II相試験を実施する。(中面、木下、古瀬、池田)
- (3) ES-DC ワクチン及び細胞療法の開発については、今話題のヒト iPS 細胞の作製および iPS 細胞からの樹状細胞への分化誘導技術を確立できた。(千住)

IV. 21~22年度の課題

- (1) 肝細胞がんの超早期診断法の開発においては、実際の患者の採血と経過観察による大規模な検証を要するフェーズに入ったと認識し、H21年度からは多くの肝硬変患者を抱えている5施設を新たに加え、超早期診断法の有効性を検証する大規模な臨床疫学研究を計画した。
- (2) 肝細胞がんのワクチンの開発においては、スーパー特区に採択され、本 GPC3 ペプチドワクチンも最優先課題の一つとして取り上げられたため、今後は7種類の第II相試験を計画して一気に有効性を証明する。また再発予防効果について、手術、ラジオ波焼灼療法、肝動脈塞栓術、陽子線治療などの各治療後における臨床試験を計画する。さらに予防効果を見るために、前出の5施設の協力を得て大規模な臨床試験を実施する。
- (3) ES-DC ワクチン及び細胞療法の開発については、ヒト iPS 細胞由来の樹状細胞あるいはマクロファージを用いた免疫療法に重点を置くことにした。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 我が国に 350 万人存在するともいわれている肝炎ウイルスキャリアの肝細胞がんの発症を抑制する、または遅らせることができる可能性がある。
- (2) 近年脚光をあびている分子標的治療薬は高額であり、しかも有効な症例が存在する一方で、無効例も多いことが知られている。ワクチンなどはより安価に提供でき、また開業医など、どこかの医療施設でもできる治療法であり、新たながん治療法としての普及、医療費の削減にも大いに貢献できる可能性がある。
- (3) iPS 細胞の有用性も社会的に広く認知されうる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(中面哲也、木下 平)

- (1) Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for component of Hepatocellular Carcinoma in Human Liver Cancer. *Int. J. Oncol.* 2008, in press.
- (2) Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, Komori H, Ito M, Tsuchihara M, Tsunoda Y, Shirakawa H, Baba H, Nishimura Y, Kinoshita T, Nakatsura T. HLA-A2 and -A24- restricted glypican-3-derived peptide vaccine induce specific CTLs: Preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* 2008, 32:985-990.

(池田公史)

- (3) Ikeda M, Okusaka T, Ueno H, Morizane C, Kojima Y, Iwasa S, Hagihara A. Predictive Factors of Outcome and Tumor Response to Systemic Chemotherapy in Patients with Metastatic Hepatocellular Carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2008, 38:675-82.

(古瀬純司)

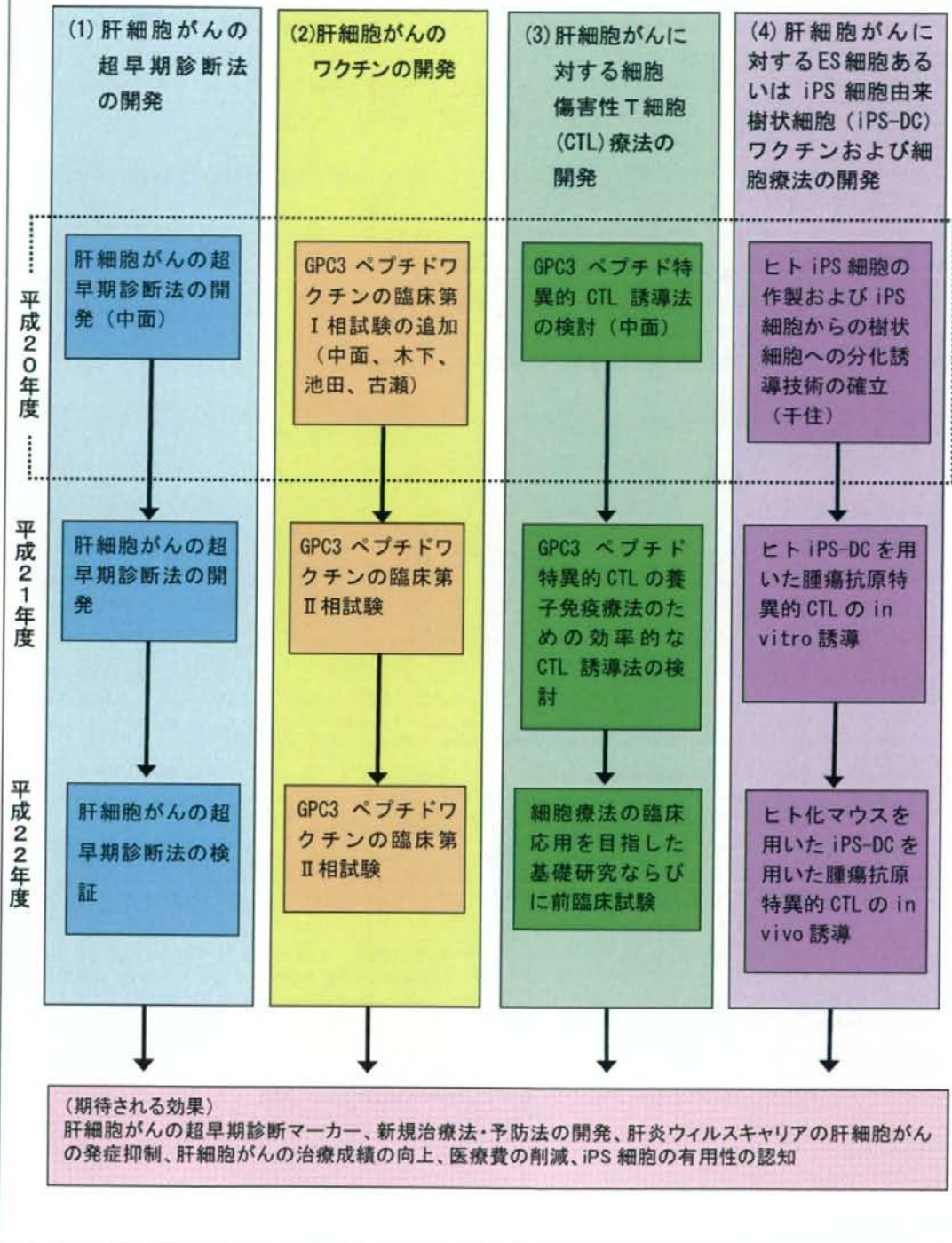
- (4) Thomas MB, O'Beime JP, Furuse J, Chan AT, Abou-Alfa G, Johnson P. Systemic Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Cytotoxic Chemotherapy, Targeted Therapy and Immunotherapy. *Ann Surg Oncol.* 2008, 15:1008-1014.
- (5) Ishii H, Furuse J, Kinoshita T, Konishi M, Nakagohri T, Takahashi S, Gotohda N, Nakachi K, Suzuki E, Yoshino M. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma patients who meet the Milan criteria. *Hepatogastroenterology* 2008, 55:621-626.
- (6) Furuse J. Growth factors as therapeutic targets in HCC. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008, 67:8-15.

(千住 覚)

- (7) Fukushima S, Hirata S, Motomura Y, Fukuma D, Matsunaga Y, Ikuta Y, Ikeda T, Kageshita T, Ihn H, Nishimura Y, Senju S. Multiple antigen-targeted immunotherapy with α -galactosylceramide-loaded and genetically engineered dendritic cells derived from embryonic stem cells. *J.Immunotherapy* 2008, in press.
- (8) Matsunaga Y, Fukuma D, Hirata H, Fukushima S, Haruta M, Ikeda T, Negishi I, Nishimura Y, Senju S. Activation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by b2-microglobulin or TAP1 gene disruption and the introduction of recipient-matched MHC class I gene in allogeneic ES cell-derived dendritic cells. *J.Immunol.* 2008, 181:6635-6643.

VII. III (1年間の研究成果)の概要図等

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発



○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

平成4年—5年;熊本大学医学部外科学第2講座(小川道雄先生)

平成5年—6年;三井大牟田病院外科

平成6—9年;国立がんセンター東病院肝胆膵外科レジデント、がん診療の傍ら、研究所支所病理部及びがん治療開発部(江角浩安先生)にも所属し研究に従事、日本外科学会認定医取得

平成9—17年;熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野(西村泰治先生)、うち1年半は久留米大学医学部免疫学講座(伊東恭悟先生)に国内留学

平成12年;日本学術振興会特別研究DC2採用

平成13年;熊本大学大学院医学研究科外科系修了、医学博士、日本学術振興会特別研究員PD採用、同研究科助手に就任

平成17年10月;国立がんセンター東病院臨床開発センターがん治療開発部機能再生室長(現職)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

小川道雄 熊本労災病院・院長

江角浩安 国立がんセンター東病院・院長

西村泰治 熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野・教授

竜 崇正 千葉県がんセンター・センター長

木下 平 国立がんセンター東病院・病棟部長

古瀬純司 杏林大学腫瘍内科・教授

井本 滋 杏林大学乳腺外科・教授

・主な研究課題

肝細胞がんの超早期診断法と予防・治療ワクチンの開発

迅速な創薬化を目指したがんペプチドワクチン療法の開発

がん抗原特異的細胞傷害性T細胞(CTL)治療の臨床導入を目指した研究

少量(生検)組織でも可能な最適治療診断システムの開発

・これまでの研究実績

1. Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura T. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for component of Hepatocellular Carcinoma in Human Liver Cancer. *Int. J. Oncol.* 2008, in press.
2. Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, Komori H, Ito M, Tsuchihara M, Tsunoda Y, Shirakawa H, Baba H, Nishimura Y, Kinoshita T, Nakatsura T. HLA-A2 and -A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induce specific CTLs: Preclinical study using mice. *Int. J. Oncol.* 2008, 32:985-990.
3. Komori H, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, Motomura Y, Ikuta Y, Fukuma D, Yokomine K, Harao M, Beppu T, Matsui M, Torigoe T, Sato N, Baba H, Nishimura Y. Identification of HLA-A2- or HLA-A24-restricted CTL epitopes possibly useful for glypican-3-specific immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12(9):2689-2697.
4. Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, Matsuyoshi H, Hirata S, Monji M, Komori H, Fukuma D, Baba H, Nishimura Y. Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. *Cancer Res.* 2006, 66(4):2414-2422.
5. Nakatsura T, Komori H, Kubo T, Yoshitake Y, Senju S, Katagiri T, Furukawa Y, Oagawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, Glypican-3, evokes T cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10:8630-8640.
6. Nakatsura T, Kageshita T, Ito S, Wakamatsu K, Monji M, Ikuta Y, Senju S, Ono T, Nishimura Y. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10:6612-6621.
7. Nakatsura T, Yoshitake Y, Senju S, Monji M, Komori H, Motomura Y, Hosaka S, Beppu T, Ishiko T, Kamohara H, Ashihara H, Katagiri T, Furukawa Y, Fujiyama S, Ogawa M, Nakamura Y, Nishimura Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003, 306:16-25.

平成20年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：インターフェロンの抗肝線維化分子機構の解明とその応用

課題番号：H20-肝炎一般-003

研究代表者：河田 則文

I. 研究の意義

- (1) 本邦には約350万人に及ぶウイルス性肝炎感染者があり、国内最大の感染症として大きな厚生労働問題となっている。ウイルス性肝炎の治療法は進歩し、C型肝炎では治療を受けた約半数の患者がウイルス排除可能になってきた。しかしながら、逆に言うとC型肝炎患者の半数は治療抵抗性であり、B型肝炎ウイルスの排除は依然として困難である。また、治療導入できない高齢者への対応が問題となっている。
- (2) 今後増加することが明らかな高齢者の肝線維症・肝硬変を予防するためにもそれらに対する対処法が切望されている。しかしながら、現在の肝庇護療法は効果が不明確であり、分子論的基盤も未熟である。従って、ウイルス排除治療以外に線維化を遅延させる治療法の開発が望まれる。
- (3) インターフェロン(interferon, IFN)は抗ウイルス作用、免疫調節作用、抗腫瘍作用以外に抗肝線維化効果を持つことが知られているため、その薬理作用の詳細かつモダンな解析により新しい抗肝線維化剤が見出される可能性がある。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 肝線維化は星細胞(HSC)と筋線維芽細胞(MFB)が主役の病態であり、IFNの本細胞群への直接的分子作用を検討する必要がある。申請者らはIFNがヒトMFBの増殖を抑制することを報告したがその機構は現在までの解析手法では明らかではない。本研究の初期段階ではHSC/hMFBのmicroRNA発現に及ぼすIFNの効果を網羅的に検討することを目的とする。
- (2) 申請者らはHSC活性化とともに発現変動するmicroRNAを同定してきた。本データを活用すればIFN特異的に変動するmicroRNAを同定できる。同定されたmicroRNAをウイルスベクターで強制発現させて、HSC/hMFBの増殖、コラーゲンやサイトカイン産生に及ぼす影響を検討する。
- (3) 最終的に当該microRNAに作用する低分子物質をスクリーニングし、経口可能な低分子物質を見出してIFNの副作用を軽減させ得る新しい治療法の開発へと繋ぐ。
- (4) 一方、C型肝炎では肝線維化進行群(stage3-4)はHCVの遺伝子型に関わらずIFN治療によるウイルス駆除率が不良であるが、ウイルス側因子のみでは説明できない。そこで宿主側因子を明らかにする目的で、肝組織中におけるmicroRNA発現の相違を、線維化軽度群(stage1-2)と網羅的に比較検討する。得られた情報から線維化進行群のIFN治療効果改善方策を立案する。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者：河田則文、研究分担者：池田一雄、小川智弘

- (1) Total RNAを用いて238個のmicroRNAを検出できるarray(サンガー研究所に登録済み)により、マウス星細胞の活性化とともに発現変動するmicroRNAを網羅的に解析した。
- (2) 星細胞活性化に伴って発現上昇する8microRNAと、発現低下する9microRNAを同定した。
- (3) 発現低下したmicroRNAを強制発現する系を作製しhMFBに感染させてmicroRNA依存性に発現変動する蛋白を解析した結果、Annexin V, HSP71, cofilin-1など33個の蛋白質を同定した。

・研究分担者：田守昭博、榎本 大

- (1) 同意の得られた患者肝組織からtotal RNAを抽出し、arrayでmicroRNA解析を進行中である。
- (2) Genotype 1bのC型慢性肝炎20例の治療前の肝生検組織からmicroRNAの発現を網羅的に解析した。線維化軽度群(stage 1-2)と肝線維化進行群(stage 3-4)の間で比較検討を行った結果、数個のmicroRNAについて有意な差が認められている(未発表)。

・研究分担者：鈴木知比古

- (1) IFN処理ヒト肝星細胞におけるmicroRNAアレイ解析を実施。細胞内発現量が多いmicroRNAに関しては、IFN添加で発現量変化は検出されず、IFN- α と- β による差も見れなかった。発現量の少ないものに関しては、 >2 倍以上あるいは <0.5 以下に変動しているもの見出された。
- (2) IFNが、肝星細胞の細胞周期のG1期からS期への移行をp21を介して遅延させ、肝線維化を遅延させる可能性が示された。

I. 21~22年度の課題

・平成21年度

- (1) 上述したようにマウス星細胞の活性化と伴に発現変動する17microRNAが同定できた。これらmicroRNAの発現定量は既にTaqMan MicroRNA Assayにてより定量解析終了している。これらのうちmiR143を含めて星細胞の活性化と伴に低下するmiRsに焦点をあて、エンタリーベクター (pENTR) にU6 promoter-TATA-loxP-CMV-EGFP-loxP-precursor miRNA配列を組み込んだベクターを構築し、GatewayシステムのLRクロナーゼ反応によりレンチウイルスベクターへの組換えを起こさせ、精製後hMFBへの感染実験に使用する。
- (2) MicroRNAの過剰発現によるhMFBの機能変化として細胞外マトリックスやサイトカインなどの発現をreal-time PCR、immunoblotにより解析する。
- (3) また、アデノウイルスベクターを用いたmicroRNA強制過剰発現を行ないチオアセトアミドや総胆管結紮による肝線維化モデルマウスに*in vivo*でも抗線維化的に効果を発揮するかについて検討を行う。
- (4) マウス星細胞をIFN- β (10^3 ~ 10^5 U/mL) で24時間処理した際に変動したmicroRNAの網羅的発現解析を最近終了した。上記の実験結果とも照らし合わせながらIFN感受性microRNAの機能解析も行う。
- (5) 一方、臨床的にIFN治療によりSVR群と非SVR群に関して、治療前のmicroRNA発現に相違があるかどうかの解析を開始する。生検で得た組織の1/3からtotal RNAを抽出し、microRNA arrayで網羅的解析を行う。それらと肝線維化進行群 (stage 3-4)、非進行群 (stage 1-2) との相関を明らかにし、得られた情報から線維化進行群の効果改善方策を立案する。

・平成22年度

- (1) 以上の実験により選択されたmicroRNAに関しては直接的なターゲット (翻訳または転写の制御) となる配列を持つ遺伝子をこれまでの研究論文やSanger研究所のmiRBaseにより探索する。ターゲット分子が既知である場合は、その分子を修飾可能な物質のスクリーニングを開始する。そのためにデータベース上のターゲット分子の3次元立体構造に対してコンピューター解析により阻害可能な低分子物質をスクリーニングする。また、既存・既知の抗線維化作用を有する低分子物質との共通性についても検証する。
- (2) 未知の蛋白がターゲットとなる場合は、microRNA発現への影響を直接的アッセイとして用い、経口可能かつ安全な低分子物質をスクリーニングする。
- (3) 最終目標は、各種実験により選択されたmicroRNAの機能を代償できる低分子物質を獲得し、*in vivo*モデルでの効果を検討して、臨床応用への道を開く事である。このような物質は病因の如何に関わらず肝臓のhMFBの機能を変化させて、抗肝線維化作用を発揮する可能性がある。

II. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 我が国にはB、C型肝炎ウイルス感染者が併せて約350万人近く存在すると言われており、国内最大の感染症として厚生労働上重大な問題であり、IFN治療の公的助成制度や肝疾患連携拠点病院の整備が進んでいる。
- (2) しかしながら、IFN治療や最新の核酸アナログ製剤などでウイルス性肝炎を治癒させうる肝炎患者は未だ一部であり、副作用などの面から治療を中断せざる終えない患者も多い。その結果、多数の患者は緩徐に進行する線維化と伴に肝硬変、肝臓に至り死亡する。この連鎖を断ち切る手段を早急に確立する必要があるが、抗ウイルス剤などの開発が海外に数年の遅れを生じているのも事実である。
- (3) 患者が高齢化する現状や、具体的な治療法・予防法がない肝硬変に対応するためにも肝線維化機構を詳細に検討し、その制御を行なえる薬剤の開発は急務である。
- (4) MicroRNAという分子生物学の新領域を利用しつつ、肝臓特異的な臓器線維症の制御法を確立することは、創薬や検査薬開発とそれらの商品化へと続く可能性や、肝疾患患者の予後を規定する肝硬変、肝不全、門脈圧亢進症への対策を講じることに直結するため、国民の保健・医療・福祉の向上等に繋がることと期待される。

III. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

上記の研究に関して、下記の学会報告を行った。

学会名: 第44回肝臓学会総会

会期: 2008年6月5-6日

会場: 愛媛県民文化会館

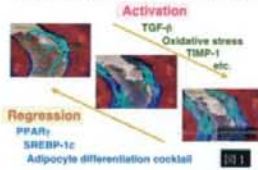
演題: 星細胞におけるマイクロRNAに関する

発表者名: 小川智弘、池田一雄、河田則文

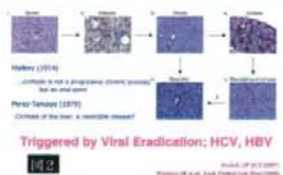
Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

肝臓の線維化に対して重要な役割を果たすのはビタミン A 貯蔵星細胞 (HSC) であり、本細胞の活性化制御法が治療になりうる可能性がある (図 1)。肝臓の線維化は病因の除去 (ウイルスの駆除) や炎症反応の抑制により消失してゆくことが動物モデルなどで示されてきた (図 2)、臨床的に IFN で C 型肝炎ウイルスを排除すると線維化が改善することは証明されている。しかし、その分子機構は不明である。申請者らは培養したヒト HSC を IFN 処理すると DNA の合成が阻害されることを観察した (図 3)。さらに、IFN に加えて低濃度の TNF α を添加すると細胞死が惹起されるため (図 4)、IFN の作用機序を解明できれば、IFN 以外の抗線維化剤の開発に繋がる可能性があり、解析を続けたが、分子機構は既存の方法では解明できなかった。

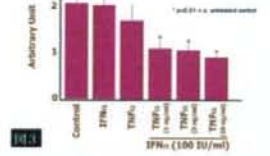
Reversibility of Stellate Cell Phenotype



Regression of not only Fibrosis but also Cirrhosis

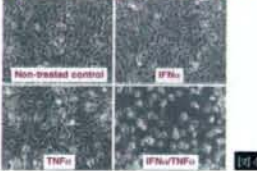


Decrease of LX-2 Cell Number by IFN-gamma + TNF-gamma - MTT assay -

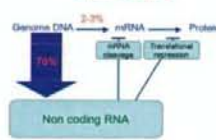


そこで申請者らは最近研究が進んでいる microRNA が IFN の薬理効果に関係しているのではないかと考えた。microRNA は蛋白質をコードしないノンコーディング RNA であり様々な細胞代謝に深く関与する (図 5)。その端緒として、array を用いてマウス初代培養星細胞の活性化とともに変動する microRNA を網羅的に解析し、2倍以上変動のある microRNA をさらにリアルタイム PCR で定量解析した。その結果、活性化に伴って変動する 17 個の microRNA を同定することに成功した (図 6)。これらの microRNA 発現に及ぼす IFN の効果について現在解析を行っている。

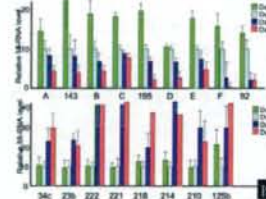
IFN-gamma/TNF-gamma Induce Death of LX-2 Cells



Central Dogma



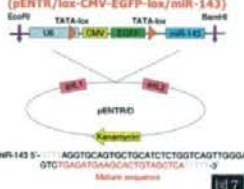
Expression of microRNAs in mouse HSCs



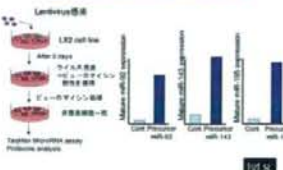
一方、星細胞の活性化に伴い変動する microRNA をヒト星細胞に強制発現させる実験系として invitrogen 社のエンタリーベクター (pENTR) に U6 promoter-TATA-loxP-CMV-EGFP-loxP-precursor miRNA 配列を組み込んだベクターを構築し、Gateway システムの LR クロナーゼ反応によりレンチウイルスベクターへの組換えを起こさせ、精製後 hMFB への感染実験に使用した (図 7)。このベクターを構築後ヒト HSC 細胞株である LX-2 に感染させたところ microRNA 発現が有意に上昇していることが判明した (図 8)。この強制発現系を今後利用して IFN 感受性 microRNA の意義づけを行ってゆく。

一方、臨床的解析として、IFN 治療前の患者組織 genotype 1b の C 型肝炎肝炎 20 例の治療前の肝生検組織から microRNA の発現を網羅的に解析した。線維化軽度群 (stage 1-2) と肝線維化進行群 (stage 3-4) の間で比較検討を行った結果、数個の microRNA について有意な差が認められている (図 9)。

Construction of plasmid vector (pENTR/lox-CMV-EGFP-lox/miR-143)



Mature miRNA expression in hMFB



Expression of microRNAs in human liver with CH-C



○研究代表者の研究歴等履歴

- 1986: 大阪市立大学医学部卒業
 1991: 医学博士
 1991-1992: フライブルグ大学(ドイツ)生化学研究施設客員研究員
 1994: 大阪市立大学医学部第3内科、助手
 2003: 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科、講師
 2005: 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科、助教授
 2007: 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科、教授

主な共同研究者

- 森澤誠司(元大阪市立大学医学部生化学、教授)、和気健二郎(元東京医科歯科大学解剖学、教授)
 小林絢三(元大阪市立大学医学部第3内科、教授)、黒木哲夫(元大阪市立大学医学部第3内科、教授)
 山本尚三(元徳島大学医学部生化学、教授)、上田夏生(現香川大学医学部生化学、教授)
 吉里勝利(広島大学名誉教授、現、大阪市立大学客員教授)、
 井上正康(現大阪市立大学医学部生化学、教授)、向谷知世(現、(株)フェニックスバイオ)

主な研究課題

- ・肝臓の炎症過程における類洞壁細胞の関与に関する研究
- ・肝臓の線維化過程における星細胞の関与の研究
- ・星細胞から発見したサイトグロビンの機能解析
- ・NASH モデルの作製とその病態解析
- ・IFN を用いた HCV 排除の臨床研究

これまでの研究実績

- ・論文の本数: 英文原著論文 120 編
 - 英文著書 34 編
 - 英文総説 25 編
 - 和文原著 25 編
 - 和文著書 49 編
 - 和文総説 55 編
 - 症例報告 5 編
- ・受賞数: 3回(大阪市医学会市長賞、日本肝臓学会研究奨励賞、Karl von Kupffer 賞)
- ・特許の出願数: 3
- ・政策提言: 0

平成20年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：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課題番号：H20-肝炎-一般-004研究代表者：佐田 通夫**I. 研究の意義**

- (1) 肝炎・肝硬変に対する有効な再生療法やワクチンが存在しない。
- (2) 肝疾患に合併する様々な代謝異常については病態が解明されていない。
- (3) C型肝炎にみられる肝外合併症の実態が把握できておらず、国民の認知度も十分でない。
- (4) 肝炎ウイルス以外の肝臓の危険因子が明らかでない。
- (5) 肝炎・肝硬変の成因に基づいた治療法が存在しない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 肝炎・肝硬変に対する細胞移植療法およびワクチンの開発
- (2) 肝疾患にみられる代謝異常に対する臨床病態解析と治療介入による病態改善
- (3) C型肝炎の肝外合併症に対する実態調査と国民への啓発活動
- (4) 肝炎ウイルス以外の肝臓の危険因子同定（生物統計学的解析・病理学的解析）
- (5) 自己免疫が関与する肝炎・肝硬変の臨床病態解析と治療法の開発

III. 1年間の研究成果

- ・研究代表者・研究分担者(伊東 恭悟)
 - (1-1) 血管内皮前駆細胞の移植法の改良に成功した。
 - (1-2) ペプチドワクチンによりC型肝炎ウイルスが減少した症例を経験した。
- ・研究代表者・研究分担者(長尾 由実子・川口 巧・児島 将康)
 - (2-1) 慢性肝疾患患者の食欲亢進活性を有する「活性化グレリン」の変化を明らかにした。
 - (2-2) インスリン投与もしくはSU剤の使用は、肝発癌と有意に関連する事を明らかにした。
 - (2-3) BCAA含有食品の大規模コホート調査においてデータ収集を終了した(n = 208)。
- ・研究代表者・研究分担者(長尾 由実子)
 - (3-1) ビブリオ・バルニフィカス感染症の全国調査を実施すると共に(14医療機関; n = 1336)、小冊子を作成し、啓発活動を行なった。
 - (3-2) 慢性肝疾患患者における口腔カンジダ症の発症率とその経時的変化につき検討中である。
- ・研究分担者(横須賀 収・角間 辰之・矢野 博久・八橋 弘・加藤 淳二・川口 巧)
 - (4) 非B非C肝臓のリスク因子として、探索的統計解析より、AST、肝硬変、PIVKA-IIが同定された。また、病理学的検討より、線維化、脂肪化、糖原核、鉄沈着が明らかとなった。
- ・研究分担者(大平 弘正・清家 正隆・井出 達也)
 - (5) 自己免疫性肝炎における病気進展に関する病態解析を目的に、他施設共同研究を開始した。

IV. 21~22年度の課題

- (1) 血管内皮前駆細胞移植の改良法による肝再生能力の改善効果およびペプチドワクチンによる肝発癌抑制効果を検討する。
- (2) BCAA含有食品の大規模コホート調査生物統計学的解析を行う。また、ピオグリタゾンによるインスリン抵抗性改善効果を検討する。
- (3) 抗ウイルス療法の口腔カンジダ症に及ぼす影響および乾癬・血小板減少への対策を検討する。
- (4) 生物統計学者により、非B非C肝癌リスク因子の樹形モデルを作成し、日常臨床に直接還元する。
- (5) 自己免疫性肝炎の実態調査を実施し(予定症例数300)、臨床病態解析と治療法の開発に取り組む。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 新規医療開発に伴う医療の向上
- (2) 代謝異常の病態解析に基づいたメタボリック症候群への治療応用と国民の保健向上
- (3) 肝外病変に関する小冊子発刊および市民公開講座開催などの啓発活動による社会貢献
- (4) 非B非C肝癌の早期発見率改善に伴う医療費抑制効果
- (5) 肝炎・肝硬変の成因に基づいた治療ガイドラインの作成

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

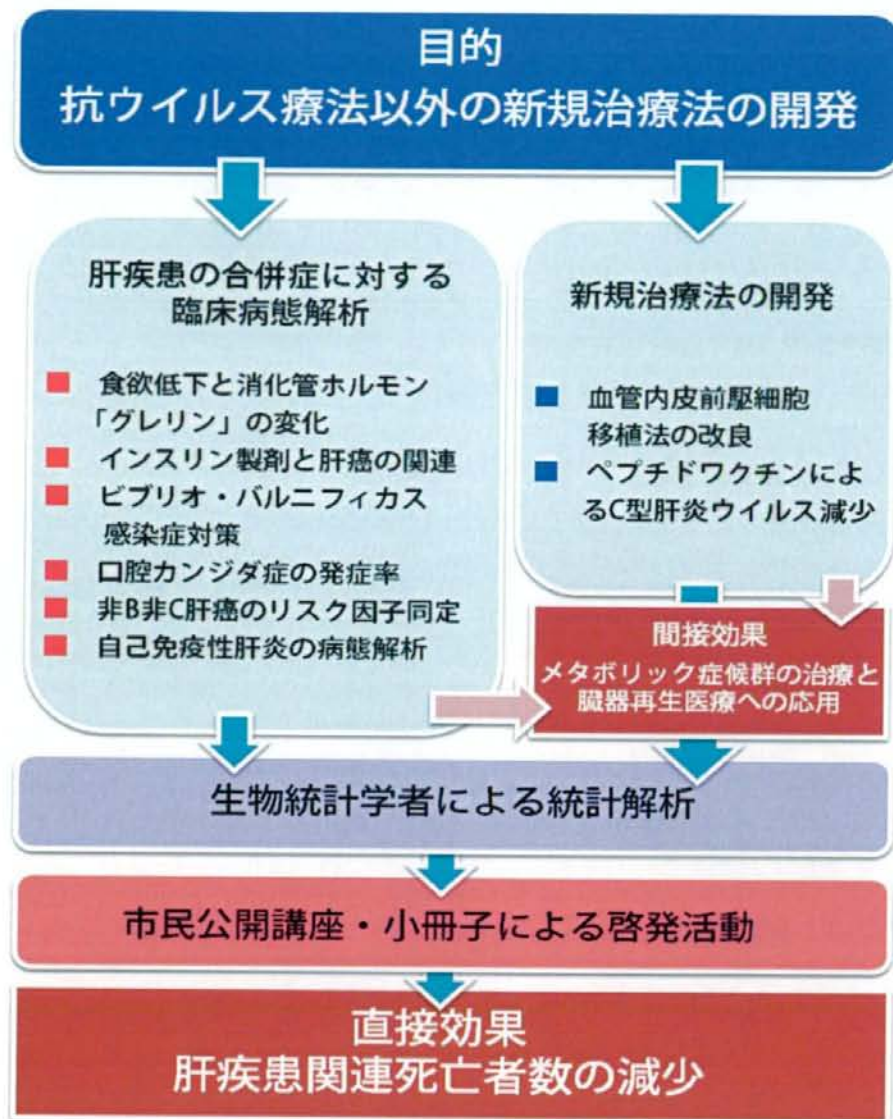
・研究代表者・研究分担者(伊東 恭悟・長尾 由実子・川口 巧・井出 達也)

- (1) Kawaguchi T, Nagao Y, Matsuoka H, Ide T, Sata M. Branched-chain amino acid-enriched supplementation improves insulin resistance in patients with chronic liver disease. *Int J Mol Med* 2008;22:105-112.
- (2) Nagao Y, Kawasaki K, Sata M. Insulin resistance and lichen planus in patients with HCV-infectious liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:580-585.
- (3) 肝疾患に伴う浮腫の判定方法(特許出願中:川口 巧・坂田 雅浩・惣中 一郎・佐田 通夫)
- (4) C型肝炎ウイルスによる肝癌の発症および再発予防ワクチン(特許出願中:伊東 恭悟・佐田 通夫)

・研究分担者(児島 将康・角間 辰之・横須賀 収・大平 弘正・伊東 恭悟・矢野 博久・加藤 淳二・八橋 弘)

- (1) Okamoto Y, Matsuda K, Hiramoto I, Tani H, Kimura K, Yada Y, Kakuma T, Higuchi S, Kojima M, Matsuishi T. Ghrelin and leptin modulate immunity and liver function in overweight children. *Pediatrics Int* 2008 in press.
- (2) Imazeki F, Yokosuka O, Fukai K, Kanda T, Kojima H, Saisho H. Prevalence of diabetes mellitus and insulin resistance in patients with chronic hepatitis C: comparison with hepatitis B virus-infected and hepatitis C virus-cleared patients. *Liver Int* 2008;28: 355-362.
- (3) Takahashi A, Kanno Y, Takahashi Y, Sakamoto N, Monoe K, Saito H, Abe K, Yokokawa J, Irisawa A, Ohira H. Development of autoimmune hepatitis type I after pulsed methylprednisolone therapy for multiple sclerosis: A case report. *World J Gastroenterol* 2008;14:5474-5477.
- (4) Fukahori S, Yano H, Akiba J, Ogasawara S, Momosaki S, Sanada S, Koratomi K, Ishizaki Y, Moriya F, Yagi M, Kojiro M. Fucoïdan, a major component of brown seaweed, prohibits the growth of human cancer cell lines in vitro. *Molecular Medicine Reprots* 2008;1:537-542.
- (5) Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, Suzuki Y, Torimoto Y, Kato J. Dysregulation of systemic iron metabolism in alcoholic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:S78-81.
- (6) Kusumoto K, Yatsushashi H, Nakao R, Hamada R, Fukuda M, Tamada Y, Taura N, Komori A, Daikoku M, Hamasaki K, Nakao K, Ishibashi H, Miyakawa Y, Eguchi K. Detection of HBV core promoter and precore mutations helps distinguish flares of chronic hepatitis from acute hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:790-3.

VII. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等



本年度、作成した小冊子の一部を抜粋。
本小冊子を用いて2008年11月16日に
啓発活動を実施した。



全22頁 2008年11月発刊

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

- 昭和 50年 4月 久留米大学医学部第二内科講座 (現 内科学講座消化器内科部門) 入局
 昭和 52年 4月 同大学 医学部第二内科講座 (現 内科学講座消化器内科部門) にてウイルス
 肝炎の病態解明、治療、予防法の確立を目指した疫学及び臨床研究を開始
 昭和 59年 1月 同大学 医学部第二内科講座 (現 内科学講座消化器内科部門) 講師
 平成 6年 4月 同大学 医学部第二内科講座 (現 内科学講座消化器内科部門) 助教授
 平成 10年 5月 同大学 医学部第二内科講座 (現 内科学講座消化器内科部門) 教授 (一現在)
 平成 10年 5月 同大学 先端癌治療研究センター運営委員
 肝癌の病態解明、治療法の開発研究プロジェクトに参加
 平成 15年 11月 同大学病院 肝癌センター・センター長 (平成 18年 3月まで)
 平成 19年 4月 同大学 臨床試験センター、先端癌治療研究センター・センター長 (一現在)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

共同研究者: 伊東恭悟 教授 (久留米大学医学部免疫・免疫治療学講座)

・主な研究課題

ウイルス肝炎及び肝癌の病態と治療

・これまでの研究実績

- (1) Kawaguchi T, Nagao Y, Matsuoka H, Ide T, Sata M. Branched-chain amino acid-enriched supplementation improves insulin resistance in patients with chronic liver disease. *Int J Mol Med* 2008;22:105-112.
- (2) Nagao Y, Kawasaki K, Sata M. Insulin resistance and lichen planus in patients with HCV-infectious liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:580-585.
- (3) Nakamura T, Torimura T, Sakamoto M, Hashimoto O, Taniguchi E, Inoue K, Sakata R, Kumashiro K, Murohama T, Ueno T, Sata M. Significance and therapeutic potential of endothelial progenitor cell transplantation in a cirrhotic liver rat model. *Gastroenterology* 133:91-107, 2007
- (4) Yoshida T, Ogata H, Kamio M, Joo A, Shiraishi H, Tokunaga Y, Sata M, Nagai H, and Yoshimura A. SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. *J Exp Med* 199:1701-1707, 2004
- (5) Koga H, Harada M, Ohtsubo M, Shishido S, Kumemura H, Hanada S, Tniguchi E, Yamashita K, Kumashiro R, Ueno T, and Sata M. Troglitazone induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulating Skp2 in human hepatoma cells. *Hepatology* 37: 1086-1096, 2003
- (6) Yoshida T, Hanada T, Tokuhisa T, Kosai K, Sata M, Kohara M, and Yoshimura A. Activation of STAT3 by the hepatitis C virus core protein leads to cellular transformation. *J Exp Med* 196:641-653, 2002
- (7) 肝疾患に伴う浮腫の判定方法 (特許出願中: 川口 巧・坂田 雅浩・惣中 一郎・佐田 通夫)
- (8) C型肝炎ウイルスによる肝癌の発症および再発予防ワクチン (特許出願中: 伊東 恭悟・佐田 通夫)
- (9) 財団法人 車輛競技公益資金記念財団 がんの基礎的研究助成事業 2005-2007年度: 肝発癌にみられる細胞内シグナルの活性化機構とその抑制 研究代表者
- (10) 文部科学省研究助成金 基盤研究C 2004-2006年度: C型肝炎ウイルスによるインスリン抵抗性発症の分子機構解明 研究代表者
- (11) 2003年 21世紀 COE 健康安全確保総合研究プログラム「先端的な癌治療研究の拠点形成」
- (12) 文部科学省都市エリア産学官連携促進事業: 肝癌再発防止を目的としたテラメイド型ペプチドワクチンの開発 研究代表者

平成 20 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝発癌抑制を視野に入れた肝硬変の栄養療法のガイドライン作成を目指した総合的研究

課題番号：H20-肝炎一般-005

研究代表者：鈴木 一幸

I. 研究の意義

- (1) 肝硬変患者の肥満度、栄養摂取量に関する全国的な実態調査は未だ施行されていない。
- (2) 肝硬変患者にみられる各栄養素の栄養代謝異常を総合的に解析して成因別にその特徴を明らかにすることは、肝病変の進展や肝予備能の維持を図る方策を考えるうえで重要な課題である。
- (3) 栄養療法として推奨されている分割食 (late evening snack: LES)、分岐鎖アミノ酸療法の意義 (インスリン抵抗性の改善、肝発癌抑制効果を含めた) は未だ十分に検証されていない。
- (4) 日本人肝硬変に見合った栄養療法のガイドラインについてはわが国では未だ確立されていない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) わが国の肝硬変患者の肥満度、栄養摂取量の実態を成因別に明らかにする。
- (2) 肝硬変患者の栄養代謝異常の特徴を明らかにし、その是正に資する方策を見出す。
- (3) 栄養療法ことに鉄制限食及び分岐鎖アミノ酸療法の実施が肝発癌抑制につながる治療法であることを検証する。
- (4) 肝発癌抑制を視野に入れた肝硬変に対する適切な栄養療法のガイドラインを提示しその普及を図ることにより肝不全及び肝癌死の減少が期待される。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者

- (1) 班研究の目的と到達目標及び研究分担者の役割を明確にするため班会議を2度開催した。
- (2) 自施設における過去10年間の肝硬変の実態調査 (成因別頻度、肝病態発癌率)、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 製剤の使用実態調査を行ない肝発癌率との関連を後ろ向き研究より検討中である。
- (3) 班研究の多施設共同研究案 (鉄、亜鉛摂取量を含む栄養摂取量調査、BCAA 顆粒製剤による2次発癌抑制効果に関する前向き試験など) を立案し班会議での検討を経て準備した。

・研究分担者 (森脇久隆、西口修平、加藤章信、鈴木壱知、高後 裕、坂井田 功、片山和宏)

- (1) 研究分担者の役割を明確にし、研究に着手した。
- (2) 各研究分担者が行った研究内容については VII に示す概要図等に示した。

IV. 21~22年度の課題

- (1) 肝硬変症例の身体計測・肥満度・栄養摂取状況について大規模実態調査を行う。
- (2) 肝硬変の栄養代謝異常を検討し、合わせて血清アルブミンに代わる新たな栄養指標を見出す。
- (3) 肝硬変の低栄養状態とインスリン抵抗性、免疫機能との関連性を検討する。
- (4) BCAA 顆粒製剤による血中アルブミン存在様式(酸化型、還元型)の変化を多数例で検討する。
- (5) 分割食(LES)、亜鉛補充療法の臨床的効果をさらに検証する。
- (6) BCAA 療法、鉄制限食などによる肝硬変の生命予後ことに肝発癌抑制効果の検証を行う。
- (7) 班研究を円滑に遂行するために新たに研究分担者および研究協力者を加える。

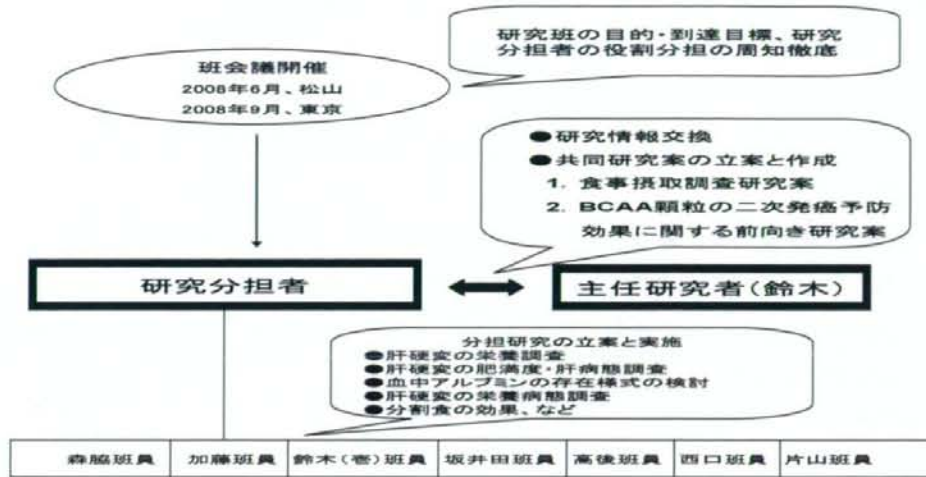
V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 成因別の肝硬変の栄養代謝異常とその特徴を明らかにし、食事療法を含めた栄養療法の意義を公表・提示することは肝臓診療に関わる医師、管理栄養士に有用な情報を提供する。
- (2) 肝発癌に関わる栄養学的因子を明らかにすることは将来増加が予測される非 B 非 C 型肝炎患者(NASH)からの肝臓発生率及び死亡率の減少をもたらす可能性がある。
- (3) 日本人の肝硬変に見合った適切な栄養療法のガイドラインを作成して公表しその普及を図ることは肝硬変患者のみならず国民の健康維持に極めて有益である。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) 鈴木一幸：消化器疾患②肝疾患。病態栄養ガイドブック(改定第2版)。メディカルレビュー社、2008。
- (2) 黒田英克、小野寺巳美緒、柿坂啓介、館道芳徳、及川隆喜、片岡晃二郎、高橋裕也、葛西幸穂、八角有紀、牛尾 晶、佐原 圭、宮本康弘、及川寛太、熊谷一郎、渡辺雄輝、宮坂昭生、葛西和博、遠藤龍人、阿倍弘一、滝川康裕、鈴木一幸：当科における肝硬変の成因別頻度。2008 肝硬変の成因別実態(恩地森一監修)。中外医学社、2008、p42-46
- (3) 加藤章信、鈴木一幸：肝疾患。病態栄養専門医テキスト。南江堂、2008。
- (4) 加藤章信：食事療法。患者さんの質問に答える慢性肝疾患診療。南山堂、2008。
- (5) Korenaga K, Korenaga M, Uchida K, Yamasaki T, Sakaido I. Effects of a late evening snack combined with alpha-glucosidase inhibitor on liver cirrhosis. *Hepatol Res* 38, 2008.
- (6) Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 88, 2008.
- (7) Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, Suzuki Y, Torimoto Y, Kato J. Dysregulation of systemic iron metabolism in alcoholic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 23, 2008.
- (8) Tatebe H, Shimizu M, Shirakami Y, Tsurumi H, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition by 9-cis-retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 14, 2008.
- (9) 森脇久隆。病態別の栄養管理(肝炎、肝硬変、肝不全)。レジデントのための栄養管理マニュアル。文光堂、2008。

VII. III (1年間の研究成果)の概要図等



・研究分担者：森脇班員はNASH関連肝発癌モデルを用いてBCAA投与による肝脂肪化、線維化、発癌抑制に関する研究を行い、BCAA投与群で発癌抑制が有意であり、その機序としてインスリン抵抗性の改善にあるという知見を得た。加藤班員は全国16施設の協力を得て肝硬変733例(肝癌合併例を含む)を対象に肥満度(BMI)を含めた栄養学的調査を実施し、BMI25以上の症例は全体の29%に認められ、その頻度は成因によって差異(HBV:26.7%, HCV:26.4%, アルコール性39.4%, NASH:39.7%)があることを示した。鈴木(壺)班員はC型慢性肝疾患患者229名(慢性肝炎106名、肝硬変123名)について栄養摂取状況を調査しBMIや栄養パラメータとの比較検討を行った結果、肝硬変ではエネルギー及び蛋白摂取量が適正な患者は約31%にすぎず管理栄養士による栄養指導の重要性を示唆する成績を得た。西口班員は過去3年間に入院加療を受けたC型肝硬変患者480例について肥満度と肝機能・肝予備能との関連を検討し、BMI25以上の患者では肝予備能の低下がみられること、また同時期に入院したC型慢性肝炎を含めた慢性肝疾患843例について発癌率を検討したところ、高齢者以外に50～59歳の男性では有意に発癌率が高く、肥満やインスリン抵抗性を有していることを示した。高後班員は不安定自由鉄として細胞毒性に働くトランスフェリン非結合鉄(NTBI)の定量法であるHPLC法を改良し、健常人レベルまで測定可能な系を確立した。坂井田班員はブドウ糖負荷試験にて糖尿病型を呈する肝硬変患者にαグルコシダーゼ阻害薬併用にLESの効果を検討し、食後の高血糖の是正による耐糖能の改善、エネルギー代謝および栄養状態の改善が得られることを確認した。片山班員は血清亜鉛濃度に及ぼす利尿薬の影響について検討中である。

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

1973年4月～1992年8月 岩手医科大学医学部生化学講座及び内科学第一講座

1992年9月～1993年3月 Mayo Clinic (USA) Center for Basic Research in Digestive Disease

1993年4月～現在に至る 岩手医科大学医学部内科学第一講座

(2008年4月から組織改変：内科学講座消化器・肝臓内科学分野)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

(1)自治医科大学 真弓 忠(前)教授、岡本 宏明教授

(2)名古屋市立大学 溝上 雅史教授

(3)広島大学 吉澤 浩司教授

(4)モントリオール大学(カナダ) Butteworth 教授

・主な研究課題

(1)急性肝不全(劇症肝炎を含む)の病態と治療

(2)慢性肝不全(肝性脳症)の病態と治療

(3)肝疾患の栄養代謝および微量元素動態解析と栄養治療

(4)ウイルス肝炎の疫学・病態解析

・これまでの研究実績

- (1) Watanabe Y, Kato A, Sawara K, Butterworth RF, Sasaki T, Terasaki K, Sera K, Suzuki K. Selective alterations of brain dopamine D2 receptor binding in cirrhotic patients: results of 11C-N-methylspiperone PET study. *Metab Brain Dis* 2008.
- (2) Nakaya Y, Okita K, Suzuki K, Moriwaki H, Kato A, Miwa Y, Shiraishi K, Okuda H, Onji M, Kanazawa H, Tsubouchi H, Kato S, Kaito M, Watanabe A, Habu D, Ito S, Ishikawa T, Kawamura N, Arakawa T for the Hepatic Nutritional Therapy (HNT) Study Group. BCAA-enriched snack improves nutritional state of cirrhosis. *Nutrition* 2007.
- (3) Ozawa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang JH, Hige S, Kuramitsu T, Suzuki K, Tanaka E, Okada S, Tokita H, Asahina Y, Inoue K, Kakumu S, Okanoue T, Murawaki Y, Hino K, Onji M, Yasuhashi H, Sakugawa H, Miyakawa Y, Ueda R, and Mizokami M. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006.
- (4) Muto Y, Sato S, Watanabe A, Moriwaki H, Suzuki K, Kato A, Kato M, Nakamura T, Higuchi K, Nishiguchi S, Kumada H, Ohashi Y. Overweight and obesity increase the risk for liver cancer in patients with liver cirrhosis and long-term oral supplementation with branched-chain amino acid granules inhibits liver carcinogenesis in heavier patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2006.
- (5) Suzuki K, Aikawa T, and Okamoto H: Fulminant hepatitis E in Japan. *New Engl J Med* 2002.