

第 57 回日本ウイルス学会、10 月、東京。
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2008-063642、HB s ペプチド融合
体、上田啓次 (申請中)

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

オステオアクチビンの肝障害、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
座 消化器疾患・生活習慣病学 准教授

研究要旨:オステオアクチビ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型肝炎病態進展におけるオステオアクチビ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血清オステオアクチビン濃度を測定し、また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 および rs3757450)について解析した。血清オステオアクチビン濃度は、HCV-RNA陰性のHCV既感染者に比して、HCV-RNA陽性の持続感染者で有意に上昇しており、HCV持続感染者ではALT上昇例において有意に上昇し、病態の進展に伴い上昇する傾向がみられた。オステオアクチビンのSNP解析では、rs858239 TT、rs3757450 AG/GGは、HCV-RNAの有無との関連性は認められなかったが、 γ グロブリン、VI型コラーゲン7S、血清フェリチンの上昇と関連し、rs3757450 AG/GGではALT値上昇または動揺例が有意に多かった。一方、マクロファージ細胞株にてオステオアクチビンの発現を抑制するとサイトカイン産生が抑制された。以上の結果から、炎症のフィードバック調節因子として作用するオステオアクチビンがC型慢性肝炎持続感染者においてその病態進展に何らかの影響を与えていることが示唆された。

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

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

玉井 努 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 特任助教

熊谷公太郎 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

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

オステオアクチビ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チビ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チビンはその転移、進展に関与していることも報告された。

以上の報告から、オステオアクチビンは傷害組織

A. 研究目的

オステオアクチビ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

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チピンはその進展、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ピンの役割を明らかにすることである。

B. 研究方法

1. HCV 抗体陽性者におけるオステオアクチピンの血清レベルと SNP の解析

1) 対象：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 人を対象とした。

2) 血清オステオアクチピンの測定：対象者の保存血清を用いて、血清オステオアクチピン濃度を ELISA 法にて測定した。

3) オステオアクチピン遺伝子 5' 上流領域の SNP の解析：オステオアクチピン遺伝子 5' 上流領域に存在する二つの 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. マクロファージのサイトカイン産生に及ぼすオステオアクチピンの影響

マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞にオステオアクチピンの siRNA を導入し、サイトカイン発現をリアルタイム RT-PCR で検討した。

C. 研究結果

1. HCV 抗体陽性者におけるオステオアクチピンの血清レベルと SNP の解析

1) 対象者の臨床背景を表 1 に示す。HCV 持続感染者 (HCV-RNA 陽性者) は HCV 既感染者 (HCV-RNA 陰性者) に比して、輸血歴があり ($p=0.0280$)、AST 値 ($p<0001$)、ALT 値 ($p<0001$)、インスリン値 ($p=0.0002$) が有意に高く、血小板

数 ($p<0001$)、 γ グロブリン値 ($p<0001$)、中性脂肪 ($p=0.040$)、総コレステロール値 ($p<0001$) は有意に低かった。

2) 血清オステオアクチピン濃度は、HCV-RNA 陰性の HCV 既感染者に比して、HCV-RNA 陽性の持続感染者で有意に上昇しており ($p<0.001$)、HCV 持続感染者では ALT 動揺例および持続上昇例において有意に上昇し ($p<0.05$)、慢性肝炎よりも肝硬変患者において高値を示す傾向がみられた。

3) 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、 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. マクロファージのサイトカイン産生に及ぼすオステオアクチピンの影響

オステオアクチピンを発現する RAW264.3 細胞にオステオアクチピンの siRNA を導入して、その発現を 90% 抑制すると、IL-18、IL-6、MCP1 の発現が増強した。

D. 考 察

HCV 既感染者に比して HCV 持続感染者において血清オステオアクチピン濃度が有意に上昇しており、HCV 感染の存在によってマクロファージが活性化され、オステオアクチピンが誘導されていることが考えられる。また、HCV 持続感染者においては正常肝よりも、慢性肝炎、肝硬変において血清オステオアクチピン濃度が上昇する傾向があり、ALT 上昇例において有意に高値を呈していた。オステオアクチピンは炎症のフィードバック調節因子であり、肝炎の活動性の強さに並行して、代償的に血清濃度が上昇していることが考えられた。

一方、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その活動性と関連していることが推測された。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。

E. 結 論

HCV 抗体陽性者を対象にオステオアクチビンの血清濃度および 5'上流領域に存在する二つの SNP (rs858239, rs3757450) を解析し、オステオアクチビンが C 型肝炎の病態進展に関与している可能性が示唆された。肝臓の在在マクロファージであるクッパー細胞は感染のない状態でも常に腸管由来の抗原に暴露されており、抑制的に機能していることが知られている。オステオアクチビンは肝障害時に肝マクロファージに強発現する炎症のフィードバック調節因子であり、肝炎の持続あるいは活動性の強さに何らかの影響を与えていることが考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* (in press)
2. Nishida C, Uto H, Oketani M, Tokunaga K, Nosaki T, Fukumoto M, Oku M, Sogabe A,

Moriuchi A, Ido A, Tsubouchi H. Clinical significance of alanine aminotransferase levels and the effect of ursodeoxycholic acid in hemodialysis patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2009; Nov 5 [Epub ahead of print]

3. Kikkawa YS, Nakagawa T, Tsubouchi H, Ido A, Inaoka T, Ono K, Ito J. Hepatocyte growth factor protects auditory hair cells from aminoglycosides. *Laryngoscope* 2009; 119: 2027-31.
4. Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsubouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. *Hepatology* 2009; 50: 393-9.
5. Ido A, Tsubouchi H. Translational research to identify clinical applications of hepatocyte growth factor. *Hepatol Res* 2009; 39: 739-47.
6. Inaoka T, Nakagawa T, Kikkawa YS, Tabata Y, Ono K, Yoshida M, Tsubouchi H, Ido A, Ito J. Local application of hepatocyte growth factor using gelatin hydrogels attenuates noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 2009; 50: 393-9.
7. Kanmura S, Uto H, Numata M, Hashimoto S, Moriuchi A, Fujita H, Oketani M, Ido A, Kodama M, Ohi H, Tsubouchi H. Human neutrophil peptide 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 909-17.

2. 学会発表

1. 熊谷公太郎、井戸章雄、高見陽一郎、佐々木文郷、馬渡誠一、呉健、最勝寺晶子、橋口正史、

森内昭博、宇都浩文、桶谷眞、坪内博仁：C型
肝炎ウイルス抗体陽性者におけるオステオア
クチピン遺伝子のSNP解析：第46回日本消化
器免疫学会総会（2009年7月23日）松山

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
γ-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（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： これまでに同定した肝細胞がん（肝がん）組織での発現が亢進している腫瘍標的抗原（AFP, hTERT, MRP3）に由来する HLA-A24 拘束性抗原エピトープの反応を治療経過と合わせて解析し、臨床的意義について検討した。肝動脈塞栓療法(TAE)群と樹状細胞併用(TAE+DC)群の比較において、樹状細胞の併用により抗腫瘍免疫が高率に誘導された。しかし、症例ごとの詳細な解析において抗腫瘍免疫反応の誘導と肝がんの再発抑制効果には明らかな相関を認めなかった。この原因のひとつとして、経時的な観察における抗腫瘍免疫の誘導が一過性であることを見出した。

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について解析を進めてきた。本研究では、これまでに同定した肝がん組織で発現が亢進している腫瘍標的抗原（AFP, hTERT, MRP3）に由来する HLA-A24 拘束性抗原エピトープの反応を治療経過と合わせて検討した。

B. 研究方法

各種画像検査もしくは病理組織検査にて肝細胞がんと診断され、肝動脈塞栓療法(TAE)または樹状細胞併用療法(TAE+DC)が施行された 33 例を対象とした。

HLA-A24 拘束性 AFP, hTERT, 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。

（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたっては、倫理性・安全性の確保に十分配慮する。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従うとともに、実施機関である「金沢大学医学倫理委員会」の審査体制のもとに行う。また、個人情報保護の観点からすべてのサンプル及び結果は番号化する。

C. 研究結果

1) TAE+DC 群では、TAE 群に比較して治療後の腫瘍抗原ペプチドに対する CTL 反応が高率に誘導されており、治療後再発率も少ない傾向にあった。

2) Tリンパ球分画に関する検討について、腫瘍抗原の刺激によって CD 8 陽性分画に加えて CD 4 分画においても INF- γ 産生を認め活性化されていることが示された。

3) 治療後の肝組織における免疫組織学的検討では、CD 4、CD 8、CD 14 陽性細胞が腫瘍の周辺組織に浸潤していた。

4) 個々の症例に関する経過を詳細に観察すると、誘導された抗腫瘍免疫反応と肝がんの治療後再発には明らかな相関を認めなかった。

5) 4) の再発抑制効果が明らかでない原因のひとつとして、免疫反応が一過性であることが示唆された。

D. 考察

腫瘍抗原 AFP, hTERT, MRP3 に対する免疫反応の臨床的意義を肝がんの局所治療及び樹状細胞投与後の経過と合わせて検討した。TAE+DC 群における CTL 反応の亢進は、樹状細胞によって腫瘍抗原がナイーブ Tリンパ球に提示されて腫瘍傷害性の高いエフェクター Tリンパ球が誘導されたものと考えられる。さらに、腫瘍組織においても CD 4、CD 8 陽性 Tリンパ球、CD 14 陽性単球/マクロファージの浸潤を認め抗腫瘍免疫の誘導を裏付ける所見が得られた。

そして、TAE+DC 群において治療後の再発率が低下する傾向は認めたものの、個々の症例に関する解析において、CTL 反応として誘導された抗腫瘍免疫が有効に肝がんの再発を抑制する事象は観察されなかった。この原因として、誘導された CTL 反応の程度が十分でなかった可能性、検討に用いた免疫反応が有効な抗腫瘍効果を発揮するものではなかった可能性、免疫反応の誘導が一過性であり持続期間が抗腫瘍効果に不十分であった可能性などが示唆された。今後は、これらの可能性を克服する手法の開発が必要であると考えられた。

E. 結論

肝がんの腫瘍標的抗原として同定した AFP, hTERT, MRP3 の抗原エピトープに関する免疫反応を治療経過と合わせて検討した。がん局所治療後に一過性の反応亢進を認

めるものの、肝がんの再発抑制への関与は更なる検討が必要と考えられた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 2009 (in press).
2. Wu Y, Wang YY, Nakamoto Y, Li YY, Baba T, Kaneko S, Fujii C, Mukaida N: Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in liver. *Oncogene* 2009 (in press).
3. Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N: Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J. Immunol.* 183: 3053-3063, 2009.

2. 学会発表

1. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: #1725; Immunological factors associated with prolonged recurrence-free survival following transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; 第60回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 50 (4, Suppl.) 1103A; 一般; poster: Nov. 3, 2009
2. Takata Y, Nakamoto Y, Nakada A, Terashima T, Mizukoshi E, Kaneko S: #1233; A correlative increase of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cell subsets and plasmacytoid dendritic cells in patients with advanced hepatocellular

carcinoma.; 第60回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 50 (4, Suppl.) 877A; 一般; poster: Nov. 1, 2009

H. 知的所有権の出願・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

サイトカインを用いた消化器癌に対する免疫療法の検討

研究分担者 広石 和正 昭和大学医学部消化器内科 准教授

研究要旨

消化器癌患者は免疫抑制状態に陥っていることが多く、免疫療法で消化器癌を治療するには、強く抗腫瘍免疫を誘導する必要がある。本研究では IL-4 と CpG 併用による免疫治療を検討した。IL-4 を遺伝子導入したマウス消化器癌細胞株と CpG とを、野生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接種したところ、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 CD8 陽性細胞が関与していた。IL-4 と CpG との併用により、高い抗腫瘍効果が誘導されることが分かり、これらのサイトカインを用いた免疫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、多彩な免疫活性作用を有する IL-4 と 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。In vivo の治療モデ

ルとして、IL-4 遺伝子を導入した MC38 細胞 (MC38-IL4) と CpG とを、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、治療目的に投与した後、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、免疫組織染色やフローサイトメトリーで観察した。

(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-IL4 と CpG で治療することにより、IL-4 や CpG 単独治療と比較し、野生株腫瘍の増大が有意に抑制された。IL-4 と

CpGで治療したマウスの野生株腫瘍内には、CD8陽性細胞が多く浸潤していた。

D. 考察

細胞性免疫応答の活性化や、好中球賦活化作用などの多彩な免疫賦活効果を示すIL-4の抗腫瘍作用を、CpGは増強することが明らかとなった。これらの治療は、今後の臨床への応用も期待できると考えられた。

E. 結論

IL-4と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) Infection of B cells with hepatitis C virus for the development of lymphoproliferative disorders in patients with chronic hepatitis C. Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimosuma Y, Morikawa K, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K, Miyakawa Y, Imawari M. J Med Virol. 2009 Apr;81(4):619-27.

2) Strong CD8(+) T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma.

Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Shimazaki T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Uozumi S, Omori R, Matsumura T, Yanagawa T, Ito T, Imawari M. J Gastroenterol. 2010 in press.

2. 学会発表

1) インターロイキン-4とCpGを用いた消化器癌に対する免疫療法の検討. 土肥弘義、広石和正、江口潤一、石井成明、平出綾子、坂木理、井廻道夫. 第95回日本消化器病学会総会

2) C型肝炎におけるCTLエピソードの同定とCTL応答の解析. 広石和正、江口潤一、石井成明、平出綾子、土肥弘義、井廻道夫. 第45回日本肝臓学会総会

3) 肝細胞癌患者の腫瘍抗原特異的細胞性免疫応答と治療後肝癌再発に関する検討. 広石和正、土肥弘義、江口潤一、石井成明、平出綾子、坂木理、大森里紗、伊藤敬義、馬場俊之、井廻道夫. 第13回日本肝臓学会大会.

4) Tumor associated antigen-specific CD8+ T-cell responses would suppress recurrence of hepatocellular carcinoma. Hiroishi, K., Doi, H., Baba, T., Eguchi, J., Ishii, S., Hiraide, A., Sakaki, M., Uchikoshi, M., Shimosuma, Y., Ohmori, R., Ito, T., Imawari, M. The Liver Meeting 2009, The 60th 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

肝癌細胞に対する Sorafenib による MICA shedding の制御機構

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： Sorafenib は肝細胞癌に対する新たな分子標的治療薬として承認されその臨床応用が始まっている。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。A disintegrin and metalloproteinases (ADAM) ファミリーのノックダウン実験により、ADAM9 が MICA の分泌に関与しており、Sorafenib により肝がん細胞の ADAM9 の発現を抑制することで MICA の分泌を阻害し、結果的に NK 細胞に対する感受性が増強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 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 shedding メカニズムを明らかにし、これを制御することができれば、新規の癌免疫治療法を構築することが期待される。

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 Flow cytometry 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、これを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。Multi-kinase inhibitor である Sorafenib を肝がん細胞株に添加し、ADAM9 の発現および MICA shedding を検討するとともに、NK 細胞に対する感受性をクロムリリース法で検討した。

C. 研究成果

HepG2、PLC/PRF/5 細胞株において ADAM9 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。MICA は ADAM9 により Gln347 と Val348 の間で切断されていることが予想されたため、MICA の ADAM9 による cleavage site を mutation あるいは deletion したプラスミドを作成し ADAM9 の MICA の shedding における意義を検討した。その結果 MICA は ADAM9 の細胞内認識部位にて切断後、細胞外の ADAM9-independent cleavage site で切断されることで、可溶性 MICA が産生されることが明らかとなった。免疫組織学的検討では、ADAM9 は正常肝組織に比較して肝癌組織で強発現していた。ADAM9 ノックダウンすることで肝癌細胞に対する NK 細胞の細胞傷害活性は有意に上昇し、その上昇は MICA/NKG2D pathway 依存性であった。肝癌細胞株に Sorafenib 処理をすると、ADAM9 の発現が抑制され、MICA shedding が低下し、膜結合型の MICA の発現が増強し、可溶性 MICA の産生が抑制された。さらに Sorafenib 添加により、肝癌細胞の NK 細胞に対する感受性が増強することが明らかとなった。

D. 考察と結論

肝癌細胞における MICA shedding には ADAM9 が関与していた。Sorafenib は肝癌細胞における ADAM9 の発現を低下させ、これにより MICA shedding を阻害した。Sorafenib は Raf/MEK/ERK の経路を阻害するのみならず VEGF-3、PDGFR、Flt3、

c-kit、Ret など、血管新生および細胞増殖に関わる受容体チロシンキナーゼに対する強い阻害活性があり、その抗腫瘍効果は腫瘍細胞に対する直接的な効果と血管新生阻害作用によると考えられている。今回我々は新たに Sorafenib により肝がんの NK 細胞に対する感受性を増強することを示した。本研究結果は ADAM9 を標的とした肝がんの新たな免疫化学療法の確立が期待される。

E. 研究発表

論文発表

1. Sasakawa A, Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Yamamoto , Ohkawa K, Miyagi T, Hayashi N. Activated liver dendritic cells generates strong acquired immunity in α -galactosylceramide treatment. **Journal of Hepatology** 50: 1155-1162, 2009
2. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Li W, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, Hennighausen L, Tatsumi T, Hayashi N. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult liver. **Hepatology** 50:1217-1226, 2009
3. Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hennighausen L, Yin XM, Hayashi N. BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. **Hepatology** 50: 1972-1980, 2009
4. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T,

Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anti-cancer chemotherapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. **Cancer Research** 69: 8050-8057, 2009

5. Uemura A, Takehara T, Miyagi T, Suzuki T, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Natural killer cell is a major producer of interferon γ that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice. **Cancer Immunol Immunother** 59: 453-463, 2010.
6. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ishida H, Miyagi T, Hosui A, Hayashi N. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. **Hepatology** (in press)

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。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。Tregには胸腺で分化するNatural Tregと、末梢で樹状細胞などにより誘導されるAdaptive Treg（Tr1細胞）のサブセットが存在する。本年度はC型慢性肝疾患・肝癌の病態や治療、再発過程におけるTregサブセットの関与を検討した。C型慢性肝疾患では、病期が進展するにつれてTreg頻度が増加したが、その傾向はTr1でより顕著であった。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Treg頻度は減少し、再発症例では再増加したが、治療効果、再発との関連性はTr1でより密接であった。肝癌細胞、樹状細胞との共培養によって、ナイーブCD4+T細胞からTr1が誘導され、その機序にはサイトカインと細胞間の接触が関与していた。以上よりC型肝癌の病態とTr1頻度が、より密接に関連しており、Tr1誘導機序の解明によって治療標的を同定できる可能性が示唆された。

A.研究目的

肝癌に対する新たな治療を開発するためには、肝硬変からの発癌抑制、肝癌治療後の再発抑制を目指した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、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。Tregには胸腺で分化するNatural Tregと、末梢で樹状細胞などにより誘導されるAdaptive Treg（Tr1細胞）のサブセットが存在する。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Tregサブセットの関与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+CD127-FOXP3+細胞）とTr1細胞（CD4+CD25-CD127-FOXP3-細胞）の頻度と抑制機能を比較検討した。ま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。ヒト肝癌細胞株と樹状細胞、ナイーブCD4+T細胞との共培養を行い、培養後のNatural Treg、Tr1細胞の表現型でのIL-10産生細胞の頻度を解析することで、各Tregの誘導機序を検討した。

（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、Tr1の頻度は、病期が進展するにつれて増加した。各群間の差はTr1でより顕著であった。Natural T-reg、Tr1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Natural T-reg、Tr1頻度は低下したが、治療後に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。治療再発過程での関連性も、Tr1の方がより密接であった。肝癌細胞、樹状細胞との共培養で、IL-10産生Tr1が誘導されたが、その誘導機序にIL-10、TGF-β1や、肝癌細胞とCD4+T細胞との接触が関与していた。

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Treg頻度が相関することが明らかになった。Natural TregよりもTr1細胞が、病態との関連性は密接であり、その誘導機序の解明によって、肝癌に対する免疫治療の標的分子が同定出来る可能性が示された。

E.結論

C型肝癌の発症・進展・再発にTr1が関与しており、その誘導機序にIL-10、TGF-β1などのサ

イトカインと細胞因子が関与していた。

F.健康危険情報 なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Itose, I., Kanto, T., Kakita, N., Takebe, S., Inoue, M., Higashitani, K., Miyazaki, M., Miyatake, H., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. *J Viral Hepat* 2009 16: 846-852.
- 2) Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Kurokawa, M., Igura, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Yamada, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Tamura, S., Yoshihara, H., Hayashi, E., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Pegylated interferon alpha-2b (Peg-IFN alpha-2b) affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during treatment with Peg-IFN alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat* 2009. 16: 578-585.
- 3) Inoue, Y., Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Mochizuki, K., Hagiwara, H., Oshita, M., Mita, E., Fukui, H., Inada, M., Tamura, S., Yoshihara, H., Hayashi, E., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Miyagi, T., Hoshui, A., Ishida, H., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses. *J Viral Hepat* 2009.
- 4) Hiramatsu, N., Oze, T., Yakushijin, T., Inoue, Y., Igura, T., Mochizuki, K., Imanaka, K., Kaneko, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Nagase, T., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Katayama, K., Tamura, S., Yoshihara, H., Imai, Y., Kato, M., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Kiso, S., Kanto, T., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C

responding to pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin. *J Viral Hepat* 2009. 16: 586-594.

5) Kurokawa, M., Hiramatsu, N., Oze, T., Mochizuki, K., Yakushijin, T., Kurashige, N., Inoue, Y., Igura, T., Imanaka, K., Yamada, A., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Ito, T., Inui, Y., Hijioka, T., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Kato, M., Kiso, S., Kanto, T., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Effect of interferon alpha-2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis. *Hepatol Res* 2009. 39: 432-438.

2.学会発表

- 1) Kanto T., Itose I, Inoue M, Oze T, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Dynamics of plasmacytoid dendritic cells as a predictor of relapse regardless of virological response in pegylated interferon-a and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
- 2) Kakita N, Kanto T., Itose I, Takebe S, Inoue M, Matsubara T, Higashitani K, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Feasibility of IL-10-producing regulatory Type 1 cells for the monitoring of viable hepatocellular carcinoma through local ablation therapy. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
- 3) Miyazaki M, Kanto T., Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Inoue M, Itose I, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Myeloid dendritic cells as a therapeutic target for immune restoration by HCV NS3 protease inhibitor in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course (Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)
- 4) Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Mita E, Fukuda K, Imai Y, Kato M, Kiso S, Kanto T., Kasahara A, Takehara T, Hayashi N. Prediction of early response to

pegylated interferon and ribavirin in chronic hepatitis C based on amino acid substitutions in the viral core region .

The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course
(Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)

5) Inoue Y, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Mochizuki K, Hagiwara H, Oshita M, Mita E, Fukui H, Inada M, Tamura S, Yoshihara H, Hayashi E, Inoue A, Imai Y, Kato M, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Hayashi N.

Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses.

The Liver Meeting AASLD 60th Annual Meeting and Postgraduate Course
(Boston, MA, USA 10.30-11.3, 2009)

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
Ohkawa K, (林)	Mutations associated with the therapeutic efficacy of adefovir dipivoxil added to lamivudine in patients resistant to lamivudine with type B chronic hepatitis.	J Med Virol	81	798-806	2009
Sasakawa A, (林)	Activated liver dendritic cells generate strong acquired immunity in α -galactosylceramide treatment.	J Hepatol	50	1155-1162	2009
Kurokawa M, (林)	Effect of interferon alpha-2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis.	Hepatol Res	39	432-438	2009
Hiramatsu N, (林)	Ribavirin dose reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with hepatitis C responding to pegylated interferon alpha-2b plus ribavirin.	J Viral Hepat	16	586-594	2009
Oze T, (林)	Pegylated interferon alpha-2b (Peg-IFN alpha-2b) affects early virologic response dose-dependently in patients with chronic hepatitis C genotype 1 during treatment with Peg-IFN alpha-2b plus ribavirin.	J Viral Hepat	16	578-585	2009

Kurashige N, (林)	Factors contributing to antiviral effect of adefovir dipivoxil therapy added to ongoing lamivudine treatment in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B.	J Gastroenterol	44	601-607	2009
Kurashige N, (林)	Lamivudine-to-entecavir switching treatment in type B chronic hepatitis patients without evidence of lamivudine resistance	J Gastroenterol	44	864-870	2009
Itose I, (林)	Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis.	J Viral Hepat	16	844-852	2009
Hikita H, (林)	Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver.	Hepatology	50	1217-1226	2009
Kurashige N, (林)	Two types of drug-resistant hepatitis B viral strains emerging alternatively and their susceptibility to combination therapy with entecavir and adefovir.	Antivir Ther	14	873-877	2009
Kohga K, (林)	Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma.	Cancer Res	69	8050-8057	2009
Hikita H, (林)	BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells.	Hepatology	50	1972-1980	2009

Uemura A, (林)	Natural killer cell is a major producer of interferon that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice.	Cancer Immunol Immunother	59	453-463	2010
Inoue Y, (林)	Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses.	J Viral Hepat			in press
Imai Y, (林)	Reduced risk of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in aged patients with chronic hepatitis C is limited to sustained virological responders.	J Viral Hepat			(in press
Sakamori R, (林)	STAT3 signaling with in hepatocytes is required for anemia of inflammation in vivo.	J Gastroenterol			in press
Yamaguchi S, (林)	EphA2-derived peptide vaccine with amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles elicits an antitumor effect against mouse liver tumor.	Cancer Immunol Immunother			in press
Kohga K, (林)	Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9.	Hepatology			in press
Shimizu S, (林)	The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma.	J Hepatol			in press