

ノム HCV レプリコン細胞で発現が高かった。詳細な検討により、ミトコンドリアのコンプレックス IV の成分であるチトクローム C オキシダーゼ (COX) のミトコンドリア DNA にコードされたサブユニットと Prohibitin の相互作用がコア蛋白によって阻害され、COX 活性の有意な低下をもたらすことが明らかとなった。HCV コア蛋白は Prohibitin を含むミトコンドリア蛋白レベルに影響を与え、ミトコンドリア機能障害、酸化ストレス過剰産生へと至り、肝発癌に寄与していると考えられる。

### (III) Tacrolimus 投与による C 型肝炎肝病態の変化

(1) コア遺伝子導入トランスジェニックマウスに認められた、①肝組織中の脂肪量の増加 (肝脂肪化)、②構成脂肪酸に占める C16:1 (パルミトオレイン酸)、C18:1 (オレイン酸) などの一価不飽和脂肪酸の増加、③インスリン抵抗性増強のいずれもが、FK 投与によって、placebo 投与群の非トランスジェニック兄弟マウスと同様のレベルまで有意に改善した。FK 投与群の非トランスジェニック兄弟マウスでは、血清インスリン値がやや低下していた。

(2) コア遺伝子導入トランスジェニックマウスにおいて認められる感染症内科酸化ストレス増加は FK 投与によって有意に改善した。肝における DNA 障害も改善した。

(3) コア蛋白発現 HepG2 細胞では、FK 投与によって細胞内脂質量、一価不飽和脂肪酸が有意に減少した。これに対して、CyA の投与では減少は認められず、むしろ増加傾向を示した。

(4) コア蛋白発現 HepG2 細胞では、FK 投与によって酸化ストレス産生が有意に減少した。これに対して、CyA の投与では減少は認められず、むしろ増加傾向を示した。

(5) 酸化ストレス産生の機序としてミトコンドリア障害、これによる細胞内への NADH の蓄積が考えられている。FK の投与はコア遺伝子トランスジェニックマウス肝、コア蛋白発現 HepG2 細胞内の NADH/NAD<sup>+</sup>比を有意に改善させた。

(6) FK 投与はコア遺伝子トランスジェニックマウス肝における TNF- $\alpha$ 、SREBP (sterol regulatory element binding protein)-1c、SCD (stearoyl Co-A desaturase)-1 などの原因 (介在) 遺伝子の発現レベルを改善させた。すなわち、HCV コア蛋白の C 型肝炎病態を惹起する作用を FK は打ち消す様に働くことが推定された。

### D. 考察

HCV 感染症における肝発癌の機序については、まだ明らかでない点が多い。HCV コア蛋白は動物モデルにおいて肝癌を発生させることが明らかになっており、ヒト C 型肝炎における肝発癌で重要な役割を果たしていることが示されてきている。この肝発癌の過程において、肝脂肪化が炎症不在下に発生し、肝発癌への関わりが想定されている。

本検討によって、6 か月齢、12 か月齢、16 か月齢において、それぞれ増加あるいは減少するタンパクが経時的に変化している事が示された。これが転写 (mRNA) レベルではなく、タンパクレベルで確認されたことが、今回の研究における重要なポイントである。6 か月齢のコア遺伝子トランスジェニックマウス肝ではアポトーシスに関連するタンパクが有意に低下しており、12 か月齢では呼吸、電子伝達系、抗酸化に関連するタンパクが有意に増加していた。更に、肝発癌期である 16 か月齢においては、抗酸化系、脂質代謝関連酵素などのタンパクが有意に減少していた。これらのプロテオミクスによる検討結果は、これまでにこ

のマウスモデルを用いて検討してきた組織学的、生化学的な表現型とよく合致、あるいはよく説明するものである。本システムを用いる事で HCV 感染が正常肝細胞にどのような変化、特に代謝性の変化をもたらし、肝疾患の進展、肝癌の発生につながって行くのかを明らかにできる可能性があり、新薬の開発においても、本システムは有力な手段となる可能性があるといえる。

次いで、コア蛋白がミトコンドリアに局在し、いくつかのミトコンドリア蛋白の発現に影響を与えていることがわかった。これらの蛋白の発現変化の機序、ならびにこの変化が細胞に与える影響については今後詳細な検討が必要であるが、なかでも、Prohibitin の増加によって、チトクローム C オキシダーゼ (COX) のミトコンドリア DNA にコードされたサブユニットと Prohibitin の相互作用がコア蛋白によって阻害され、COX 活性の有意な低下をもたらすことが明らかとなった。HCV コア蛋白は Prohibitin を含むミトコンドリア蛋白レベルに影響を与え、ミトコンドリア機能障害、酸化ストレス過剰産生へと至り、肝発癌に寄与していると考えられる。

最後に、HCV コア蛋白による肝臓の脂肪化にはミトコンドリア障害が関与していることが強く示唆されている。FK は核カルシニューリンへの作用とともにミトコンドリア機能保護作用をもち、広く臨床への応用が行われつつある。今回の我々のデータから、FK の有するミトコンドリア保護作用を介して、HCV コア蛋白によって誘発される脂質代謝異常、インスリン抵抗性、酸化ストレス過剰産生のいずれもが改善することが示された。さらに、酸化ストレス産生、DNA 損傷発生も著明に改善させたことは重要であり、HCV 排除のできない C 型慢性肝炎患者における病態改善、肝細胞癌発生の抑制の可能性が示唆された。

## E. 結論

C 型肝炎発症初期ではアポトーシスに関連するタンパク質の発現量の抑制がみられたが、中期では、呼吸、電子伝達系及び抗酸化に関与するタンパク質の有意な上昇が確認された。さらに、HCC 発症直前では、抗酸化酵素、脂質代謝関連酵素など多くのタンパク質の発現量に減少傾向がみられた。今回用いた新規プロテオミクスによる C 型肝炎の病態解析は、肝線維化、肝発癌を防ぐ手だてを開発する上で重要な知見をもたらした。今後の検討において極めて有用と考えられた。

コア蛋白を発現する細胞からミトコンドリアを精製し、二次元電気泳動法によりミトコンドリア蛋白発現の変化を解析した。いくつかのミトコンドリア蛋白がコア蛋白によって発現に影響を受けていることが明らかになった。HCV による病原性発現において、コア蛋白によるミトコンドリア機能の修飾が大きな意義を有していることが示唆された。C 型肝炎における病態解明と病変進行の予防に重要な発見と考える。

FK によって HCV 感染症における代謝異常が改善されることが示された。ミトコンドリア保護作用によることが推測された。少量の FK でも同様な効果が得られ、HCV 感染症により引き起こされる肝脂肪化、インスリン抵抗性、酸化ストレス過剰産生の抑制が可能であることが示された。C 型肝炎の病態解明と病変進行の予防に極めて重要な発見といえる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表 (英文論文発表のみ)

1) Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T,

- Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells. **J Med Virol** 2010 in press.
- 2) Okuse C, Yotsuyanagi H, Yamada N, Okamoto M, Ikeda H, Kobayashi M, Fukuda Y, Takahashi H, Nagase Y, Suzuki Y, Matsunaga K, Ishii T, Matsumoto N, Koike K, Suzuki M, and Itoh F. Effect of nucleoside analogue-interferon sequential therapy on patients with acute exacerbation of chronic hepatitis B. **Hepatol Res** 2010 in press.
- 3) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Yamakado M, Koike K, Nagai R. Association between gamma-glutamyl transferase levels and insulin resistance according to alcohol consumption and number of cigarettes smoked. **J Atheroscler Thromb** 2010 in press.
- 4) Kanamori H, Yuhashi K, Ohnishi S, Koike K, Kodama T. RNA dependent RNA polymerase of hepatitis C virus binds to its coding region RNA stem-loop structure, 5BSL3.2, and its negative strand. **J Gen Virol** 2010 Jan 6. [Epub ahead of print]
- 5) Hmwe SS, Aizakia H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T. Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. **Antiviral Res** 2009 Dec 28. [Epub ahead of print]
- 6) Ishizaka N, Hongo M, Matsuzaki G, Furuta K, Saito K, Sakurai R, Sakamoto A, Koike K, Nagai R. Effects of the AT(1) receptor blocker losartan and the calcium channel blocker benidipine on the accumulation of lipids in the kidney of a rat model of metabolic syndrome. **Hypertens Res** 2010 Jan 8. [Epub ahead of print]
- 7) Goto O, Fujishiro M, Kodashima S, Ono S, Niimi K, Hirano K, Yamamichi N, Koike K. A second-look endoscopy after endoscopic submucosal dissection for gastric epithelial neoplasm may be unnecessary: a retrospective analysis of postendoscopic submucosal dissection bleeding. **Gastrointest Endosc** 2009 Nov 16. [Epub ahead of print].
- 8) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Nagai R, Yamakado M. Impact of changes in waist circumference and BMI over one-year period on serum lipid data in Japanese individuals. **J Atheroscler Thromb** 2009;16:764-771.
- 9) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda A, Tani M, Toda E, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Changes in waist circumference and body mass index in relation to changes in serum uric acid in Japanese individuals. **J Rheumatol** 2009 Dec 23. [Epub ahead of print].
- 10) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Yamakado M, Nagai R. Impacts of changes in obesity parameters for the prediction of blood pressure change in Japanese individuals. **Kidney Blood Press Res** 2009;32:421-427.
- 11) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M, PERFECT STUDY GROUP. Prolonged treatment with PEG-IFN a-2b and ribavirin can improve SVR in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan. **Hepatol Res** 2009 Sep 25. [Epub ahead of print].
- 12) Koike K, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K. Lipid metabolism and pathogenesis of liver disease

- in hepatitis C viral infection. **Oncology** 2009 in press.
- 13) Koike K, Moriya K, Matsuura Y. Animal models for hepatitis C and related liver disease. **Hepatology Res** 2010 in press.
- 14) Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K. Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: Analysis using mouse model and cultured cells. **Am J Pathol** 2009;175:1515-1524.
- 15) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. **Hepatology** 2009;50:378-386.
- 16) Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Nishida K, Kato M, Sakai H, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis C in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. **Hepatology Res** 2009;39:657-663.
- 17) Ishizaka Y, Ishizaka N, Tani M, Toda A, Toda EI, Koike K, Nagai R, Yamakado M. Association between changes in obesity parameters and incidence of chronic kidney disease in Japanese individuals. **Kidney Blood Press Res** 2009;32:141-149.
- 18) Murata M, Matsuzaki K, Yoshida K, Sekimoto G, Uemura Y, Sakaida N, Fujisawa J, Seki T, Koike K, Okazaki K. Hepatitis B virus X protein shifts hepatic Smad3-mediated signaling from tumor-suppression to oncogenesis in chronic hepatitis B. **Hepatology** 2009;49:1203-1217.
- 19) Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signal transduction and subcellular localization. **J Biol Chem** 2009;284:3513-3520.
- 20) Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. **Atherosclerosis** 2009;204:619-623.
- 21) Koike K. Steatosis, Liver injury and hepatocarcinogenesis in hepatitis C viral infection. **J Gastroenterol** 2009;44supl:82-88.
- 22) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. **Biomed Chromatogr** 2009;23:480-487.
- 23) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR-alpha is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. **J Clin Invest** 2008;118:683-694.
- 24) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. **Int J Cancer** 2008;122:124-131.
- 25) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J,

- Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of hepatitis B virus infection in patients with human immunodeficiency virus in Japan. **Hepatol Res** 2008;38:310-314.
- 26) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. **Hepatol Res** 2008;38:252-258.
- 27) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular basis for the synergy between alcohol and hepatitis C virus in hepatocarcinogenesis. **J Gastroenterol Hepatol** 2008;23:S87-91.
- 28) Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 2008;48:858-879.
- 29) Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. **Hepatol Res** 2008;38:775-783.
- 30) Okada H, Kitazawa T, Harada S, Itoyama S, Hatakeyama S, Ota Y, Koike K. Combined treatment with oral kanamycin and parenteral antibiotics for a case of persistent bacteremia and intestinal carriage with *Campylobacter coli*. **Intern Med** 2008;47:1363-1366.
- 31) Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA28 $\gamma$  in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007;104:1661-1666.
- 32) Koike K, Tsukada K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S. Prevalence of coinfection with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in Japan. **Hepatol Res** 2007;37:2-5.
- 33) Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Hepatitis C Virus Core Protein Induces Insulin Resistance through a PA28 $\gamma$ -Dependent Pathway. **J Virol** 2007;81:1727-1735.
- 34) Ishizaka N, Saito K, Furuta K, Matsuzaki G, Koike K, Noiri E, Nagai R. Angiotensin II-induced regulation of the expression and localization of iron metabolism-related genes in the rat kidney. **Hypertens Res** 2007;30:195-202.
- 35) Suzuki Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Nagase Y, Takahashi H, Moriya K, Suzuki M, Koike K, Iino S, Itoh F. Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-resistant hepatitis B virus: A case report. **World J Gastroenterol** 2007;13:964-969.
- 36) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda EI, Nagai R, Koike K, Hashimoto H, Yamakado M. Relationship between smoking, white blood cell count and metabolic syndrome in Japanese women. **Diabetes Res Clin Pract** 2007;78:72-76.
- 37) Yotsuyanagi H, Koike K. Mechanisms underlying drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis B and C viruses. **J Gastroenterol** 2007;42:329-335.
- 38) Tsukada K, Kitazawa T, Fukushima A, Okugawa S, Yanagimoto S, Tatsuno K, Koike K, Nagase H, Hirai K, Ota Y. Macrophage tolerance induced by stimulation with Toll-like receptor 7/8 ligands.

- Immunol Lett** 2007;111:51-56.
- 39) Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. **J Gastroenterol Hepatol** 2007;22:S108-111.
- 40) Koike K. Pathogenesis of HCV-associated HCC: dual-pass carcinogenesis through the activation of oxidative stress and intracellular signaling. **Hepatol Res** 2007;37:S38-S43.
- 41) Aono J, Yotsuyanagi H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Suzuki M, Yasuda K, Iino S, Koike K. Amino acid substitutions in S region of hepatitis B virus in the sera from patients with acute hepatitis. **Hepatol Res** 2007;37:731-739.
- 42) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. A novel proteomics method revealed disease-related proteins in the liver of hepatitis C mouse model. **J Proteome Res** 2007;6:2841-2849. (6.9)
- 43) Kitazawa T, Fukushima A, Okugawa S, Yanagimoto S, Tsukada K, Tatsuno K, Koike K, Kimura S, Kishimoto T, Shibasaki Y, Ota Y. Chlamydophilal antigens induce foam cell formation via c-Jun NH2-terminal kinase. **Microbes Infect** 2007;9:1410-1414.
- 44) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Seki G, Nagai R, Yamakado M. Association between obesity and chronic kidney disease in Japanese: differences in gender and hypertensive status? **Hypertens Res** 2007;30:1059-1064.
- 45) Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Koike K, Seki G, Nagai R, Yamakado M. Association between chronic kidney disease and carotid intima-media thickening in individuals with hypertension and impaired glucose metabolism. **Hypertens Res** 2007;30:1035-1041.
- 46) Okuse C, Yotsuyanagi H, Koike K. Hepatitis C as a systemic disease: virus and host immunologic responses underlie hepatic and extrahepatic manifestations. **J Gastroenterol** 2007;42:857-865.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

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）  
（総合）分担研究報告書

B型肝炎ウイルスレセプターの分離・同定とその応用に関する研究  
研究分担者 上田 啓次 大阪大学院医ウイルス学 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の感染受容体の実態を解明し感染系を樹立することで病態の解明、治療法の開発に役立てるべくHBV膜蛋白結合能を指標にHBV感染受容体を分離・同定し、感染系の構築を目指す。

#### A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）はそのウイルスの発見から既に40年余が経過するが、その感染受容体の実態は全く不明である。このことは本ウイルスの感染・増殖機構の解明はもちろんのこと本ウイルス感染がもたらす病態発症の機構の解明やそれに根ざした治療法の開発の大きな障壁となっている。

そこで本計画では以下の方法によりその分離・同定と感染系樹立への応用を試みた。

#### B. 研究方法

1. HBV感染受容体のリガンドとしての可能性の高いpreS1領域をGST-preS1-His6の構築で大腸菌において大量発現、高度精製する、
2. 上記精製タンパクを用い、ヒト肝臓、胎盤などのcDNAファージ発現ライブラリーを結合性を指標にスクリーニングする、
3. 候補因子の全長cDNAを獲得し、哺乳類培養細胞発現させ、受容体としての活性を検定する、
4. 受容体としての活性が確認されたら、培養細胞系、マウス個体レベルでの感染系を樹立する。

#### C. 研究結果

pGEX5にGST-preS1-His6を構築し、大腸菌で発現、Glutathion-SepharoseとNi-NTAアガロースを用いて二段階精製を行い、純度90%以上とした。本評品を用いて150万200万個のヒト胎盤cDNAライブラリーをスクリーニングし、膜系遺伝子産物をコードする4つの候補因子cDNA（HBV-R1、-R2、-R3及びR4）を得た。さらにそれらの全長cDNAを獲得し、哺乳類培養細胞発現系に構築した。現在、肝癌由来の培養肝がん細胞（HepG2やHuh7）を用いてトランスフェクションによる発現実験と感染性について検討中である。

#### D. 考察

HBV感染受容体のHBV側リガンドはpreS1にあるとされ、それに基づいて研究を進めたが、今後はその他の領域も考慮する必要があるかも知れない。

#### E. 結論

HBVのpreS1領域に対する*in vitro*結合性を指標にして幾つかの候補結合遺伝子を同定した。本遺伝子産物が真のHBV受容体であるかどうかをまずは培養細胞系を用いて慎重に検討していく

F. 健康危険情報 特に無し

G. 研究発表

1.論文発表

Ohsaki, E., Suzuki, T., Karayama, M., Ueda, K. Accumulation of LANA at Nuclear Matrix fraction is important for Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes virus Replication in Latency. Virus

Research 2009;139:74-84

2.学会発表

上田啓次、大崎恵理子、鈴木 亨、柄山正人. B型肝炎ウイルス (HBV) pseudotype の作製の試みと感染系樹立への応用. 第 56 回日本ウイルス学会、10 月、岡山.

上田啓次、大崎恵理子、鈴木 亨.

B型肝炎ウイルス (HBV) pseudotype の作製の試みと感染系樹立への応用. 第 57 回日本ウイルス学会、10 月、東京. など

H. 知的財産権の出願・登録状況

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)

2.実用新案登録 該当無し

3.その他 特に無し



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

慢性 C 型肝炎の病態進展因子および肝発癌関連因子の解明

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:本研究では ALT 持続正常および ALT 異常の慢性 C 型肝炎血清プロテオーム解析を用いて慢性 C 型肝炎の病態進展および肝発癌の早期診断や治療効果判定に有用な血清マーカーの探索を行うとともに、HCV 高感染地区の HCV 抗体陽性者を対象として、肝マクロファージにおいて発現し、炎症のフィードバック調節因子として作用する新規分子オステオアクチビンの血清濃度測定および SNP 解析を行った。血清プロテオーム解析では ALT 持続正常の慢性 C 型肝炎で有意に高値を示す蛋白ピークを見出し、これらが C4 由来であることを証明した。一方、肝マクロファージで発現するオステオアクチビンの血清濃度は HCV 既感染者に比して、HCV 持続感染者で有意に上昇しており、特に ALT 上昇例において有意に上昇していた。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) について解析したところ、HCV-RNA の有無との関連性は認められなかったが、これらの SNP は  $\gamma$ 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。以上の結果から、慢性 C 型肝炎の病態進展および肝発癌において補体系の活性化が関与していること、さらに補体系および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 HCV 感染者の病態進展および肝発癌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

坪内博仁 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 教授  
(平成 19 年度 分担研究者)  
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

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス感染では高率（70%）に慢性化（キャリア化）し、HCV 持続感染者ではその 10～20%が肝硬変、肝発癌へと進展する。しかし、HCV キャリア化や HCV 持続感染者における病態進展のメカニズムは未だ明らかにされていない。本研究では、血清プロテオーム解析を用いて慢性 C 型肝炎の病態進展および肝発癌の早期診断や治療効果判定に有用な血清マーカーの探索を行うとともに、HCV 高感染地区の HCV 抗体陽性者を対象として、肝マクロファージにおいて発現し炎症のフィードバック調節因子として作用する新規分子オステオアクチビンの血清濃度測定および SNP 解析を行った。

B. 研究方法

1. 慢性 C 型肝炎の血清プロテオーム解析

ALT 持続正常の慢性 C 型肝炎 19 人、ALT 異常の慢性 C 型肝炎 20 人、NAFLD 20 人、健常者 24 人の血清から、MALDI 型質量分析計 Autoflex TOF-TOF を用いて蛋白質ピークを検出し、MS/MS イオンサーチ法で蛋白を同定した。

## 2. HCV 抗体陽性者におけるオステオアクチビンの血清濃度と 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 人を対象としてオステオアクチビン遺伝子の SNP 解析を行った。

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

3) オステオアクチビン遺伝子 5' 上流領域の SNP の解析：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 (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。

## 3. 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ビンの影響

マクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞にオステオアクチビンの 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. 慢性 C 型肝炎の血清プロテオーム解析

HCV 関連肝癌患者血清中で高値となる二つのピーク値 (約 8100 m/z および約 8900 m/z) のいずれもが complement component 3a (C3a) 由来であることを明らかにした。約 8100 m/z のピーク値は肝癌の早期診断や治療効果予測に有用で、約 8900 m/z のピーク値は HCV 感染に関連して上昇しているが肝癌との関連性は強くないと考えられた。一方、健常者と比較して無症候性キャリアで優位に高い値を示す二つの蛋白ピークを見出し、いずれもが C4a 由来であることを明らかにした。

### 2. HCV 抗体陽性者におけるオステオアクチビンの

### 血清濃度と 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 ( $p=0.028$ )、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 ( $p<0001$ )、 $\gamma$  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 ( $p<0.001$ )、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、 $\gamma$  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 ( $p=0.029$ )。

### 3. 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ビンの影響

オステオアクチビンを発現する RAW264.3 細胞にオステオアクチビンの siRNA を導入して、その発現を 90% 抑制すると、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP1 の発現が増強した。

## D. 考 察

本研究では HCV-RNA 陽性者 (持続感染者) および HCV-RNA 陰性者 (既感染者) を含んだ HCV 高感染地区の HCV 抗体陽性者を対象として、血清プロテオーム解析を行い、無症候性の HCV 持続感染者 (キャリア) で有意に高値を示す蛋白ピークが C4

由来であることを見出し、実際に無症候性 HCV キャリアでは血清 C4 濃度が有意に上昇していた。一方、同様のプロテオーム解析から肝癌の早期診断や治療効果予測に有用なマーカーとして C3a を同定しており、慢性 C 型肝炎の病態進展のみならず、持続する炎症を背景に発癌する肝細胞癌の病態を考える上でも興味深い結果と考えられた。

一方、オステオアクチピン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として単離されたが、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、さらに、抗原提示細胞で発現されるオステオアクチピ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が報告されている。そこで、HCV 抗体陽性者（持続感染者および既感染者）における血清オステオアクチピン濃度を測定したところ、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、フィードバック調節因子である誘導されていることが考えられた。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、代償的に血清オステオアクチピン濃度が上昇していることが考えられた。一方、オステオアクチピン遺伝子 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ピ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 がオステオアクチピンの発現調節にどのような影響を及ぼし、オステオアクチピ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 抗体陽性者を対象とした血清プロテオーム解析から、慢性 C 型肝炎の病態進展および肝発癌において補体系が活性化されることを見出し、病態進展および肝癌の早期診断の有用な血清マーカーとなりうることを示した。一方、肝マクロファージで発現するオステオアクチピ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) の解析から、オステオアクチピンが 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。肝臓の在住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。オステオアクチピ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た。

## 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.
  8. Takahama Y, Uto H, Kanmura S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Stuver S, Okayama A, Tsubouchi H. Association of a genetic polymorphism in ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 with hepatitis C virus infection and hepatitis C virus core antigen levels in subjects in a hyperendemic area of Japan. *J Gastroenterology* 2008; 43: 942-50.
  9. Kodama M, Uto H, Numata M, Hori T, Murayama t, Sasaki F, Tsubouchi N, Ido A, Shimoda K, Tsubouchi H. Endoscopic characterization of the small bowels in patients with portal hypertension evaluated by double balloon endoscopy. *J Gastroenterol* 2008; 43: 589-96.
  10. Uto H, Kurogi J, Takahama Y, Kusumoto K, Hayashi K, Ido A, Kohara M, Stuver SO, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Tsubouchi H. Alanine aminotransferase flare-up in hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels in a hyperendemic area of Japan. *J Gastroenterol* 2007; 42: 673-80.
  11. Abe H, Uto H, Takami Y, Takahama Y, Hasuike S, Kodama M, Nagata K, Moriuchi A, Numata M, Ido A, Tsubouchi H. Transgenic expression of osteoactivin in the liver attenuates hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 356: 610-5.
  12. Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, Ishida Y, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Ido A, Stuver SO, Tsubouchi H. Early diagnosis potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology* 2007; 45: 948-56.
- 2.学会発表
1. 重信秀峰、宇都浩文、他：HCV 抗体陽性者のインスリン抵抗性に関連する因子の検討。第104回日本内科学会総会・講演会（2007年4月）大阪
  2. 西田知夏、森由紀子、他：鹿児島県の血液透析患者におけるC型肝炎調査報告。第104回日本内科学会総会・講演会（2007年4月）大阪
  3. 小原一憲、宇都浩文、他：C型肝炎ウイルス感染者におけるENPPI遺伝子K121Q塩基多型

- の意義. 第 93 回日本消化器病学会総会 (2007 年 4 月) 青森
4. 熊谷公太郎、宇都浩文、他: ALT 持続正常者におけるチオレドキシニン濃度. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月) 東京
  5. 重信秀峰、小原一憲、他: HCV 感染透析患者における ALT 値と予後. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月) 東京
  6. 安倍弘生、蓮池悟、他: コリン欠乏アミノ酸置換食飼育ラットの肝線維化に対してオステオアクチビン強発現が及ぼす影響の解析. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月) 東京
  7. 柴藤俊彦、迫勝巳、他: 肝細胞癌合併非アルコール性脂肪性肝炎および C 型慢性肝炎患者の肝組織における P62 発現の比較検討. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月) 東京
  8. 今村也寸志、桶谷眞、坪内博仁: 最近の生活習慣と肝機能異常. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月) 東京
  9. 楠元寿典、蓮池悟、他: 脂肪肝を合併した C 型慢性肝炎の経過-HCV 高浸淫地区住民 12 年間の経過から-. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月) 東京
  10. 長谷川将、重信秀峰、他: 低体重は肝細胞癌の予後を悪くする?-累積生存率からみた BMI と HCC の予後との関連. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月) 東京
  11. 王宇清、堀内正久、他: 低蛋白質・高脂肪食および低蛋白質・高フルクトース食によるマウス脂肪肝モデルにおける肝障害感受性の検討. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月) 東京
  12. 永田賢治、楠元寿典、他: 難治性 C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN+リバビリン併用療法の有用性の検討 特に高齢者における治療効果の検討. 第 43 回日本肝臓学会総会 (2007 年 5 月) 東京
  13. 熊谷公太郎、宇都浩文、他: HCV 高浸淫地区住民検診の経過中に HCV-RNA が自然消失した 4 例. 第 89 回日本消化器病学会九州支部例会 (2007 年 6 月) 福岡
  14. 今村也寸志、平峯靖也、他: アルコール摂取量と脂肪肝発生の関連について. 第 89 回日本消化器病学会九州支部例会 (2007 年 6 月) 福岡
  15. 西田知夏、屋万栄、他: 鹿児島県血液透析患者における C 型肝炎の現況. 第 52 回日本透析医学会学術集会・総会 (2007 年 6 月) 大阪
  16. 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ビン遺伝子の SNP 解析. 第 46 回日本消化器免疫学会総会 (2009 年 7 月) 松山
  17. 藤田浩、桶谷眞、坪内博仁: 消化器疾患入院患者における生活習慣病の現状. 第 49 回日本消化器病学会大会 (2007 年 10 月) 神戸
  18. 宇都浩文、岡上武、坪内博仁: プロテオミクスを用いた NASH の新しい診断マーカー探索の試み. 第 11 回肝臓学会大会 (2007 年 10 月) 神戸
  19. 小森園康二、迫勝巳、他: B 型慢性肝炎患者に対する核酸アナログ製剤の効果. 第 90 回日本消化器病学会九州支部例会・第 84 回日本消化器内視鏡学会九州支部例会 (2007 年 11 月) 長崎
  20. 熊谷公太郎、宇都浩文、他: HCV 高浸淫地区 HCV 持続感染者の HCV コア抗原変動に關与する因子の検討. 第 90 回日本消化器病学会九州支部例会・第 84 回日本消化器内視鏡学会九州支部例会 (2007 年 11 月) 長崎
  21. 長谷川将、熊谷公太郎、他: 当科における B 型肝炎を背景とする肝細胞癌の実態と今後の対策. 第 90 回日本消化器病学会九州支部例会・第 84 回日本消化器内視鏡学会九州支部例会 (2007 年 11 月) 長崎
  22. 佐々木文郷、宇都浩文、他: 肝細胞癌のバイオマーカーとして同定した血清中 Complement Component 3a(C3a)fragment の臨床的意義. 第 37 回日本肝臓学会西部会 (2007 年 12 月)

長崎

23. 熊谷公太郎、宇都浩文、他：肝細胞癌を発症した75歳以上高齢者の臨床的意義. 第37回日本肝臓学会西部会（2007年12月）長崎
24. 桶谷真、桶谷薫、他：人間ドック受診者における性別からみた脂肪肝の背景. 第37回日本肝臓学会西部会（2007年12月）長崎
25. Wang Y, Oketani M, et al : Differential acetaminophen-induced hepatotoxicity between two types of dietary steatosis of the liver in mice. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease(AASLD) (2007.11) Boston
26. Kodama M, Uto H, et al : Double balloon endoscopic characterization in the small bowel of patients with portal hypertensive enteropathy. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease(AASLD) (2007.11) Boston
27. Uto H, Sato Y, et al : Proteomic analysis of serum biomarkers in patients with nonalcoholic steatohepatitis using SEDI-TOF/MS or MALDI-TOF/MS. The 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Live Disease(AASLD) (2007.11) Boston

#### 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 (2002年)</i> | <i>HCV carrier (n=339)</i> | <i>HCV-RNA negative (n=102)</i> | <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 <sup>4</sup> )        | 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）  
（総合）分担研究報告書

ウイルス性肝炎・肝がんにおける免疫制御に関する研究  
研究分担者 中本 安成 金沢大学附属病院消化器内科 講師

研究要旨： これまで我々が確立した世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースを用いて、がん組織に特異的な遺伝子がコードするタンパクの免疫原性を評価した。肝がん組織において発現が亢進しているがん抗原 AFP, hTERT, MRP3 に注目して、Tリンパ球の反応性を解析するとともに臨床病態との関連を検討した。我が国に多い HLA-A24 モチーフ拘束性の抗原エピトープが同定されるとともに、肝がん局所治療に伴ってこれらに対する CD8 陽性 Tリンパ球の反応性が亢進した。さらに、肝がん局所治療に伴って抗原ペプチドに対する反応性が増強することを観察した。しかし、治療後の経過においては、誘導された免疫反応が3ヵ月以内に減弱することが明らかとなり、肝がんの再発抑制への関与は見出せなかった。本研究の結果より、肝がんの特異的な新規の Tリンパ球標的抗原エピトープが同定され、局所治療に反応して抗腫瘍免疫が惹起されることが示された。

#### A. 研究目的

独自に確立した大規模な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した。研究期間中に同定された肝がんの腫瘍標的抗原に由来する HLA-A24 拘束性 Tリンパ球エピトープに関する臨床的意義を治療経過と合わせて検討した。

#### B. 研究方法

肝がん患者のがん組織に特異的な遺伝子 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。各遺伝子がコードするタンパクのアミノ酸配列から得られた HLA-A24 拘束性ペプチドを用いて、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 の割合を定量した。

#### (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) 肝がんの腫瘍標的抗原として AFP, hTERT, MRP3 タンパクが検出され、我が国に多い HLA-A24 モチーフ拘束性の抗原エピトープが同定された。
- 2) 肝がん局所治療〔肝動脈塞栓療法 TAE や樹状細胞 (DC) 免疫療法〕に伴って、腫瘍抗原ペプチドに対する CTL 反応が高率に誘導された。

3) 治療後経過の観察においては、誘導された免疫反応が3ヵ月以内に減弱することが明らかとなり、肝がんの再発抑制への関与は見出せなかった。

#### D. 考察

これまで欧米を中心に多くの腫瘍標的抗原ペプチドの同定が行われてきたが、HLA-A2 分子に拘束性のものが大部分であった。しかし、日本人の大多数が HLA-A24 分子を保有しており、我が国に適した抗原ペプチドをスクリーニングするには HLA-A24 拘束性エピトープの検討が必須と考えられていた。そこで、本研究ではがん組織での発現が亢進しているタンパクの中で、これまでに免疫原性が報告されているタンパクとして AFP, hTERT, MRP3 を検出した。

これらの標的抗原の臨床的意義に関する検討として、肝がん局所治療における経時的な観察を行い、がん再発に関する抗腫瘍効果を評価した。治療後に抗腫瘍免疫が亢進することが観察されたが、免疫反応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。今後、発現遺伝子データベースに基づいて新規のがん抗原をスクリーニングすることによって、より高い抗腫瘍免疫の賦活効果をもつエピトープを同定することが必要と考えられた。

#### E. 結論

肝がんの特異的な新規の Tリンパ球標的抗原エピトープ (AFP, hTERT, MRP3) を同定した。がん局所治療に反応して抗腫瘍免疫は惹起されたが、肝がんの再発抑制への臨床効果は今後の課題と考えられた。

#### 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.
4. Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y and Kaneko S: Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res.* 68: 10267-10279, 2008
5. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Mukaida N and Kaneko S: Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation. *Cancer Sci.* 99: 2075-2082, 2008
6. Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Kakinoki K, Li YY, Wu Y, Matsushima K, Kaneko S and Mukaida N: Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice. *J. Leukoc. Biol.* 84: 1001-1010, 2008
7. Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y and Kaneko S: Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 49: 946-954, 2008
8. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Tsuji H, Sakai Y, Kitahara M, Arai K, Yamashita T, Yokoyama K, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O and Kaneko S: Combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with intratumoral dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma: clinical safety. *Clin. Exp. Immunol.* 251: 36-42, 2007
9. Tachibana Y, Nakamoto Y, Mukaida N and Kaneko S: Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of chronic hepatitis C. *Cancer Lett.* 251: 36-42, 2007
10. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Marukawa Y, Kitahara M, Mukaida N and Kaneko S: Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *J. Immunol.* 178: 574-583, 2007
11. Nakamoto Y and Kaneko S: Enhanced antitumor effects of suicide gene therapy combined with adenovirally delivered monocyte chemoattractant protein-1. *Recent Dev. in Gene Ther.* 2007
12. Kaji K, Nakamoto Y and Kaneko S: Analysis of hepatitis C virus-specific CD8+ T-cells with HLA-A\*24 tetramers during phlebotomy and interferon therapy for chronic hepatitis C. *Oncol. Rep.* 18: 993-998, 2007
13. Komura T, Mizukoshi E, Kita Y, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Ohta T, Shimizu K, Nakamoto Y, Honda M, Takamura T and Kaneko S: Impact of diabetes on recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical treatment in patients with viral hepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 102: 1939-1946, 2007
14. Oishi N, Shilagardi K, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S and Murakami S: Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells. *Cancer Sci.* 98:1540-1548, 2007
15. Kita Y, Mizukoshi E, Takamura T, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Impact of diabetes mellitus on prognosis of patients infected with hepatitis C virus. *Metabolism* 56: 1682-1688, 2007

## 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
3. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: #125; Prolonged recurrence-free survival following combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; 第59回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California): Hepatology 48 (4, Suppl.) 361A; 一般 (parallel); oral: Nov. 2, 2008
4. Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S: #82; Cellular immune responses to multidrug resistance-associated protein 3 in the patients with hepatocellular carcinoma.; 第 25 回 Internal Association for the Study of the Liver (IASL) Biennial Meeting (San Francisco, California): Hepatology 48 (4, Suppl.) 343A; 一般 (parallel); oral: Nov. 2, 2008
5. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Tsuji H, Sakai Y, Kitahara M, Arai K, Yamashita T, Yokoyama K, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O and Kaneko S: O-367; Transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma.; 第17回Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Conference (Kyoto); Hepatology International 1(1) 65; 一般(parallel); oral: Mar. 30, 2007
6. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Sakai Y, Kakinoki K, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O and Kaneko S: #23; Clinical safety and bioactivity of OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma following transcatheter hepatic arterial embolization.; 第58回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 46 (4, Suppl.) 243A; 一般 (parallel); oral: Nov. 4, 2007

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし

厚生労働科学研究費補助金（平成 19-21 年度肝炎等克服緊急対策研究事業）  
分担研究報告書

消化器癌に対するサイトカインによる免疫療法

研究分担者 広石 和正 昭和大学医学部消化器内科 准教授

研究要旨

消化器癌患者に対する免疫療法は強い抗腫瘍免疫を誘導する必要がある。本研究ではサイトカインによる免疫治療を検討した。マウス消化器癌細胞株と樹状細胞、CpG とを混合培養したところ、樹状細胞の成熟が確認された。また、消化器癌細胞株を皮下接種しあらかじめ皮下腫瘍を形成したマウスに対し、樹状細胞と IFN- $\alpha$  遺伝子導入癌細胞、CpG を用いて治療を行ったところ、野生株腫瘍に対する抗腫瘍効果が認められた。腫瘍に縮小には IL-12 が関与しており、生体内の NK 細胞、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞が誘導され抗腫瘍効果を示していた。また、予め形成された皮下腫瘍に対し、IL-4 と CpG とを併用し接種すると腫瘍の増大が抑制された。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、樹状細胞と IFN- $\alpha$ 、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。さらに、多彩な免疫活性作用を有する IL-4 と CpG とを併用して、形成された腫瘍に対する治療を行った。

B. 研究方法

消化器癌細胞株として、マウス大腸癌細胞株 MC38 を用いた。樹状細胞と、IFN- $\alpha$  遺伝子を導入した MC38 細胞 (MC38-IFN $\alpha$ )、CpG とを混合培養し、樹状細胞のフェノタイプ、サイトカイン産生やアロリンパ球刺激能を測定した。*In vivo* の治療モデルとして、野生株腫瘍を皮下接種して腫瘍を形成したマウスに対し、樹状細胞と MC38-IFN $\alpha$ 、CpG を投与した後、野生株腫瘍の大きさを測定した。同モデルで野生株腫瘍内に浸潤している免疫細胞を、免疫組織染色で観察した。また、抗体で生体内の免疫細胞を除去したマウスに対し、樹状細胞と MC38-IFN $\alpha$ 、CpG を投与した後に、野生株腫瘍を接種し、皮下腫瘍の形成を観察

した。さらに、樹状細胞と MC38-IFN $\alpha$ 、CpG で免疫したマウスの脾臓から、腫瘍特異的 CTL の誘導を試みた。

また、予め野生株腫瘍を形成させたマウスに対し、IL-4 遺伝子導入 MC38 細胞 (MC38-IL4) と CpG とを接種し、野生株腫瘍の大きさを観察した。

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

また、IL-4 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。

#### D. 考察

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

樹状細胞と IFN- $\alpha$ 遺伝子導入細胞、CpG の併用療法や 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) Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis. Sakaki M, Hiroishi K, Baba T, Ito, T, Hirayama Y, Saito K, Tonoike T, Kushima M, Imawari M. *Hepatol Res* 38 (4): 354-361, 2008.
- 2) Immune Responses in HCV Infection and Mechanisms of HCV Persistence. Hiroishi K, Ito T, Imawari M. *J Gastroenterol Hepatol* 23 (10): 1473-1482, 2008.
- 3) Dendritic cells stimulated with CpG oligodeoxynucleotides and IFN- $\alpha$ -expressing tumor cells effectively reduce outgrowth of established tumors *in vivo*. Hiraide A, Hiroishi K, Eguchi J, Ishii S, Doi H, Imawari M. *Cancer Sci* 99 (8): 1663-1669, 2008.
- 4) Infection of B cells with hepatitis C virus for the development of lymphoproliferative disorders in patients with chronic hepatitis C.