

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.

5) 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) Efficacy and mechanism of dendritic cell-based immunotherapy with CpG and IFN-alpha-expressing tumor cells for murine colorectal cancer. Doi H, Hiroishi K, Hiraide A, Eguchi J, Ishii S, Matsumura T, Sakaki M, Imawari M. 2008 American Association of Cancer Research 99th Annual Meeting.

2) 樹状細胞とインターフェロン α 、CpG併用療法による抗腫瘍効果の作用機序. 広石和正、平出綾子、江口潤一、坂木理、土肥弘義、井廻道夫. 第94回日本消化器病学会総会

3) 肝細胞癌患者の治療前後における各種腫瘍抗原に対する細胞性免疫応答. 江口潤一、広石和正、井廻道夫. 第44回日本肝臓学会総会

4) C型急性肝炎におけるHCV特異的CTL応答の解析. 土肥弘義、広石和正、

井廻道夫. 第12回日本肝臓学会大会. シンポジウム「肝炎ウイルス感染と免疫」

5) Magnitude of HCV-specific CD8+ T cell responses and severity of hepatitis do not determine the outcome in acute HCV infection. Doi H, Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Imawari M. The Liver Meeting 2008, The 58th Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases

6) 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

7) 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

8) 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.

9) 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）
（総合）分担研究報告書

肝癌細胞における可溶性 MICA 分泌の分子機序

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：肝癌では MHC Class I-related chain A (MICA) の高発現がみられる。NK 細胞の NKG2D レセプターは MICA により刺激され、NK 細胞を活性化する。肝癌が NK 細胞の標的になるためにはこの MICA-NKG2D 経路が重要である。MICA の肝癌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、肝癌に対する NK 細胞の認識機構を阻害する。従ってこれを媒介する MICA の shedding の機構について明らかとなれば、新たな治療法が期待できる。本研究では、肝癌患者における可溶性 MICA の発現の意義と、肝癌細胞における MICA 分子の切断機構のメカニズムの解析、さらに化学療法剤による肝癌細胞の MICA 発現の制御を検討することを目的とした。可溶性 MICA は慢性肝炎、肝硬変、肝癌と肝疾患の進展に伴い高値になり、特に肝癌患者においては、可溶性 MICA は肝癌の病期の進展でさらに上昇することを明らかにした。また TACE 治療により血清 MICA は有意に低下し、NK 細胞上の活性化レセプターである NKG2D 発現も有意に上昇した。以上の結果より、TACE により血中の MICA 分泌が制御され、NK 細胞上の NKG2D の発現をダイナミックに調節していることが示唆された。次に細胞膜上での MICA の切断については、肝癌細胞を用いた a disintegrin and metalloproteinases (ADAM) family のノックダウン実験により、ADAM10 および ADAM9 が関与していることを明らかにした。肝癌に対する TACE 治療で汎用される epirubicin が ADAM10 の発現を転写レベルで低下させ、これにより MICA の分泌を阻害することを明らかにした。また新たな分子標的治療薬である Sorafenib は肝癌細胞の ADAM9 の発現を抑制することで MICA の分泌を阻害し、結果的に肝癌細胞の NK 細胞に対する感受性を増強させることを明らかにした。以上の結果より肝癌における MICA 切断機構とその制御が明らかとなり、新たな治療戦略の確立につながると考えられた。

- A. 研究目的
Natural killer (NK) 細胞の機能は多様な
抑制性レセプターと活性化レセプターからの
シグナルのバランスにより規定されてい

る。活性化レセプターの中で NKG2D (natural killer group 2 D) は最も高頻度に発現するレセプターであり、我々は肝癌細胞に対する反応性を規定するレセプターであることを明らかにした。NKG2D のリガンド MHC class I-related chain molecules (MIC) A は消化管上皮細胞や一部の胸腺細胞を除いては正常細胞には発現しておらず、ストレスを受けた細胞やトランスフォームした上皮細胞でのみ発現が誘導される。肝癌においても高頻度に MICA の発現がみられることが我々の研究により明らかになっている。

近年、MICA は酵素的な切断をうけて培養液中に分泌されること、また、ある種の癌患者の血清中に検出されることが報告されている。我々は可溶型 MICA が肝硬変患者や肝癌患者の血清中に検出されることを報告した。本研究では肝疾患患者における可溶型 MICA の臨床的な意義するとともに、肝癌における MICA 切断機構を明らかにすることで新たな治療戦略を構築することを目的として研究を遂行した。

B. 研究方法

TACE 治療を行った 38 名の肝癌患者を前向きに登録し、治療前および治療後 2 週間目に採血を行った。患者背景を一致させた対照群 21 名について 2 週間間隔で採血を行った。可溶型 MICA は ELISA 法により測定した。NK 細胞上の NKG2D の発現は FACS にて解析した。さらに可溶型 MICA を健常者の NK 細胞に添加し、NKG2D 発現および細胞傷害活性に与える影響を解析した。

次に肝癌細胞株において 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。培養上清中の可溶型 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。TACE 治療で汎用される epirubicin や Multi-kinase inhibitor である Sorafenib を肝癌細胞株に添加し、ADAM10 および 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

可溶型 MICA は TACE 治療介入により有意に低下したが、対照群では変化を認めなかった。NK 細胞上の NKG2D の発現は TACE 治療介入により有意に上昇した。対照群では有意な変化は認められなかった。MICA の変化と NKG2D 発現の変化をプロットすると、両者の間には負の相関が認められた。

健常者の NK 細胞の NKG2D 発現は可溶型 MICA の添加により減弱した。HepG2 肝癌細胞に対する NK 細胞の細胞傷害活性は MICA-NKG2D 経路に依存していた。可溶型 MICA を添加した NK 細胞は HepG2 肝癌細胞に対する細胞傷害活性が低下した。

HepG2、PLC/PRF/5 細胞株において ADAM10 をノックダウンすると培養上清中の可溶型 MICA 濃度が低下し、膜結合型

MICA の発現が増強した。この際、MICA mRNA の発現レベルに変化はみられなかった。培養上清中あるいは細胞内の Myc-MICA は糖鎖修飾を受けており、N-glycanase 処理により前者は SDS-PAGE 上 36 kDa、後者は 43 kDa であり、翻訳後修飾を受けていることが示された。HepG2、PLC/PRF/5 細胞株に non-toxic dose の epirubicin を添加すると ADAM10 の発現が mRNA および蛋白レベルで低下し、MICA shedding が低下した。肝癌細胞株に ADAM10 siRNA を導入し epirubicin 処理をすると、ADAM10 欠損細胞では epirubicin による MICA shedding の低下が消失した。

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

肝癌に対する治療介入は血清中の可溶性 MICA のレベルを低下させ、それに伴い免疫細胞に発現する NKG2D の発現は改善した。肝癌に対する治療介入は NKG2D に基づく免疫環境を改善する可能性があると考えられた。

肝癌細胞における MICA shedding には ADAM10 が関与していた。Epirubicin は肝癌細胞における ADAM10 の発現を低下させ、これにより MICA shedding を阻害した。肝癌に対する TACE 治療が血中可溶性 MICA を低下させ、NK 細胞の NKG2D 発現を改善することの一因として epirubicin による ADAM10 低下作用が介在することが示唆された。ADAM10 は肝癌の免疫病態を改善する治療標的となる可能性があることが示唆された。

また肝癌細胞における MICA shedding には ADAM9 も関与していた。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 multikinase inhibitor の分子標的薬であるが、新たに Sorafenib の免疫修飾作用が明らかとなった。本研究結果は ADAM9 を標的とした肝癌の新たな免疫化学療法確立が期待される。

本研究結果、肝癌における MICA の切断には ADAM9 および ADAM10 が関与しており、それぞれを標的とした薬剤による

ADAM ファミリーの制御により、肝先天免疫を標的とした新たな肝癌免疫治療の確立が期待される。

E. 研究発表

論文発表

1. Takehara T, Uemura A, Tatsumi T, Suzuki T, Kimura R, Shiotani A, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Natural killer cell-mediated ablation of metastatic liver tumors by hydrodynamic injection of IFN α gene to mice. *Int J Cancer* 120: 1252-1260, 2007.
2. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Yamaguchi S, Sakamori R, Hiramatsu N, Kanto T, Ohkawa K, Hayashi N. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4⁺ CD25⁺ T cells with PD-1-dependent regulatory activities. *Immunology* 120: 73-82, 2007.
3. Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Sakamori R, Ohkawa K, Kohga K, Uemura A, Hayashi N. Intrahepatic delivery of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor. *Hepatology* 45: 22-30, 2007.
4. Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Miyagi T, Jinushi M, Sakamori R, Kohga K, Uemura A, Ohkawa K, Storkus WJ, Hayashi N. Injection of IL-12 gene-transduced dendritic cells into mouse liver tumor lesions activates both innate and acquired immunity. *Gene Ther* 14: 863-871, 2007.
5. Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sakamori R, Uemura A, Mizushima T, Ohkawa K, Storkus WJ, Hayashi N. Immunotherapy of murine colon cancer using receptor tyrosine kinase EphA2-derived peptide-pulsed dendritic cell vaccines. *Cancer* 110: 1469-1477, 2007.
6. Sakamori R, Takehara T, Ohnishi C, Tatsumi T, Ohkawa K, Takeda K, Akira S, Hayashi N. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46: 1564-1573, 2007.
7. Toyama T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Oze T, Nakanishi F, Mochizuki K, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. A New Prognostic System for Hepatocellular Carcinoma Including Recurrent Cases: A Study of 861 Patients in a Single Institution. *J Clin Gastroenterol* 42: 317-322, 2008
8. Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Hikita H, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Ohkawa K, Hayashi N. Dendritic cell-based vaccines suppress metastatic liver tumor via activation of local innate and acquired immunity. *Cancer Immunol Immunother* 57: 1861-1869, 2008.

9. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Kasugai T, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Serum levels of soluble MHC class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and the changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 99 1643-1649, 2008
 10. Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Yamamoto M, Fujita Y, Miyagi T, Ohkawa K, Hayashi N. Decreased expressions of CD1d molecule on liver dendritic cells in subcutaneous tumor bearing mice. *J Hepatol* 49:779-786, 2008 .
 11. 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. *J Hepatol* 50: 1155-1162, 2009.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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 Res* 69: 8050-8057, 2009.
 15. 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.
 16. 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、治療後の再発などには、HCVや肝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（Treg）は免疫抑制機能を持つ細胞群である。本研究班では、1）肝疾患の病態におけるTregサブセットの意義、2）HCVまたは癌によるTregの誘導機序と責任分子を明らかにし、Tregの制御方法を開発することを目標とした。その結果、1）HCV感染者では、Natural Treg（N-Treg）頻度が増加しており、それは長期ALT正常者群で顕著であった。慢性肝炎から肝硬変、肝癌と病期が進展するにつれてN-Treg、IL-10産生性Treg（Tr1）ともに頻度が増加した。肝癌に対するRFA治療によってTreg頻度は減少し、再発例では再増加した。その変化はN-TregよりもTr1で顕著であった。2）Treg誘導には、肝癌と樹状細胞の細胞間接着とIL-10、TGF- β が必須であった。以上より、C型慢性肝疾患における肝炎の緩和、肝発癌、再発にTregが関与しており、Treg誘導因子の制御によって、肝癌患者の免疫環境を改善できる可能性が示唆された。

A.研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は、持続感染が成立すると自然に排除される可能性は極めて低く、慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと進展する。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型肝炎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型肝炎患者を対象として、病期進展、肝癌に対する治療効果や再発におけるT-reg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型肝炎患者（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CD4⁺T細胞反応に対する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

慢性C型肝炎患者において、長期間肝機能正常を維持するPNALT患者と肝障害を伴う慢性肝炎患者で比較すると、Natural T-reg頻度は両群に差を認めなかったが、T-reg機能誘導因子（FOXP3、CTLA-4）の発現、CD4⁺T細胞抑制機能はPNALT群で高値であった。HCV感染者におけるNatural T-reg、Tr1の頻度は、慢性肝炎、肝硬変、肝癌と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は共に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。治療再発過程での肝癌との関連性も、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- β 1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型肝炎患者において、肝発癌、肝癌の進展、肝癌治療効果や再発とT-reg頻度が相関するこ

とが明らかになった。T-reg は癌細胞に対するNK細胞、細胞障害性T細胞(CTL)やTh1細胞の機能を抑制することが知られており、T-regが肝癌に対するEffectorの機能を抑制することで、癌の発症・進展に関与していると考えられる。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T-regが関与しており、肝癌治療効果判定や再発予測のBiomarkerとしても有用である。またTr1細胞の誘導機序に、肝癌細胞と樹状細胞が重要であり、IL-10、TGF- β 1などのサイトカインと癌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., Inoue, M., Miyazaki, M., Miyatake, H., Sakakibara, M., Yakushijin, T., Oze, T., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon- α 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* 2007. 79: 511-521
- 2) Abe, T., Kaname, Y., Hamamoto, I., Tsuda, Y., Wen, X., Taguwa, S., Moriishi, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Kanto, T., Hayashi, N., Akira, S. and Matsuura, Y., Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J Virol* 2007. 81: 8953-8966.
- 3) Kanto T. Virus-associated innate immunity in liver. *Front Bioscience* 2008. 13: 6183-6192
- 4) Miyazaki, M., Kanto, T., Inoue, M., Itose, I., Miyatake, H., Sakakibara, M., Yakushijin, T., Kakita, N., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I. *J Med Virol* 2008. 80: 980-988.
- 5) Kohga, K., Takehara, T., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Miyagi, T., Hiramatsu, N., Kanto, T., Kasugai, T., Katayama, K., Kato, M. and Hayashi, N., Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008. 99: 1643-1649.
- 6) Toyama, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Oze, T., Nakanishi, F., Yasumaru, M., Mochizuki, K., Kanto, T., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma including recurrent cases: a study of 861 patients in a single institution. *J Clin Gastroenterol* 2008. 42: 317-322.
- 7) Kanada, A., Takehara, T., Ohkawa, K., Kato, M., Tatsumi, T., Miyagi, T., Sakamori, R., Yamaguchi, S., Uemura, A., Kohga, K., Sasakawa, A., Hikita, H., Kawamura, K., Kanto, T., Hiramatsu, N. and Hayashi, N., Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatology* 2008. 38: 622-628.
- 8) Kurashige, N., Hiramatsu, N., Ohkawa, K., Oze, T., Inoue, Y., Kurokawa, M., Yakushijin, T., Igura, T., Kiso, S., Kanto, T., Takehara, T., Tamura, S., Kasahara, A., Oshita, M., Hijioka, T., Katayama, K., Yoshihara, H., Hayashi, E., Imai, Y., Kato, M. and Hayashi, N. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of the YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatology* 2008, 38: 450-456.
- 9) Shinzaki, S., Iijima, H., Nakagawa, T., Egawa, S., Nakajima, S., Ishii, S., Irie, T., Kakiuchi, Y., Nishida, T., Yasumaru, M., Kanto, T., Tsujii, M., Tsuji, S., Mizushima, T., Yoshihara, H., Kondo, A., Miyoshi, E. and Hayashi, N. IgG oligosaccharide alterations are a novel diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2008. 103: 1173-1181.
- 10) Egawa, S., Iijima, H., Shinzaki, S., Nakajima, S., Wang, J., Kondo, J., Ishii, S., Yoshio, T., Irie, T., Nishida, T., Kakiuchi, Y., Yasumaru, M., Yoshihara, H., Kanto, T., Tsujii, M., Tsuji, S. and Hayashi, N. Upregulation of GRAIL is associated with remission of ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008. 295: G163-G169.
- 11) 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.

12) 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.

13) 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., Hohsui, 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.

14) 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.

15) 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. Hayashi N. NK and NKT-dendritic cell interactions in HCV infection Hepatic Inflammation and Immunity 2008 (Galveston, TX, USA 1.25~27 2008)

2) Kanto, T. Miyazaki M, Sakakibara M. Dendritic cell as a versatile controller of innate and adaptive immune response against hepatitis C virus The 10th International Symposium on Dendritic Cells (Kobe, Japan 10.1~5 2008)

3) Sakakibara M. Kanto, T., Miyazaki, M. Impaired TLR/RIG-I-mediated innate immunity in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C patients (poster award) The 10th International Symposium on Dendritic Cells (Kobe, Japan 10.1~5 2008)

4) Sakakibara M, Kanto, T., Miyazaki, M. Novel mature dendritic cells inducible from monocytes with OK432, PGE1 and IFN- α serve as potent vaccine vehicles for gastrointestinal cancers (poster award) The 10th International Symposium on Dendritic Cells (Kobe, Japan 10.1~5 2008)

5) Itose, I Kanto, T. Takebe S, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Miyatake H, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Dynamic changes of regulatory T cell subsets in patients with chronic HCV infection in relation to the degree of liver inflammation The Liver Meeting AASLD 59th Annual Meeting and Postgraduate Course (San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

6) Takebe, S Kanto, T. Miyatake H, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Itose, I Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. IL-7 as a booster of Th2 differentiation by modulating myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection The Liver Meeting AASLD 59th Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

7) Kakita, N Kanto T, Itose, I Takebe S, Miyatake H, Higashitani K, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N.: Natural regulatory T cells as biomarker for the assessment of hepatocellular carcinoma in local ablation therapy

The Liver Meeting AASLD 59th Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

8) 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)

9) 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)

10) 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)

11) 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)

12) 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
Takehara T, (林)	Natural killer cell-mediated ablation of metastatic liver tumors by hydrodynamic injection of IFN- γ gene to mice.	Int J Cancer	120	1252-1260	2007
Jinushi M, (林)	Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4 ⁺ CD25 ⁺ T cells with PD-1-dependent regulatory activities.	Immunology	120	73-82	2007
Tatsumi T, (林)	Intrahepatic delivery of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor.	Hepatology	45	22-30	2007
Miyatake H, (林)	Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection.	J Viral Hepat	14	404-412	2007
Tatsumi T, (林)	Injection of IL-12 gene-transduced dendritic cells into mouse liver tumor lesions activates both innate and acquired immunity.	Gene Ther	14	863-871	2007
Itose I, (林)	Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients	J Med Virol	79	511-521	2007
Yamaguchi S, (林)	Immunotherapy of murine colon cancer using receptor tyrosine kinase EphA2-derived peptide-pulsed dendritic cell vaccines.	Cancer	110	1469-1477	2007

Sakamori R, (林)	Signal transducer and activator of transcription 3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice.	Hepatology	46	1564-1573	2007
Kanada A, (林)	Type B Fulminant Hepatitis Is Closely Associated with a Highly Mutated Hepatitis B Virus Strain.	Intervirol	50	349-401	2007
Hiramatsu N, (林)	Early decline of hemoglobin can predict progression of hemolytic anemia during pegylated interferon and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C.	Hepatology Res	38	52-59	2008
Kurashige N, (林)	Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine.	Hepatology Res	38	450-456	2008
Toyama T, (林)	A New Prognostic System for Hepatocellular Carcinoma Including Recurrent Cases: A Study of 861 Patients in a Single Institution.	J Clin Gastroenterol	42	317-322	2008
Miyazaki M, (林)	Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-1.	J Med Virol	80	980-988	2008
Yamaguchi S, (林)	Dendritic cell-based vaccines suppress metastatic liver tumor via activation of local innate and acquired immunity.	Cancer Immunol Immunother	57	1861-1869	2008
Kanada A, (林)	Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection.	Hepatology Res	38	622-628	2008

Tanaka H, (林)	Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990 to 2003	Ann Intern Med	148	820-826	2008
Kohga K, (林)	Serum levels of soluble MHC class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and the changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma.	Cancer Sci	99	1643-1649	2008
Ohkawa K, (林)	Supportive role of p70 core and preS2 genomic changes on establishment of lamivudine-resistance hepatitis B virus.	J Infect Dis	198	1150-1158	2008
Tatsumi T, (林)	Decreased expression of CD1d molecule on liver dendritic cells in subcutaneous tumor bearing mice.	J Hepatol	49	779-786	2008
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
Itoe 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 γ 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
Kohga K, (林)	Expression of CD133 confers malignant potential via inhibiting metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma.	J Hepatol			in press
Moriishi K, (松浦)	Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis.	PNAS	104	1661-1666	2007

Miyamoto H, (松浦)	Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein.	J. Virol.	81	1727-1735	2007
Abe T, (松浦)	Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines.	J. Virol.	81	8953-8966	2007
Mori Y, (松浦)	Processing of Capsid Protein by Cathepsin L Plays a Crucial Role in Replication of the Japanese Encephalitis Virus in Neural and Macrophage Cells.	J. Virol.	81	8477-8487	2007
Tani H, (松浦)	Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins.	J. Virol.	81	8601-8612	2007
Moriishi K, (松浦)	Host factors involved in the replication of hepatitis C virus.	Rev. Med. Virology	17	343-354	2007
Okamoto K, (松浦)	Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation.	J. Virol.	82	8349-8361	2008
Okamoto T, (松浦)	A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication.	J. Virol.	82	3480-3489	2008
Tagawa S, (松浦)	Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication.	J. Virol.	82	2631-2641	2008
Yamashita T, (松浦)	Crystal structure of the catalytic domain of Japanese encephalitis virus NS3 helicase/nucleoside triphosphatase at a resolution of 1.8 Å.	Virology	373	426-436	2008

Tagawa S, (松浦)	Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway.	Journal of Virology	83	10427-10436	2009
Yamashita T, (松浦)	Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	106	12986-12991	2009
Kukihara H, (松浦)	Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation.	Journal of Virology	83	7959-7969	2009
Abe T, (松浦)	Baculovirus induces type I IFN production through TLR-dependent and -independent pathways in a cell type-specific manner.	Journal of Virology	83	7629-7640	2009
Koike K, (小池)	Prevalence of Coinfection with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Japan	Hepatol Res	37	2-5	2007
Koike K (小池)	Pathogenesis of HCV-associated HCC: dual-pass carcinogenesis through the activation of oxidative stress and intracellular signaling	Hepatol Res	37	S115-120	2007
Koike K (小池)	Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways	J Gastroenterol Hepatol	22	S108-111	2007
Miyamoto H, (小池)	Involvement of the PA28 γ -Dependent Pathway in Insulin Resistance Induced by Hepatitis C Virus Core Protein	J Virol	81	1727-1735	2007
Moriishi K, (小池)	Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis	Proc Natl Acad Sci USA	104	1661-1666	2007
Yotsuyanagi H, (小池)	Drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis B and C viruses	J Gastroenterol	42	329-335	2007

Suzuki Y, (小池)	Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-resistant hepatitis B virus: A case report	World J Gastroenterol	13	964-969	2007
Aono J, (小池)	Amino acid substitutions in S region of hepatitis B virus in the sera from patients with acute hepatitis.	Hepatol Res	37	731-739	2007
Ichibangase T, (小池)	A proteomics method revealing disease-related proteins in the liver of hepatitis B-infected mouse model.	J Proteome Res	6	2841-2849	2007
Okuse C, (小池)	Hepatitis C as a Systemic Disease: Virus and Host Immunologic Responses Underlie Hepatic and Extrahepatic Manifestations.	J Gastroenterol Hepatol	42	857-865	2007
Tanaka N, (小池)	PPAR-alpha is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein.	J Clin Invest	118	683-694	2008
Newell P, (小池)	Experimental models of hepatocellular carcinoma.	J Hepatol	48	858-879	2008
Koike K, (小池)	Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis.	J Gastroenterol Hepatol	23	S87-91	2008
Ishizaka N, (小池)	Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening	Hepatol Res	38	775-783	2008
Nagase Y, (小池)	Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus.	Hepatol Res	38	252-258	2008
Koike K, (小池)	Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan.	Hepatol Res	38	310-314	2008