

て問題ないと思われる。

C. 研究結果

(1) 臨床背景

男性：女性＝32：7，年齢：55～84歳（平均67.9歳）。HBcAb(+)：5例、HBcAb(-)：8例、不明：26例。飲酒歴あり：26例、高血圧歴あり：14例、糖尿病歴あり：13例。

(2) 鉄染色

鉄沈着なし：13例(33%)、鉄沈着あり（軽～中等度）：16例(41%)、鉄沈着あり（高度）：10例(26%)。

(3) 免疫組織化学

(a) 8OHdGの結果

(I) 小葉全体に発現する症例：14例

(II) 門脈域周囲あるいは中心静脈周囲に発現する症例：14例

(III) 全体的にほとんど発現しない症例：17例。

(b) 4HNEの結果

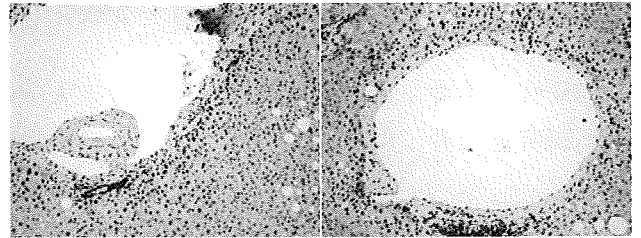
門脈域周囲および中心静脈周囲を中心として強弱はあるが全体的に発現していた。

(c) MnSODの結果

門脈域周囲に散在性に認められた。

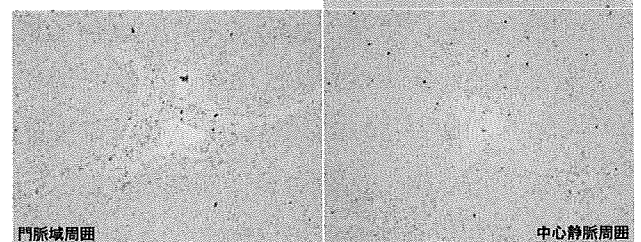
8OHdG

門脈域周囲あるいは中心静脈周囲に発現する症例

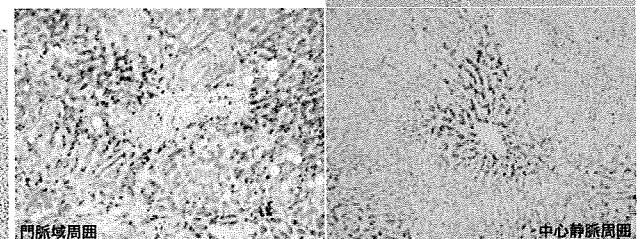


8OHdG

ほとんど発現しない症例

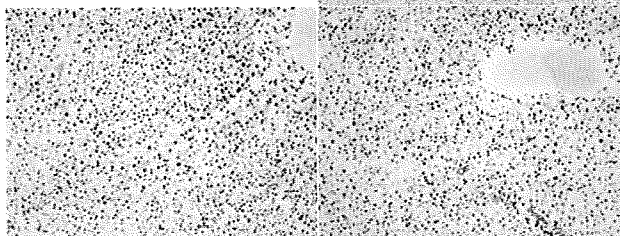


4HNEは門脈域周囲および中心静脈周囲を中心に強弱はあるものの全体的に発現していた。

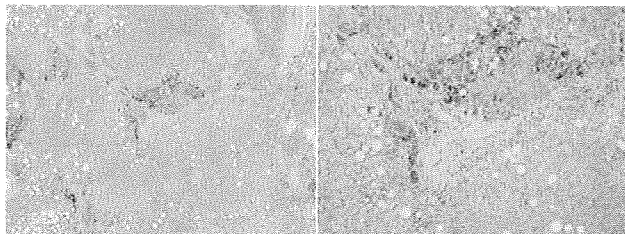


8OHdG

小葉全体に発現する症例



MnSODは門脈域周囲に散在性に認められた。



酸化ストレスマーカーの発現の有無、程度、局在と臨床的背景（飲酒歴、基礎疾患）や抗酸化物質マーカーの発現の間には明らかな関連性は指摘できなかつた。

また肝の組織学的所見（線維化や炎症、脂肪化、鉄沈着などの程度）と酸化ストレスマーカー発現の間にも明らかな関連性は指摘できなかつた。

D. 考案と結論

非B非C肝における発癌のメカニズムに酸化ストレスの有意な関与が乏しい可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

論文発表 なし

学会発表 なし

G. 知的所得権の所得状況

なし

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者： 清家 正隆 大分大学医学部 肝疾患相談センター 講師
研究協力者： 井上 恵 大分大学医学部 総合内科学第一講座 大学院
後藤 孔郎 大分大学医学部 総合内科学第一講座 医員

研究課題： 脾臓摘出が肝臓・脂肪組織の脂質代謝に及ぼす影響

研究要旨：近年、肝硬変患者の予後改善をうけて脾機能亢進症の進行した血小板低下症例に肝癌治療、インターフェロン治療を行う機会が多くなった。その補助治療として脾臓摘出術があるが、脾臓摘出の是非については未だ明確にはされておらず、脾臓摘出の全身への影響を解明することは脾機能亢進症を伴う肝硬変症診療における重要な課題の一つといえる。そこで本研究では脾臓摘出が肝臓と脂肪組織に与える影響について調べた。

まず雄性 SD ラットに高脂肪食を投与して肥満ラットを作成した。その後、脾臓摘出群 (SPX) 群とシャム (Sham) 群とに分け、さらに高脂肪食を 24 週間摂取させた後の肝臓・脂肪組織をサンプリングした。摘出肝臓・脂肪組織では病理組織を評価し、組織中の炎症性サイトカイン含有量と酸化ストレスマーカーの測定を行った。また、末梢血では血中アディポネクチン値を測定した。脾臓摘出を行った高脂肪食誘導性肥満ラットの肝臓では脂肪化増悪のみならず炎症細胞の浸潤、クッパー細胞数の増加が観察された。また組織内の炎症性サイトカイン含有量、さらに酸化ストレスマーカーも脾臓摘出群で有意に増加していた。同様に脂肪組織においても脾臓摘出を行うことで炎症が悪化していることが明らかとなった。脾臓摘出は代謝臓器である肝臓と脂肪組織に負の影響を与え、その結果脂肪肝をはじめとする全身性の代謝異常の悪化をまねく可能性が考えられ、脾臓温存の重要性が示唆された。

A. 研究目的

肝細胞癌の局所治療法の治療成績向上により肝硬変患者の予後が改善し、脾機能亢進症の進行した血小板低下症例に対する肝癌治療、インターフェロン治療を行う機会が多くなった。その際、血小板低下に対する補助治療として脾臓摘出術があるが、脾臓摘出の是非については未だ明確にはされていないのが現状であり、脾臓摘出の全身への影響を解明することは、脾機能亢進症を伴う肝硬変症診療における重要な

課題の一つといえる。そこで本研究では脾臓摘出が代謝臓器である肝臓と脂肪組織に与える影響について調べた

B. 研究方法

雄性 SD ラットに 60%高脂肪食を 4 週間投与して高脂肪食誘導性肥満ラットを作成した後、脾臓摘出群 (SPX) 群とシャム (Sham) 群とに分け手術を施行した。術後も引き続き高脂肪食を与え、術後 24 週目に臓器を摘出した。摘出肝臓・脂肪組織では病理組織を評価し (HE 染色、F4/80

免疫染色)、組織中の炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1)含有量と酸化ストレスマーカー(8-OHdG)を測定した。また、末梢血では血中アディポネクチン値を測定した。

C. 研究結果

(1) 脾臓摘出による肝臓における変化

SPX 群の摘出肝臓には Sham 群と比べて明らかな脂肪化増悪を認めた。また、脂肪化のみならず脂肪化の強い部分と一致して SPX 群の肝臓には Sham 群では観察されない炎症細胞浸潤や、クッパー細胞数の増加がみられ、肝臓内の炎症性サイトカイン含有量、酸化ストレスマーカーは増加していた。(図 1)

(2) 脾臓摘出による白色脂肪組織における変化

SPX 群の白色脂肪組織では Sham 群のそれと比較して、脂肪細胞そのものの小型化を認めた。間質には強い炎症細胞浸潤を認め、組織中の炎症性サイトカイン含有量および酸化ストレスマーカーは上昇していた。(図 1)

また、善玉アディポカインであるアディポネクチンの末梢血中濃度は SPX 群で低下していた。

図 1

高脂肪食誘導性肥満ラット		
splenectomy		
	肝臓	白色脂肪組織
組織所見	・脂肪化↑ ・炎症細胞浸潤 ・Kupffer細胞↑	・脂肪細胞の小型化 ・炎症細胞浸潤
中性脂肪含有量	↑	↓
炎症性サイトカイン含有量	↑	↑
酸化ストレスマーカー	↑	↑
脂肪化	↑	↓
炎症	↑	↑

D. 考察

脾臓摘出を行った高脂肪食誘導性肥満ラットの肝臓では、炎症細胞の浸潤、クッパー細胞数の増加が観察された。また組織内の炎症性サイトカイン含有量も有意に増加しており、脾臓摘出後の肝臓には脂肪化の増悪のみならず炎症所見も認められた。同様に、脂肪組織においても炎症が悪化していることも明らかとなった。脾臓摘出は脂肪肝をはじめとする全身性の代謝に影響を及ぼす可能性が考えられた。

E. 結論

今回の動物実験で、脾臓摘出が代謝機構の主臓器に負の影響を与えていることが明らかとなり、脾臓温存の重要性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

井上恵,清家正隆,後藤孔郎,正木孝幸,加隈哲也,吉松博信 脾臓摘出による肝臓における脂質代謝への影響 第 45 回日本肝臓学会総会 神戸 2009

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（平成 21 年度）

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究協力者：細田洋司 国立循環器病センター研究所生化学部 特任研究員

研究課題： 薬剤性肝硬変モデルラットに対するグレリンの治療効果

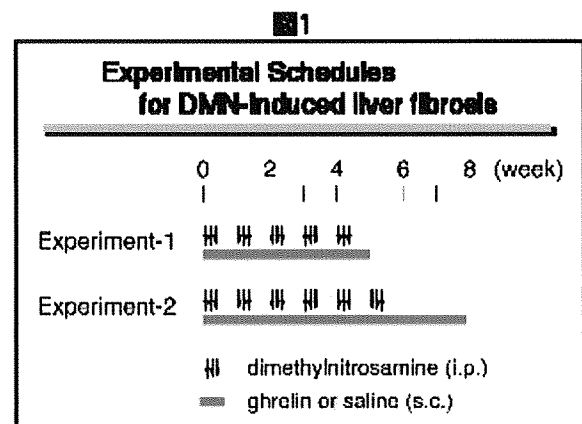
研究要旨：末梢性グレリンは、迷走神経求心路を介して視床下部に作用し成長ホルモン分泌や摂食を促進する。さらに自律神経を介して全身のエネルギー代謝の調節、肝機能および消化管機能調節などに関わる。今回、研究協力者は、ジメチルニトロソアミンによる薬剤性肝硬変モデルラットを作製し、グレリンによるその治療効果を検討した。その結果、グレリンによって肝細胞の増殖促進やアポトーシスの抑制、肝線維化の抑制、摂食促進などが認められ、肝硬変への進展が抑制された。また、肝不全死に対する改善効果も認められた。グレリンは肝障害の改善薬として応用可能であることが示された。

A. 研究目的

研究協力者らは、1999年にラットおよびヒトの胃組織から新規ペプチドホルモンであるグレリン(ghrelin)を発見した。グレリンは、主に胃から産生分泌され、強力な成長ホルモン(GH)分泌促進活性や摂食亢進作用、全身のエネルギー代謝調節作用、消化管機能調節作用などをもつ。胃から分泌されたグレリンの情報伝達は、迷走神経系がその中心的役割を担う。末梢グレリンの情報は、迷走神経求心路を介して視床下部神経核を活性化し、その特異的作用を発現する。さらに、自律神経遠心路を経由して末梢臓器の機能調節にも関与する。これまでの研究から、グレリンは肝細胞増殖作用や肝血流量増加作用、薬剤性肝障害の軽減作用をもつことが明らかとなった。

今回、研究協力者は、実験動物を用いて薬剤性肝硬変モデルを作製し、これに対するグレリンの治療薬としての可能性を検討した。

B. 研究方法



ジメチルニトロソアミン(DMN)を実験動物に一定期間投与すると、持続的な肝細胞の炎症性壊死が起こり、肝線維症に至る。この方法は慢性肝炎・肝硬変の作製モデルとして確立されている。このようなモデル動物において、グレリン投与によって肝線維化や肝機能はどうかを検討した。実験動物には5週齢の雄ラットを用い、1%DMNの1 ml/kgを腹腔内に週3日連日投与した。グレリンは3または30 µg/kgを連日皮下投与を行った(図1)。

実験①：DMNおよびグレリン投与を5週間行い、肝臓、脾臓、血液を採取し、肝硬変の程度を検討した。

実験②：肝不全死に対するグレリンの治療効果を検討するため、DMNおよびグレリン投与を6週間、引き続きグレリン投与を2週間行った。

(倫理面への配慮)

本研究は国立循環器病センターが定める動物実験規定に沿って行われた。

C. 研究結果

実験① 肝硬変に対するグレリンの治療効果

DMN投与による肝硬変モデルラットにおいて、肝萎縮および代償性脾腫大を認め、その約半数に腹水貯留がみられた。また、DMN連日投与期間中、ラットの摂食量は一過性に半減し、体重増加が抑制された。グレリン(30 μg/kg)投与群では、肝萎縮や脾腫大は軽減し、いずれも腹水貯留は認められなかった。また、摂食量の有意な増加を認めた。血液検査において、DMN投与群では白血球数の増加、赤血球および血小板数の減少、フィブリノゲン低下、ヘパラスチンテストの延長を認めた。グレリン投与によって、血小板数およびフィブリノゲンの低下が有意に抑制された(表1)。白血球や赤血球数、ヘパラスチンテストにおいては改善傾向が認められた。

表1

	Blood examination in DMN-treated rats			
	Control	Saline	Grelin 30 μg/kg	Grelin 30 μg/kg
WBC (x10 ⁹ /L)	5.9 ± 0.4	7.6 ± 1.6*	7.3 ± 0.8*	6.6 ± 0.2
RBC (x10 ¹² /L)	7.5 ± 0.6	6.6 ± 0.2*	6.7 ± 0.3*	6.8 ± 0.2
PLI (x10 ⁹ /L)	15.8 ± 1.8	20.8 ± 3.4*	12.9 ± 0.2	18.8 ± 1.5*
Hepa-stain test (%)	25 ± 0	10 ± 0.2*	1.7 ± 0.1*	8.1 ± 0.2*
Hepa-stain test (%)	67.8 ± 5	100.2 ± 4.2*	85.2 ± 11.8	77.8 ± 6.5

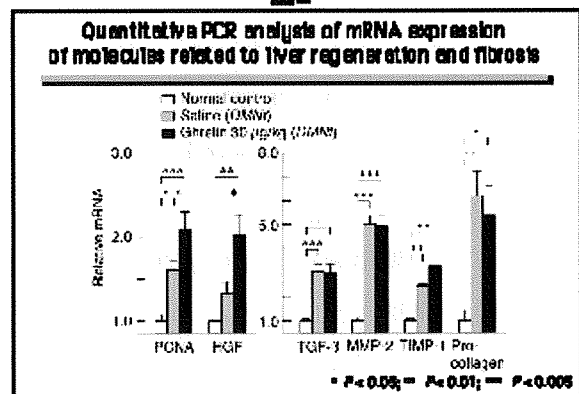
Abb. 1. Blood examination in DMN-treated rats. WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; PLI, platelet count; Hepa-stain test, hepatic fibrosis test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.005.

組織学的検討では、DMN投与において肝細胞の炎症像と線維化による偽小葉の形成がみられ、グレリン投与によってこの変化に軽減がみられた。肝線維化の指標である組織内ヒドロキシプロリン含量を測定したところ、正常群と比較してDMN投与群でそれは有意に増加し、グレリンによって減少傾向が認められた。TUNEL染色による検討では、DMN群に数多くの肝細胞のアポトーシスがみられたが、グレリン投与によってアポトーシス細胞の減少が認められた。

肝細胞の増殖関連遺伝子を検索したところ、グレリン投与群においてproliferative cell nuclear antigen (PCNA) や hepatocyte growth factor (HGF) 遺伝子に有意な増加が認められた(図2)。肝線維化に関わるtransforming growth factor (TGF)-β や matrix metalloproteinase (MMP)-2、tissue inhibitor metalloproteinase (TIMP)-1、pro-collagenなどの遺伝子発現に、グレリン投与群で明らかな変化は認められなかった。

一方、3 μg/kgのグレリン投与群では、コントロール群と比較して明らかな効果を認めなかつ

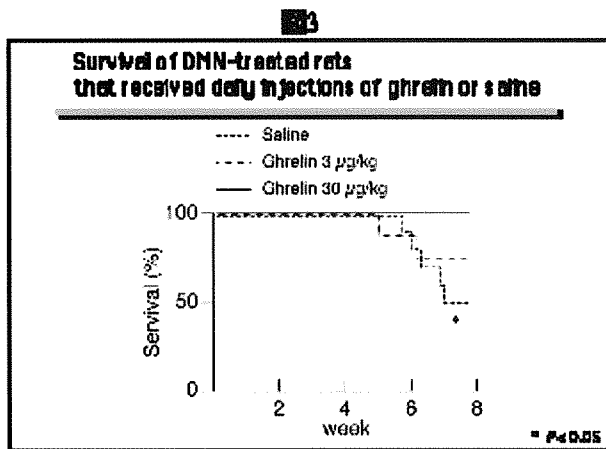
図2



た。

実験② グレリンによる肝不全死の抑制効果

DMNの6週間投与によって、コントロール群ではその後2週間で約半数のラットが肝不全により死亡した。これに対して、グレリン(30 µg/kg)投与群では死亡ラットはみられず、有意な治療効果を認めた(図3)。



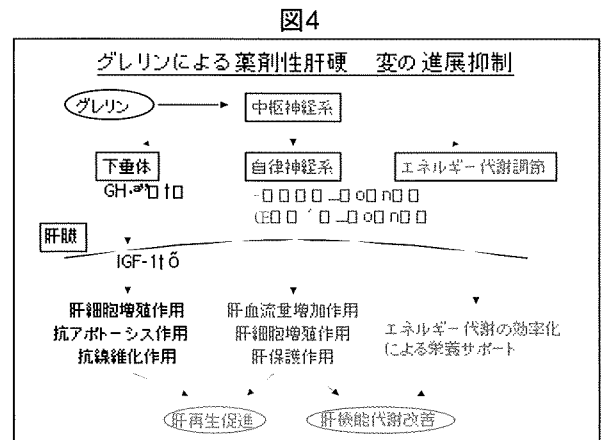
D. 考察

これまでの研究から、グレリンの肝血流量増加作用、四塩化炭素による薬剤性急性肝障害の抑制効果を明らかにした。肝組織にグレリン受容体の発現は認められず、グレリンの肝臓に対するこれらの作用は副交感神経遠心路を介して発揮される。

今回の研究では、DMN投与によって薬剤性肝硬変モデルラットを作製し、グレリンによる治療効果を検討した。グレリン投与によって、肝細胞増殖が促進された他、肝細胞のアポトーシスや肝線維化の抑制、摂食促進効果によるエネルギー代謝の改善などが認められた。グレリンによるこれらの肝機能調節作用の結果、薬剤性肝硬変の進展が抑制されたものと考えられる。また、DMNによる肝不全死においても、グレリン投与によってその抑制効果を示した。

グレリンは、様々な神経内分泌的な生理活性を有し、また摂食促進をはじめエネルギー代謝の改善によって、薬剤性肝硬変が改善されたも

のと思われる(図4)。



E. 結論

薬剤性肝硬変モデルラットにおいて、グレリンは肝硬変への進展を抑制し、肝不全死も抑制した。グレリンは肝障害の改善薬として応用可能であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし (現在英文雑誌に投稿中)

2. 学会発表

なし

H. 知的所得権の所得状況

なし

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究分担者：伊東恭悟 久留米大学医学免疫・免疫治療学講座 教授

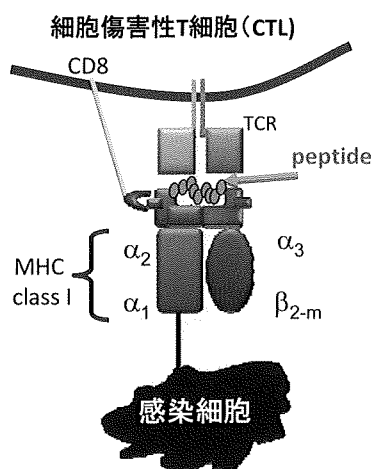
研究課題： ペプチドワクチンによる肝発癌・病態進展抑制

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

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

A. 研究目的

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



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

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

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

日本人で最も多い HLA-A24 に結合するか、さらに HLA-A24 タイプの HCV 感染患者から CTL を誘導できないか検討することにした。

B. 研究方法

患者および試料

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

ペプチド

C35-44 ペプチドは Good Manufacturing Practice (GMP) レベルで、純度 >99.5% のものを委託合成した。それ以外の対照ペプチドは 90%以上の純度のものを準備し、最終濃度が 10 mg/ml になるように DMSO で溶解し使用まで -80°C で保存した。

抗体の測定方法

それぞれのペプチドに対する IgG 抗体はマイクロサスペンションアレイにて実施し、ALT や AFP、HCV コア抗体やウイルス量測定は検査会社に委託した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

ワクチン投与患者における抗体の応答についての解析

HLA-A24 陽性患者におけるワクチン臨床試験において、13 名すべての患者で少なくとも一つの投与ペプチドに対する IgG 抗体の

増加を認めた (図 1-A)。

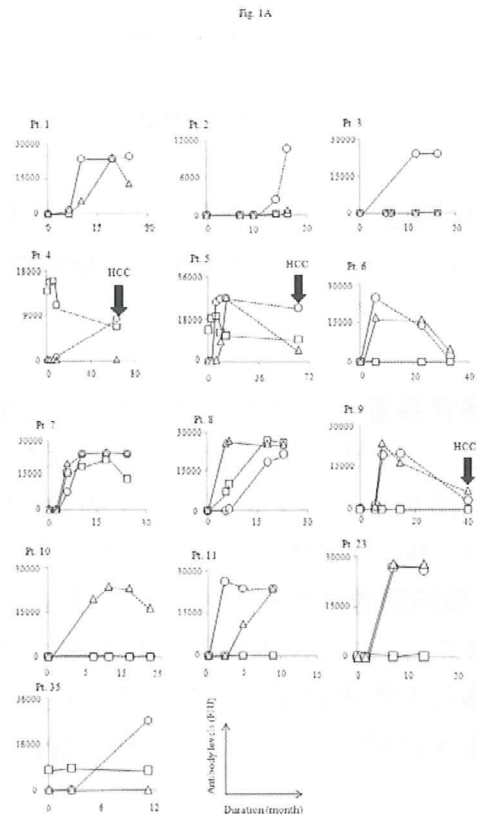


図 1-A) HLA-A24 陽性患者におけるワクチンペプチドに対する抗体価の変化

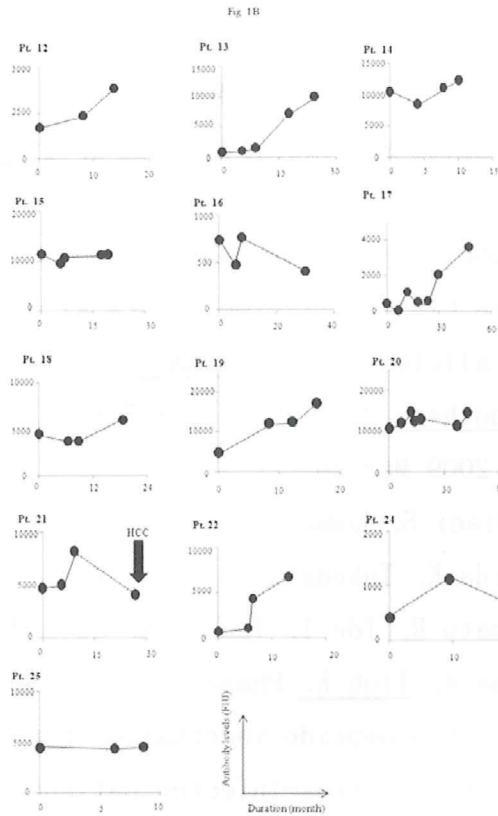
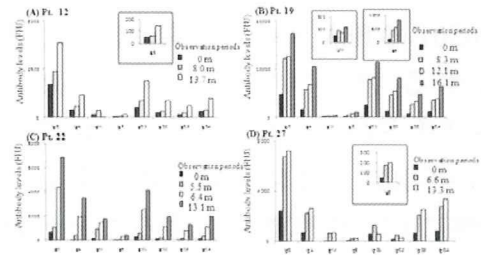


図 1-B) 汎 HLA 臨床試験におけるワクチンペプチドに対する抗体価の変化その 1

一方、汎 HLA の臨床試験では 26 名中 22 名において C_35-44 ペプチドに対する IgG 抗体の増加を認めた (図 1-B、図 1-C)。また IgG のみならず、IgM、IgA、IgE も増加を認め、さらに IgG1 から IgG4 までも増加していた (図 2)。

図 2) ワクチン投与に伴う Igs の変化



D. 考察

本研究では、C35-44 ペプチドが HLA-A*0201 以外に、全くグループが異なる HLA-A*2402 に対して結合能を有しかつこれらの HLA タイプ拘束性に CTL 誘導能があることを明らかにした。更に本年度は、上記の試験管内での成績と同様の結果が、臨床試験においても確認された。

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Noguchi M, Kakuma T, Uemura H, Nasu Y, Kumon H, Hirao Y, Moriya F, Suekane S, Matsuoka K, Komatsu N, Shichijo S, Yamada A, Itoh K. A randomized phase II trial of personalized peptide vaccine plus low dose estramustine phosphate (EMP) versus standard dose EMP in patients with castration resistant prostate cancer. Cancer Immunol Immunother. 2010
2. Uemura H, Fujimoto K, Mine T, Uejima S, de Velasco MA, Hirao Y, Komatsu N, Yamada A, Itoh K. Immunological evaluation of personalized peptide vaccination monotherapy in patients

with castration-resistant prostate cancer. Cancer Sci. 2009 Dec 7.

3. Terasaki Y, Shichijo S, Niu Y, Komatsu N, Noguchi M, Todo S, Itoh K. An HLA-A3-binding prostate acid phosphatase-derived peptide can induce CTLs restricted to HLA-A2 and -A24 alleles. Cancer Immunol Immunother. 2009;58(11):1877-85. Epub 2009 Mar 28.
4. OYutani S, Komatsu N, Shichijo S, Yoshida K, Takedatsu H, Itou M, Kuromatsu R, Ide T, Tanaka M, Sata M, Yamada A, Itoh K. Phase I clinical study of a peptide vaccination for hepatitis C virus-infected patients with different human leukocyte antigen-class I-A alleles. Cancer Sci. 2009;100(10):1935-42. Epub 2009 Jun 23.
5. Niu Y, Terasaki Y, Komatsu N, Noguchi M, Shichijo S, Itoh K. Identification of peptides applicable as vaccines for HLA-A26-positive cancer patients. Cancer Sci. 2009;100(11):2167-74. Epub 2009 Jul 23.
6. Hattori T, Mine T, Komatsu N, Yamada A, Itoh K, Shiozaki H, Okuno K. Immunological evaluation of personalized peptide vaccination in combination with UFT and UZEL for metastatic colorectal carcinoma patients. Cancer Immunol Immunother. 58(11):1843-52. Epub 2009 Apr 26.

7. ○Niu Y, Komatsu N, Komohara Y, Matsueda S, Yutani S, Ishihara Y, Itou M, Yamada A, Itoh K, Shichijo S. A peptide derived from hepatitis C virus (HCV) core protein inducing cellular responses in patients with HCV with various HLA class IA alleles. J Med Virol. 2009;81(7):1232-40.
8. Mohamed ER, Naito M, Terasaki Y, Niu Y, Gohara S, Komatsu N, Shichijo S, Itoh K, Noguchi M. Int J Oncol. Capability of SART3109-118 peptide to induce cytotoxic T lymphocytes from prostate cancer patients with HLA class I-A11, -A31 and -A33 alleles. 2009;34(2):529-36.
4. 松本和将、佐藤威文、岩村正嗣、小松誠和、峯孝志、山田亮、伊東恭悟、馬場志郎：MVAC 耐性進行・再発膀胱癌に対するテーラーメイド癌ペプチドワクチン療法の検討。第13回日本がん免疫学会総会 6/24-24, 2009. 北九州。
5. 小松誠和、由谷茂、山田亮、七條茂樹、田中正俊、佐田通夫、伊東恭悟：Study of hepatic C virus vaccine from the viewpoint of cancer prophylaxis。第13回日本がん免疫学会総会 6/24-24, 2009. 北九州。
6. 山田亮、伊東恭悟：シボジウム テーラーメイドペプチドワクチン療法の現状と展望。第13回日本がん免疫学会総会 6/24-24, 2009. 北九州。
7. 伊東恭悟：特別講演 「期待されるがんペプチドワクチン：現状と課題」。日本皮膚科学会 第349回福岡地方会 7/26, 2009. 久留米。
8. 伊東恭悟、野口正典、山田亮、七條茂樹、由谷茂、小松誠和、山中龍也、柳本泰明、松本和将：がんペプチドワクチン：迅速な実用化へ向けて。バイオセラピー学会 11/26-27, 2009.

2. 学会発表

1. 伊東恭悟：HCV ペプチドワクチン開発の現状：発がん予防の可能性について。第5回肝免疫・ウイルス・フロンティア 4/18/2009, 金沢。
2. 柳本泰明、里井壮平、峯孝志、塩見尚礼、豊川秀吉、山本智久、廣岡智、山田亮、岡正朗、伊東恭悟、権雅憲：進行膵癌における癌ペプチドワクチン開発。第30回癌免疫外科研究会 5/21-22/2009、久留米。
3. 七條茂樹、NIU Yamei、寺崎康伸、小松誠和、野口正典、伊東恭悟：HLA-A26 陽性がん患者に対するワクチンとして使用可能なペプチドの同定。第13回日本がん免疫学会総会 6/24-24, 2009. 北九州。

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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（平成 21 年度）

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究代表者： 佐田通夫 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 教授

研究協力者： 中村 徹 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 助教

研究課題： 血管内皮前駆細胞を用いた肝再生療法

研究要旨：肝臓は、再生能力に富んだ臓器であるが、肝硬変等の重篤な肝障害では再生能力が追いつかず、根本的治療としては、肝移植しかないのが現状である。脳死・生体肝移植は確立した治療法ではあるが、医療経済的問題やドナー不足は深刻であり、ドナー不足の解決策として、幹細胞を用いた細胞移植治療が期待されている。我々は、幹細胞のひとつである血管内皮前駆細胞（CD34 陽性細胞）移植による肝臓再生療法を目指し、昨年度（平成 20 年度）は、3 名の患者（HCV:2 例、アルコール：1 例）に対し、自己末梢血単核球細胞（CD34 陽性細胞を含む細胞集団）を全身投与し、肝での血流改善とともに、肝機能の改善、肝線維化の軽減、門脈圧低下に伴う側副血行路の改善、腹水や浮腫の改善を認め、肝予備能の改善効果を確認した。本年度（平成 21 年度）は、不要な細胞（CD34 陰性細胞）を取り除き、純化した CD34 陽性細胞のみを経肝動脈的に局所投与することによる治療を試みた。2009 年 11 月までに 5 症例（HBV:1 例、HCV：4 例）を経験し、現時点では統計学的な有意差はないものの、総ビリルビン値の低下傾向、血清アルブミン値の増加傾向、Child-Pugh スコアの改善、腹水の改善、内服利尿剤の減量（4 例/5 例、うち 2 例は内服中止）を可能にした。これまでの経過は、動物実験から予測された結果にほぼ一致している。

A. 研究目的

肝硬変症の進展に伴う肝不全による本邦での死者は年間 9,200 人にのぼる。さらに、B 型・C 型肝炎ウイルスに起因する肝硬変患者の多くは肝細胞癌を発症する。肝細胞癌による年間死亡者数は年々増加し、2002 年には 34,000 人となっており、肝硬変症に関連した年間死亡者数は 40,000 人を超えることが推測される。また、肝硬変患者の中には結果的に医療行為によって C 型肝炎ウイルスに感染した患者も多く含まれており、これらの患者に対して十分な対策を講じることは急務と考えられる。しかし、進

行した肝硬変症に対する根本的な治療法は肝移植しかなく、その肝移植も慢性的なドナー不足に悩まされ一般的な治療法として普及していないのが現状である。

我々は最近の研究において、ラット肝硬変症モデルを用いて、ラット血管内皮前駆細胞（CD34 陽性細胞）を障害肝臓へ移植することにより、肝硬変・肝機能の改善と肝臓再生の促進、さらに死亡率を有意に低下させうることを明らかにした。今回ヒトへの臨床応用を目的とし、非代償性肝硬変症患者を対象として、自己末梢血から採取した CD34 陽性細胞を投与することで肝線維化の改善、肝臓再生が促進され、

肝機能の改善がみられるか否かを明らかにするとともに、有効性と安全性について検討する。2006年9月より、「自己末梢血単核球細胞移植による非代償性肝硬変症患者に対する肝臓再生療法」と題し、久留米大学倫理委員会にて審査・承認のもと、3症例の患者に対し治療を行った。経過は良好であったと考えている。単核球細胞では純化されていない状態であることより、本年度はCD34という細胞表面マーカーをもとに純化し、昨年同様の治療プロトコールにて細胞移植を行っていくことにした。

B. 研究方法

本研究の治療プロトコールを示す。

[治療適応基準]

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

- 1) 上記治療適応基準を満たしこの治療法についての承諾を得られた患者に対し治療前検査（採血検査、腹部・胸部超音波検査、全身CT検査、腹部MRI検査、上部消化管内視鏡検査、骨髄検査、肺機能検査等）をおこなう。
- 2) 入院後、5日間連続してG-CSF製剤を皮下投与する。
- 3) G-CSF投与開始4日目に、末梢血単核球細胞を採取する。採取は2日間連続して行うが、1回で有核細胞数100億個に達していれば採取は1日で終了とする。
- 4) G-CSF投与開始5日目に採取した末梢血単核球（2日分）すべてからCD34陽性細胞を細胞分離装置にて分離し、経肝動脈的に投与

する。

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

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

（倫理面への配慮）

2008年11月より「末梢血CD34陽性細胞を用いた非代償性肝硬変症に対する細胞移植療法の試み」と題して、久留米大学倫理委員会にて審査・承認のもと、研究を行った。

C. 研究結果

2009年11月までに5症例（HBV:1例、HCV:4例）を経験した。

- 1) 現時点では統計学的な有意差はないものの、肝予備能の指標とされるChild-Pughスコア、MELDスコアの改善傾向を示した。
- 2) 現時点では統計学的な有意差はないものの、血清アルブミン値やプロトロンビン時間の上昇傾向、総ビリルビン値の低下傾向を示した。
- 3) 現時点では統計学的な有意差はないものの、肝線維化の血清学的マーカーであるヒアルロン酸値、IV型コラーゲン値、プロコラーゲン3ペプチド(P-3-P)値の低下傾向を示した。
- 4) 腹部超音波検査にて、門脈血流量の明らかな増加を認めた。
- 5) 腹水を認めた患者に対しては、腹水量の低下、内服利尿剤の減量を可能にした。
- 6) 現時点で治療後に合併症が生じた症例はない。肝発癌も認めていない。

D. 考察

現在、ヒト末梢血由来の血管内皮前駆細胞 (CD34 陽性細胞) の慢性閉塞性動脈硬化症に対する有用性が臨床において確認され、その機序は血管新生の促進によると考えられている。我々は基礎研究において、ヒト末梢血由来血管内皮前駆細胞は血管を形成するばかりでなく、様々な増殖因子を産生し、肝臓を再生することを明らかにした。予想される治療効果として、CD34 陽性細胞を肝動注 (局所投与) することで、繰り返し肝炎がおこっている肝臓に移植され、肝機能の改善、肝の線維成分の減少、肝血流の改善、門脈圧亢進症の改善に伴う食道・胃静脈瘤の改善、腹水や浮腫が改善することが期待される。

E. 結論

現時点では統計学的な有意差はないものの、肝予備能の指標とされる Child-Pugh スコアの改善や、肝での合成能を示す血清アルブミン値、プロトロンビン時間の上昇、さらに総ビリルビン値の低下を確認した。腹水を認めた患者に対しては、腹水量の減少、内服利尿剤の減量を可能にし、期待される治療効果が示されつつある。次年度以降は症例数を重ねていき、治療の有効性を示すとともに、安全性についても今まで以上に慎重に経過観察を続けて確認したい。加えて、その症例数を重ねていく中で、より効率の良い治療法に向けての基礎研究も続けていきたい。採取した CD34 陽性細胞を凍結保存し、体外で GMP グレードのセルプロセッシングセンター (CPC) にて細胞を培養・増幅させることが可能となれば、繰り返し投与も可能となり、さらなる治療効果が期待できるものと確信している。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1. 中村徹. 血管内皮前駆細胞を用いた肝硬変の治療. 第 1 回 福岡県医学会総会. 福岡, 2009.

H. 知的所得権の所得状況

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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
長尾由実子, 佐田通夫	C型肝炎でみられる肝外病変にはどのようなものがあるのか?	河田純男, 佐々木 裕	現場の疑問に答える 肝臓病診療 Q&A	中外医学社	東京	2009	113-116
川口 巧, 佐田通夫	Q17. 肝癌の発生に肥満, 糖尿病は影響するか?	河田純男, 佐々木裕	現場の疑問に答える 肝臓病診療 Q&A	中外医学社	東京	2009	67- 70

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
Nagao Y, Matsuoka H, Kawaguchi T, Sata M.	Aminofeel® improves the sensitivity to taste in patients with HCV-infected liver disease.	Med Sci Monit	in press	in press	2010
Nagao Y, Matsuoka H, Seike M, Yamasaki K, Kato J, Nakajima T, Miyazaki Y, Ohno T, Inuzuka S, Ohira H, Yokosuka O, Yatsunashi H, Mori T, Honda K, Kawaguchi T, Ide T, Sata M.	Knowledge about <i>Vibrio vulnificus</i> infection in Japanese patients with liver diseases: A prospective multicenter study.	Med Sci Monit	15	115-120	2009
Nagao Y, Sata M.	High incidence of multiple primary carcinomas in HCV-infected patients with oral squamous cell carcinoma.	Med Sci Monit	15	453-459	2009
佐田通夫, 長尾由実子, 大坪維範, 岡村 孝.	C型肝炎. HCV 感染と B cell clonality, 口腔癌, インスリン抵抗性についての検討.	犬山シンポジウム記録刊行会	27	137-142	2010
長尾由実子, 佐田通夫.	C型肝炎ウイルス感染者における医療連携の在り方.	医療情報誌 シュネラー	71	22-27	2009

長尾由実子	進歩する肝疾患診療と病診連携 「インターフェロン治療の理解・認知不足の背景を探るー患者・医師対象アンケート調査からの考察ー」	Medical Tribune		144	2009
長尾由実子, 今福信一, 佐田通夫	ご存じですか? ビブリオ・バルニフィカス感染症	中外製薬株式会社		1-4	2009
Ide T, Hino T, Ogata K, Miyajima I, Kuwahara R, Kuhara K, Sata M.	A randomized study of extended treatment with peginterferon alpha-2b plus ribavirin based on time to HCV RNA negative-status in patients with genotype 1b chronic hepatitis C.	Am J Gastroenterol	104	70-75	2009
Kawaguchi T, Taniguchi E, Morita Y, Shirachi M, Tateishi I, Nagata E, Sata M.	Association of exogenous insulin or sulphonylurea treatment with an increased incidence of hepatoma in patients with hepatitis C virus infection.	Liver Int.	30	479-486	2009
Kawaguchi T, Yamagishi S, Sata M.	Branched-chain amino acids and pigment epithelium-derived factor: novel therapeutic agents for hepatitis c virus-associated insulin resistance.	Curr Med Chem.	16	4843-4857	2009
Kawaguchi T, Yamagishi S, Ito M, Okuda K, Sumie S, Kuromatsu R, Sakata M, Abe M, Taniguchi E, Koga H, Harada M, Ueno T, Sata M.	Pigment epithelium-derived factor inhibits lysosomal degradation of Bcl-xL and apoptosis in HepG2 cells.	Am J Pathol.	176	168-176	2010
Taura N, Yatsuhashi H, Nakao K, Ichikawa T, Ishibashi H.	Long-term trends of the incidence of hepatocellular carcinoma in the Nagasaki prefecture, Japan.	Oncol Rep.	21(1)	223-7	2009
Taura N, Fukushima N, Yatsuhashi H, Takami Y, Seike M, Watanabe H, Mizuta T, Sasaki Y, Nagata K, Tabaru A, Komorizono Y, Taketomi A, Matsumoto S, Tamai T, Muro T, Nakao K, Fukuizumi K, Maeshiro T, Inoue O, Sata M.	The incidence of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C infection decreased in Kyushu area: Trends of HCC incidence in western Japan.				submitted

Chiba T, Kamiya A, <u>Yokosuka O</u> , Iwama A.	Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective.	Cancer Lett	286(2)	145-153	2009
Maruyama H, Okugawa H, Kobayashi S, Yoshizumi H, <u>Yokosuka O</u> .	Pre-treatment hemodynamic features involved with long-term survival of cirrhotic patients after embolization of gastric fundal varices.	Eur J Radiol.	in press	in press	2009
Kanda T, Gauss-Müller V, Cordes S, Tamura R, Okitsu K, Shuang W, Nakamoto S, Fujiwara K, Imazeki F, <u>Yokosuka O</u> .	Hepatitis A virus (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein.	J Viral Hepat	in press	in press	2009
Okugawa H, Maruyama H, Kobayashi S, Yoshizumi H, Matsutani S, <u>Yokosuka O</u> .	Therapeutic effect of balloon-occluded retrograde transvenous obliteration for gastric varices in relation to haemodynamics in the short gastric vein.	Br J Radiol.	82(983)	930-935	2009
Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, <u>Yokosuka O</u> .	Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development.	J Hepatol.	in press	in press	2009
Maruyama H, Takahashi M, Ishibashi H, Okabe S, Yoshikawa M, <u>Yokosuka O</u>	Changes in tumor vascularity precede microbubble contrast accumulation deficit in the process of dedifferentiation of hepatocellular carcinoma.	Eur J Radiol.	in press	in press	2009
Yonemitsu Y, Imazeki F, Chiba T, Fukai K, Nagai Y, Miyagi S, Arai M, Aoki R, Miyazaki M, Nakatani Y, Iwama A, <u>Yokosuka O</u> .	Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma.	Hum Pathol	40(9)	1304-1311	2009
Maruyama H, Ishihara T, Ishii H, Tsuyuguchi T, Yoshikawa M, Matsutani S, <u>Yokosuka O</u> .	Blood flow parameters in the short gastric vein and splenic vein on Doppler ultrasound reflect gastric variceal bleeding.	Eur J Radiol.	in press	in press	2009

Fujiwara K, Kojima H, Yonemitsu Y, Yasui S, Imazeki F, Miki M, Suzuki K, Sakaida I, Okita K, Tanaka E, Omata M, <u>Yokosuka O.</u>	Phylogenetic analysis of hepatitis A virus in sera from patients with hepatitis A of various severities.	Liver Int.	29(6)	838-845	2009
Maruyama H, Takahashi M, Ishibashi H, Okugawa H, Okabe S, Yoshikawa M, <u>Yokosuka O.</u>	Ultrasound-guided treatments under low acoustic power contrast harmonic imaging for hepatocellular carcinomas undetected by B-mode ultrasonography.	Liver Int.	29(5)	708-714	2009
Nakamoto S, Kanda T, Yonemitsu Y, Arai M, Fujiwara K, Fukai K, Kanai F, Imazeki F, <u>Yokosuka O.</u>	Quantification of hepatitis C amino acid substitutions 70 and 91 in the core coding region by real-time amplification refractory mutation system reverse transcription-polymerase chain reaction.	Scand J Gastroenterol	44(7)	872-877	2009
Yutani S, Komatsu N, Shichijo S, Yoshida K, Takedatsu H, Itou M, Kuromatsu R, Ide T, Tanaka M, Sata M, Yamada A, <u>Itoh K.</u>	Phase I clinical study of a peptide vaccination for hepatitis C virus-infected patients with different human leukocyte antigen-class I-A alleles.	Cancer Sci.	100(10)	1935-1942	2009
Niu Y, Komatsu N, Komohara Y, Matsueda S, Yutani S, Ishihara Y, Itou M, Yamada A, <u>Itoh K.</u> , Shichijo S.	A peptide derived from hepatitis C virus (HCV) core protein inducing cellular responses in patients with HCV with various HLA class IA alleles.	J Med Virol.	81(7)	1232-1240	2009