

- (8) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology*. 2008;134:1396-405.
- (9) Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. *J Hepatol*. 2008;48:736-42.
- (10) Kurosaki M, Izumi N. External validation of FIB-4: diagnostic accuracy is limited in elderly populations. *Hepatology*. 2008 Jan;47 :352.
- (11) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M. Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan. *Hepatol Res* 2009.
- (12) Okanoue T, Itoh Y, Minami M, Hashimoto H, Yasui K, Yotsuyanagi H, Takehara T, Kumada T, Tanaka E, Nishiguchi S, Izumi N, Sata M, Onji M, Yamada G, Okita K, Kumada H. Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum aminotransferase based on platelet counts. *Hepatol res* 2008;38:27-36.
- (13) Asahina Y, Nakanishi H, Izumi N. laparoscopic radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Dig Endosc* 2009;21:67-72.
- Oze I, Matsuo K, Suzuki T, Kawase T, Watanabe M, Hiraki A, Ito H, Hosono S, Ozawa T, Hatooka S, Yatabe Y, Hasegawa Y, Shinoda M, Kiura K, Tajima K, Tanimoto M, Tanaka H. Impact of Multiple Alcohol Dehydrogenase Gene Polymorphisms on Risk of Upper Aerodigestive Tract Cancer in a Japanese Population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(11):3097-3102.
- Matsuo K, Tajima K, Suzuki T, kawase T, Watanabe M, Shitara K, Misawa K, Ito S, Sawaki A, Muro K, Nakamura T, Yamao K, Yamamura Y, Hamajima N, Hiraki A, Tanaka H. Association of prostate stem cell antigen gene polymorphisms with the risk of stomach cancer in Japanese.. *Int J Cancer*. 2009; 125(8):1961-4.
- Kawase T, Matsuo K, Suzuki T, Hiraki A, Watanabe M, wata H, Tanaka H, Tajima K. FGFR2 intronic polymorphisms interact with reproductive risk factors of breast cancer:Results of a case control study in Japan.. *Int J Cancer*. 2009; 125(8):1946-52.
- Kidokoro K, Ino K, Hirose K, Kajiyama H, Hosono S, Suzuki T, Kawase T, Hiraki A, Hamajima N, Tanaka H, Tajima K, Kikkawa F, Matsuo K.. Association between CYP19A1 polymorphisms and sex hormones in postmenopausal Japanese women.. *J Hum Genet*. 2009; 54:78-85.

Kanda J, Matsuo K, Suzuki T, Kawase T, Hiraki A, Watanabe M, Mizuno N, Sawaki A, Yamao K, Tajima K, Tanaka H. Impact of alcohol consumption with polymorphisms in alcohol-metabolizing enzymes on pancreatic cancer risk in Japanese. *Cancer Sci*. 2009; 100(2):296-302.

田中英夫. 我が国における肝細胞癌の疫学動向. *日本臨牀*. 2009; 67 (supl.3):263-267

Seronello S, Ito C, Wakita T, Choi J. Ethanol enhances hepatitis C virus replication through lipid metabolism and elevated NADH/NAD⁺. *J Biol Chem*. 2009 Nov 12. [Epub ahead of print]

Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol*. 2009 Dec;51(6):1046-54.

Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T. Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol*. 2009 Dec;47(12):4141-3.

Angus AG, Dalrymple D, Boulant S, McGivern DR, Clayton RF, Scott MJ, Adair R, Graham S, Owsianka AM, Targett-Adams P, Li K, Wakita T, McLauchlan J, Lemon SM, Patel AH. The requirement of cellular DDX3 for Hepatitis C Virus replication is unrelated to its interaction with the viral core protein. *J Gen Virol*. 2009 Sep30. [Epub ahead of print]

Abe KI, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol*. 2009 Sep 25. [Epub ahead of print]

Oka T, Yokoyama M, Katayama K, Tsunemitsu H, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Motomura K, Mori H, Nakamura H, Wakita T, Takeda N, Sato H. Structural and biological constraints on diversity of regions immediately upstream of cleavage sites in calicivirus precursor proteins. *Virology*. 2009 Nov 10;394(1):119-29.

Kato N, Mori K, Abe KI, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Res*. 2009 Dec;146(1-2):41-50.

Tanida I, Fukasawa M, Ueno T, Kominami E, Wakita T, Hanada K. Knockdown of autophagy-related gene decreases the production of infectious hepatitis C virus particles. *Autophagy*. 2009 Oct;5(7):937-45.

Kiyohara T, Ouchi Y, Hasegawa Y, Sato T, Yoneyama T, Ishii K, Ito T, Wakita T. An in-house-anti-hepatitis A virus (HAV)-specific immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay: evaluation and application to an HAV outbreak. *J Med Virol*. 2009 Sep;81(9):1513-6.

Kiyohara T, Totsuka A, Yoneyama T, Ishii K, Ito T, Wakita T. Characterization of anti-idiotypic

antibodies mimicking antibody- and receptor-binding sites on hepatitis A virus. *Arch Virol.* 2009;154(8):1263-9.

Oka T, Miyashita K, Katayama K, Wakita T, Takeda N. Distinct genotype and antigenicity among genogroup II sapoviruses. *Microbiol Immunol.* 2009 Jul;53(7):417-20.

Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res.* 2009 Aug;83(2):112-7.

Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med.* 2009 Jul;15(7):794-7.

Arita M, Wakita T, Shimizu H. Cellular kinase inhibitors that suppress enterovirus replication have a conserved target in viral protein 3A similar to that of enviroxime. *J Gen Virol.* 2009 Aug;90(Pt 8):1869-79.

Harada S, Okada M, Yahiro S, Nishimura K, Matsuo S, Miyasaka J, Nakashima R, Shimada Y, Ueno T, Ikezawa S, Shinozaki K, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Surveillance of pathogens in outpatients with gastroenteritis and characterization of sapovirus strains between 2002 and 2007 in Kumamoto Prefecture, Japan. *J Med Virol.* 2009 Jun;81(6):1117-27.

Kang JI, Kim JP, Wakita T, Ahn BY. Cell culture-adaptive mutations in the NS5B gene of hepatitis C virus with delayed replication and reduced cytotoxicity. *Virus Res.* 2009 Sep;144(1-2):107-16.

Yoshida T, Kasuo S, Azegami Y, Uchiyama Y, Satsumabayashi K, Shiraishi T, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Characterization of sapoviruses detected in gastroenteritis outbreaks and identification of asymptomatic adults with high viral load. *J Clin Virol.* 2009 May;45(1):67-71.

Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch Virol.* 2009;154(5):801-10.

Weng L, Du J, Zhou J, Ding J, Wakita T, Kohara M, Toyoda T. Modification of hepatitis C virus 1b RNA polymerase to make a highly active JFH1-type polymerase by mutation of the thumb domain. *Arch Virol.* 2009;154(5):765-73.

Iwakiri A, Ganmyo H, Yamamoto S, Otao K, Mikasa M, Kizoe S, Katayama K, Wakita T, Takeda N, Oka T. Quantitative analysis of fecal sapovirus shedding: identification of nucleotide substitutions in the capsid protein during prolonged excretion. *Arch Virol.* 2009;154(4):689-93.

Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J Virol.* 2009 May;

83(10):5137-47.

Shimoji T, Murakami K, Sugiyama Y, Matsuda M, Inubushi S, Nasu J, Shirakura M, Suzuki T, Wakita T, Kishino T, Hotta H, Miyamura T, Shoji I. Identification of annexin A1 as a novel substrate for E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem.* 2009 Apr 15;106(6):1123-35.

Park CY, Jun HJ, Wakita T, Cheong JH, Hwang SB. Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway. *J Biol Chem.* 2009 Apr 3;284(14):9237-46.

Komatsu H, Nojiri H, Sogo T, Inui A, Sawa F, Fujisawa T. Sacroiliitis infected with group A streptococcus in a child presenting with confusion and combativeness. *J Infect Chemother.* 2009 Oct;15(5):328-30.

Aomatsu T, Komatsu H, Yoden A, Hosomi A, Miyazaki H, Sogo T, Inui A, Fujisawa T, Tamai H. Fulminant hepatitis B and acute hepatitis B due to intrafamilial transmission of HBV after chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma in an HBV carrier. *Eur J Pediatr.* 2009 May 24. [Epub ahead of print]

Sogo T, Nagasaka H, Komatsu H, Inui A, Miida T, Callea F, Francalanci P, Hirano K, Kitamura H, Yorifuji T, Fujisawa T. Fibrinogen storage disease caused by Aguadilla mutation presenting with hypobeta-lipoproteinemia and considerable liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009 Jul;49(1):133-6

Komatsu H, Inui A, Sogo T, Hiejima E, Kudo N, Fujisawa T. Source of transmission in children with chronic hepatitis B infection after the implementation of a strategy for prevention in those at high risk. *Hepatol Res.* 2009 Jun;39(6):569-76.

Abe K, Thung SN, Wu HC, Tran TT, Le Hoang P, Truong KD, Inui A, Jang JJ, Su IJ. Pre-S2 deletion mutants of hepatitis B virus could have an important role in hepatocarcinogenesis in Asian children. *Cancer Sci.* 2009 Aug 6. [Epub ahead of print]

Seroepidemiological Survey of Cytomegalovirus Infection among Pregnant Women in Nagasaki, Japan. Tagawa M, Minematsu T, Masuzaki H, Ishimaru T, Moriuchi H. *Pediatr Int.* 2009 Nov 16. [Epub ahead of print]

Multiple immune abnormalities in a patient with idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia. Yamada Y, Okada M, Kamitamari A, Moriuchi H, Yanai M, Hano O, Tsukasaki K, Tsuruda K, Hasegawa H, Yanagihara K, Kamihira S. *Intern Med.* 2009;48(22):1967-71.

Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection at a school for the deaf by using preserved dried umbilical cord. Tagawa M, Tanaka H, Moriuchi M, Moriuchi H. *J Pediatr.* 2009 Nov;155(5):749-51.

Differential T-cell response in a young child and neonates with toxic shock syndrome. Dateki S, Kumamoto T, Takayanagi T, Ohki T, Takahashi N, Moriuchi H. *Pediatr Int.* 2009

Feb;51(1):155-6.

Probable Noonan syndrome in a boy without PTPN11 mutation, manifesting unusual complications. Sumi M, Ohno Y, Sasaki R, Kondoh T, Tagawa M, Masuzaki H, Moriuchi H. *Pediatr Int*. 2009 Feb;51(1):138-40.

Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. Kuniba H, Yoshiura K, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N. *J Hum Genet*. 2009 May;54(5):304-9.

The calming effect of a maternal breast milk odor on the human newborn infant. Nishitani S, Miyamura T, Tagawa M, Sumi M, Takase R, Doi H, Moriuchi H, Shinohara K. *Neurosci Res*. 2009 Jan;63(1):66-71.

Prenatal diagnosis of Costello syndrome using 3D ultrasonography amniocentesis confirmation of the rare HRAS mutation G12D. Kuniba H, Pooh RK, Sasaki K, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Egashira M, Moriuchi H, Yoshiura K, Niikawa N. *Am J Med Genet A*. 2009 Feb 15;149A(4):785-7.

Ohto H, Ishii T, Kitazawa J, Sugiyama S, Ujiie N, Fujimori K, Ariga H, Satoh T, Nollet KE, Okamoto H, Hoshi T. Declining hepatitis C virus (HCV) prevalence in pregnant women: impact of anti-HCV screening of donated blood. *Transfusion*. 2009 Nov 13.

H Go, K Hashimoto, T Imamura. An extremely low body weight infant born from a mother with measles. *J.Perinatol*. 2009 In Printing.

Imamura T, Honda Y, Ariga H, Ishii T, Miura S, Ohto H. Second Japanese case of neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-human platelet antigen-5a. *Pediatr Int*. 2009; 51(4): 585-7.

Kawasaki Y, Aoyagi Y, Abe Y, Go H, Imamura T. Serum KL-6 levels as a biomarker of lung injury in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Med Virol*. 2009; 81(12): 2104-8.

Kawasaki Y, Suyama K, Go H, Imamura T. Accumulation of macrophages expressing myeloid-related protein 8 associated with the progression of sclerotic changes in children with IgA nephropathy. *Tohoku J Exp Med*. 2009; 218(1): 49-55

平成21年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復（抗線維化）療法の開発研究

課題番号：H21-肝炎-一般-014

研究代表者：坂井田 功

I. 研究の意義

生体肝移植に代わる次世代の肝再生療法の開発は、肝硬変症患者の救命のために早急に行う必要がある。そこで平成15年11月より、山口大学大学院医学系研究科消化器病態内科学、山口大学医学部附属病院再生細胞療法センターでは適応基準を満たす非代償性肝硬変症患者に対して、Phase I臨床研究『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法〔自己骨髄細胞の投与療法、Autologous Bone Marrow Cell Infusion therapy (ABM/療法)〕』を推進してきた。この日本で開発されたABM/療法をいち早く多くの肝硬変症患者に提供することは急務である。一方、肝臓は、肝細胞のみならず、胆管細胞、星細胞、血管内皮細胞やKupffer細胞から構成されている。そこで効率的に肝硬変症を再生・修復させるためには、患者に投与した自己骨髄ないし脂肪細胞との複雑な細胞間相互作用を解明する必要がある。この目的達成のために新たにAll Japanの研究開発チームを組織し、独自の骨髄および脂肪由来細胞の分離培養技術を基盤にした肝硬変症に対する有効分画細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復（抗線維化）療法を開発する。

II. 研究の目的、期待される成果

1. 肝再生・修復に有用な骨髄および脂肪由来細胞分画の分離培養法の開発
 - ・骨髄細胞および脂肪細胞中の肝再生・修復に有効な細胞分画の同定
 - ・有効な細胞分画の培養法の開発
臨床応用のためGMPグレードに準拠した細胞培養培地による培養方法を開発する。
 - ・有効な細胞分画の安全性評価試験
有効な細胞分画をSCIDマウスへ投与しその安全性を検証する。
2. 肝再生・修復（抗線維化）のメカニズム解明
 - ・分離肝臓構成細胞と骨髄および脂肪由来細胞との相互作用の解析
 - ・投与骨髄および脂肪由来細胞の抗肝線維化メカニズムの解明
細胞外マトリックス関連酵素、その制御因子、細胞外シグナル分子と受容体や転写因子を解析する。
3. ABM/療法臨床研究の推進
ABM/療法を推進し、次世代治療開発のための臨床試験プロトコール準備を行う。
以上により、新しい実験技術の開発、さらには次世代型肝臓再生・修復（抗線維化）療法の開発へとつながる。

III. 1年間の研究成果

研究代表者：坂井田 功、分担研究者：寺井 崇二（山口大学医学部）

1. 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法（ABM/療法）の先進医療への申請
 2. 山形大学医学部とABM/療法を共同臨床研究として実施
 3. マウス骨髄由来肝再生・修復細胞の培養法の開発、肝硬変症マウスでの細胞機能評価試験の実施
マウス骨髄由来細胞の培養は困難であったが、High density法により無血清培養が可能となった。肝硬変マウス投与実験により抗線維化作用を有することが確認された。
 4. ヒト細胞用GMPグレード無血清培地の開発を開始
ヒト用GMPグレード無血清培地に関してLife Technologies社（アメリカFrederick）でミーティングを行い、今後の共同研究推進を決定した。
- 研究分担者：宮島 篤（東京大学分子細胞生物学研究所）

1. 自己骨髄細胞投与マウス肝の解析

肝硬変マウスへのGFP陽性骨髄細胞投与後2週間目にコラゲナーゼ灌流により肝臓構

成細胞を分散し FACS 法で解析した。結果、GFP 陽性細胞を検出したが、細胞数が十分得られなかったため、投与骨髄細胞数を増やすなどして、詳細な解析を行なっている。

2. 抗線維化作用に関わる因子の解析

線維化が進行した肝臓、骨髄細胞投与により改善した肝臓、正常肝臓の各構成細胞種の性状や遺伝子発現の比較を行うことは、抗線維化作用に関わる因子を明らかにするうえで重要である。線維化肝臓と正常肝臓から EpCAM 抗体を用いて細胞を調製し、マイクロアレイ解析により変動遺伝子を複数同定した。通常、線維化した肝臓から活性化星細胞を単離することは困難であるが、p75NTR 抗体を用いて単離することに成功した。

3. HTVi 法の開発

線維化前後における移植細胞や肝臓構成細胞の性状解析、遺伝子発現解析により得られた因子のうち、線維化改善に寄与する可能性のある因子を評価するため、肝臓で簡便に候補遺伝子を発現させる系 (HTVi 法) を立ち上げた。

研究分担者：河田 純男、齋藤 貴史 (山形大学医学部)

1. アルコール性肝硬変症 3 例に対する自己骨髄細胞投与療法 (ABM / 療法) の実施

本年度にアルコール性肝硬変症 3 例を対象として、山形大学医学部附属病院において山口大学チームと ABM / 療法を成功裡に施行した。

2. ABM / 療法により得られた患者骨髄由来細胞の無血清培地による培養条件の検討

ヒト骨髄由来細胞の無血清培地培養法に関して、培養皿コーティング剤が必要であることが明らかとなった。

3. ヒト急性肝障害臨床例における Stem cell factor (SCF) ならびに Fibroblast growth factor 2 (bFGF) の動態検討

SCF および bFGF が劇症肝炎患者では急性肝炎患者に比し有意に低値であることを見出した。また、ラット上皮性肝様幹細胞を用いた *in vitro* 実験で、SCF がその増殖に、bFGF がその肝様細胞への分化に関わっていることを見出した。

研究分担者：仁科 博史、研究協力者：小川 佳宏 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)

1. 質量顕微鏡による再生肝臓におけるトリグリセリド (TG) の変動解析

質量顕微鏡という新しい手法を用いて、再生肝臓における TG の変動を可視化することに成功した。結果、側鎖の異なる TG のほとんどが増加することが明らかになった。

2. 肝低形成変異体メダカの解析

新たなヒト肝疾患モデル生物としてメダカ肝低形成変異体の解析を行い、前腸から肝臓が形成される分子メカニズムの一端を解明した。

3. 新規 NASH マウスモデルの開発

高脂肪食負荷により 4 型メラノコルチン受容体を欠損するマウス (MC4R KO マウス) が肥満や糖脂質代謝異常とともに NASH 様病変を示すことを明らかにした。本モデルは NASH の分子機構の解明や治療法の効果判定に有用であることが示唆された。

研究分担者：梅村 武司 (信州大学医学部)

1. ヒト骨髄細胞中の肝炎ウイルス検出法開発のための基礎的検討

B または C 型慢性肝炎患者の骨髄細胞への肝炎ウイルス感染有無を解析するため、本年度は末梢血単核球中の C 型肝炎ウイルスを検出するリアルタイム PCR 法を開発した。

研究分担者：大河内 仁志 (国立国際医療センター)

1. 皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞の肝硬変改善効果の検証

マウス肝硬変モデルにマウス皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞を 150 万個/匹、尾静脈から投与した。細胞投与 4 週間後では総ビリルビン値は有意に低下したが、線維化の有意な改善は認めなかった。培養した脂肪由来間葉系幹細胞をマウス肝硬変モデルへ投与したところ細胞サイズが大きいため、50 万個の細胞投与でも投与直後に死亡した。ヘパリン同時投与により 100-150 万個の培養細胞を投与することができた。現在、肝硬変 SCID マウスにヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を投与し、その効果を検討している。

2. ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の肝臓細胞への分化法の開発

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞から約 2 週間で肝臓細胞へ分化させる培養法を開発した。

研究分担者：酒井 佳夫 (金沢大学)

1. ヒト脂肪組織由来間質細胞の肝硬変改善効果の検証

今年度、肝硬変患者 5 症例に自己脂肪組織由来間質細胞を経静脈的に投与した。分離は完全自動密閉式の脂肪組織由来間質細胞分離装置 (Celution System) を用いた。細胞投与による明らかな合併症は認めず、3 例においてプロトロンビン時間の改善を認めた。また、分離した脂肪組織由来間質細胞の培養を行い、用手的酵素処理法により分離した細胞と同等の、間葉系幹細胞の形態を呈する細胞を多数確認した。

IV. 22-23 年度の課題

(坂井田、寺井) ABM/療法について申請中である先進医療の認可を取得する。マウス基礎実験では Life Technologies 社の完全無血清培地システムによる骨髄由来肝臓再生・修復細胞の無血清培養法を確立し、ヒト骨髄由来細胞の培養法も同様に検討する。

(宮島) 生着 GFP 陽性細胞の性状を FACS 解析から明らかにし、網羅的遺伝子発現解析を行う。線維化肝臓の p75NTR 陽性細胞に加え、細胞投与で線維化が改善した肝臓および正常肝臓からも p75NTR 陽性細胞を回収し比較し、活性化肝星細胞への作用メカニズムを解明する。また、既にマイクロアレイ法で抽出した候補遺伝子の線維化への影響を HTVi 法により検証する。またハイコンテツアナリシスにより抗線維化作用を数値化し、線維化改善に関わる細胞種および因子の絞り込みを加速させる。

(河田、齋藤) 1. アルコール性肝硬変症に対する ABM/療法の有効性についてまとめる。山形大学医学部での合計 6 例のアルコール性肝硬変症に対する ABM/施行例について、山口大学に準じ解析し論文発表する。2. アルコール性肝硬変症に対する ABM/療法のコントロールスタディを行うため、実施計画を作成し、実施症例数の増加を図る。3. 臨床応用を目指して、ヒト骨髄由来細胞の無血清培地培養法の検討を進める。

(仁科) 質量顕微鏡を用いて、モデル生物 (マウスやメダカ) さらに肝疾患の患者からのサンプルを解析し、病態と関連する脂質の同定を行い、新たな分子マーカーの単離を試みる。

(小川) MC4R KO マウスと代表的な遺伝性肥満 *ob/ob* マウスの肝病変を比較し、MC4R KO マウスの NASH 様病変発症機構を検討する。クロドロネート含有リポソームにより MC4R KO マウスのクッパー細胞を消去することで NASH における病態生理的意義を検討する。

(梅村) ABM/療法で投与したヒト骨髄細胞中の B あるいは C 型ウイルス感染有無を開発したリアルタイム PCR 法で検討する。

(大河内) マウス肝硬変モデルにおいて、1. 投与脂肪組織由来間葉系幹細胞数を増やす、2. 脂肪組織由来間葉系幹細胞投与回数を増やす、3. 静注ではなく脾臓からの脂肪組織由来間葉系幹細胞投与を検討、4. HGF などのサイトカイン処理後に脂肪組織由来間葉系幹細胞を投与することで効果があるか、を検討する。

(酒井) ヒト自己脂肪組織由来間質細胞投与による肝硬変に対する安全性を評価し、その確認後に奏功性の検討を行う。また、ヒト脂肪組織由来間質細胞の肝分化能を含めた肝再生能の検討を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) ヒト肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の先進医療
- (2) 安全なヒト初代骨髄および脂肪由来細胞の GMP に準拠した培養方法の確立

VI. 本研究の成果 (発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

1: Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, Tsujimura T, Nakamura K, and Miyajima A., Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse livers. *Development* 136(11):1951-60. 2009.

2: Terai S, Sakaida I., Currents Status and Prospects of Autologous Bone Marrow Cell Infusion Therapy for Liver Cirrhosis Patients. *Bulletin Yamaguchi*. 2009. in press.

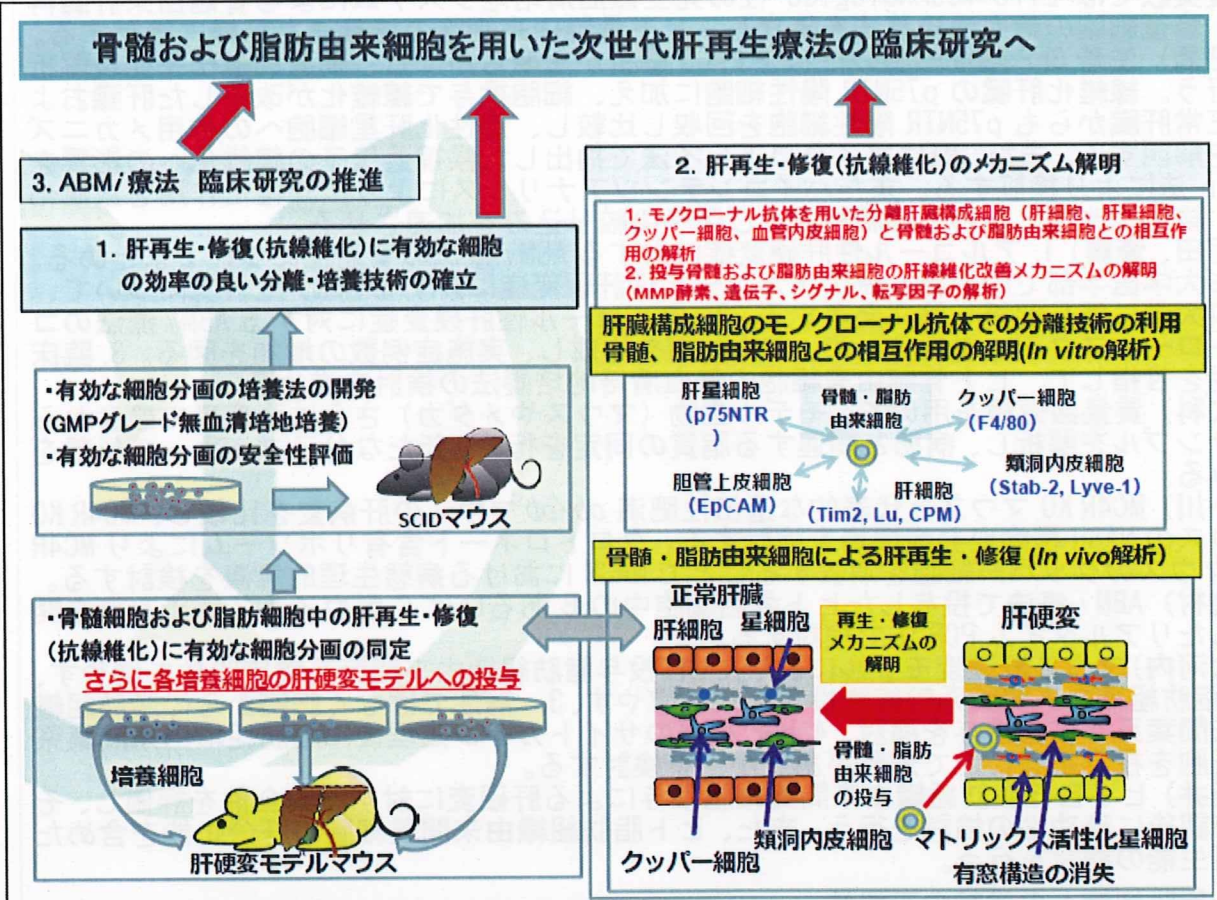
3: Terai S. Fish model leads to new findings in liver disease. *Hepatology Research*. 2009. in press.

4: Ohata S, Nawa M, Kasama T, Yamasaki T, Sawanoboria K, Hata S, Nakamura T, Asaoka Y, Watanabe T, Okamoto H, Hara T, Terai S, Sakaida I, Katada T, and Nishina H., Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 817-823. 2009.

5: Hattori E, Shu HJ, Saito T, Okumoto K, Haga H, Yokozawa J, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S., Expression of the RNA-binding protein Musashi1 in adult liver stem-like cells. *Hepatology Research*. 2009. in press.

6: Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, chio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, and Ogawa Y., Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated fatty acid/Toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ.Res.* 105:25-32, 2009.

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等



	平成21年度 (1年目)	平成22年度 (2年目)	平成23年度 (3年目)
1. 肝再生・修復(抗線維化)に有用な骨髄および脂肪由来細胞分画の分離培養法開発	→ 実施済み	→ 計画	
骨髄細胞および脂肪細胞中の肝再生・修復に有効な細胞分画の同定	・自己骨髄細胞投与マウス肝の解析 ・マウス骨髄または脂肪由来培養細胞機能評価	・自己骨髄細胞投与マウス肝のFACS解析、マイクロアレイ解析 ・脂肪由来細胞のヒトおよびマウス肝硬変への投与	・有効な細胞分画の細胞同定と細胞キャラクター評価
有効な細胞分画の培養法の開発	・マウス骨髄由来培養細胞High density法培養 ・ヒト骨髄細胞培養	・Life Technology無血清培地システム(ヒトおよびマウス細胞)	・ヒト骨髄あるいは脂肪をつかった実証
有効な細胞分画の安全性評価試験		・SCIDマウス投与実験	・SCIDマウス投与実験、染色体異型評価
2. 肝再生・修復(抗線維化)のメカニズム解明			
分離肝臓構成細胞と骨髄および脂肪由来細胞との相互作用の解析	・p75NTR抗体陽性細胞分離	・モノクローナル抗体による各種肝臓構成細胞分離との培養 ・p75NTR抗体陽性細胞評価	・モノクローナル抗体による各種肝臓構成細胞分離との培養
投与骨髄および脂肪由来細胞の抗肝線維化メカニズムの解明	・自己骨髄細胞投与マウス肝マイクロアレイ解析、遺伝子抽出 ・HTVi法開発	・自己骨髄細胞投与マウス肝マイクロアレイ解析、HTVi法 ・MC4R KOマウス、肝低形成メダカ、質量顕微鏡	・HTVi法 ・MC4R KOマウス、肝低形成メダカ、質量顕微鏡
3. ABM/療法臨床研究推進			
	・先進医療申請 ・山形大学で実施 ・リアルタイムPCR法	・先進医療認可予定 ・ABM/療法症例蓄積 ・CPC, GMPノウハウ蓄積 ・骨髄細胞の肝炎ウイルス検証	・ABM/療法症例蓄積 ・CPC, GMPノウハウ蓄積 ・次世代型肝再生修復療法臨床試験プロトコル準備

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和62年4月から平成元年3月にかけて、アメリカ・Thomas-Jefferson 大学(John Farber 教授)にて肝細胞死におけるシグナル伝達・ラジカル研究に従事した。帰国後は、山口大学医学部にて肝線維化・肝硬変症・肝不全の制御機構の基礎研究、臨床研究を行ってきた。平成17年8月1日より山口大学教授として、骨髄細胞投与による肝線維化改善の現象のメカニズムを基礎、臨床の両面で解析している。また国際的には、アメリカ Duke 大学、イギリス Imperial College の客員教授として国際的に共同研究を行っている。

(所属学会) 日本肝臓学会認定指導医・日本消化器病学会指導医・日本内視鏡学会指導医・日本内科学会指導医・日本臨床腫瘍学会暫定指導医

(学会並びに社会における活動) 日本肝臓学会(評議員)、日本消化器病学会(評議員)、日本内視鏡学会(評議員)、日本内科学会(評議員)、日本病態栄養学会(評議員)、Duke 大学客員教授(米国)、Imperial College of London 客員教授(英国)、日印(インド)再生医療センターアドバイザー、新エネルギー産業技術総合開発機構 NEDO 技術委員

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

Scott L. Friedman (Mt. Sinai Hospital)

Mark A Zern (UD Davis USA)

Strom SC (University of Pittsburgh, USA)

Nagy Habib (Imperial College of London UK)

Han KH (Yonsei University, Korea)

・主な研究課題

肝線維化・肝硬変症・肝不全の制御機構の基礎研究および臨床研究

・これまでの研究実績

1: Terai S, Sakaida I. Current status of autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *Hepatology Res.* 2008 Nov;38, S72-S75.

2: Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Sep;23(9):1349-53. Epub 2008 Apr 19. Review.

3: Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells.* 2006 Oct;24(10):2292-8.

4: Sakaida I. Clinical application of bone marrow cell transplantation for liver diseases. *J Gastroenterol.* 2006 Jan;41(1):93-4.

5: Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol.* 2005 Dec;38(4):197-202. Review.

6: Terai S, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Lesson from the GFP/CCl4 model-translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2005;12(3):203-7.

7: Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology.* 2004 Dec;40(6):1304-11.

平成21年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝がんの新規治療法に関する研究課題番号：H21-肝炎-一般-015研究代表者：本多 政夫**I. 研究の意義**

- (1) 肝がんはウイルス性慢性肝炎の病態のひとつであり、我が国の肝がんによる年間の死亡数は3万人を超えている。
- (2) 分子標的薬ソラフェニブが進行肝がんではじめて使用され、非環式レチノイドや多くの新規分子標的薬、抗がん剤が国内第Ⅲ相臨床試験に至るに及び、肝がんの治療法が大きく変わろうとしている。これらの新規抗がん剤の治療効果と副作用の見極めが急務である。
- (3) これらの薬剤だけで肝がんを治癒することは困難であり新規治療法に関する研究を行う。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 我が国におけるソラフェニブの治療成績を明らかにし、懸念される副作用の現状を調査する。現行の肝動注化学療法との効果を比較する事により、適切な治療法の選択を可能にする。
- (2) ソラフェニブをはじめとする分子標的薬は、治療効果の有無をバイオマーカーを用いて判別できる可能性がある。有効なバイオマーカーの検索を行う。
- (3) がん幹細胞治療、免疫療法といった新規の治療法を開発する。
- (4) 肝がんは肝炎ウイルス感染症の終末像であり、肝がんを治癒あるいは制御することによって患者が通常の社会生活をおくることができ、社会への貢献も大きい。

III. 1年間の研究成果

・主任研究者 (本多政夫)

- (1) 全体研究として「進行肝細胞癌に対するソラフェニブと肝動注化学療法の有効性に関する多施設共同試験」Efficacy of IHAC vs. Sorafenib on advanced Hepatocellular carcinoma (ISHCC trial)を計画し、各施設における倫理委員会の承認を得て、症例の蓄積を開始した。
- (2) 肝特異的血小板由来増殖因子(PDGF-C)過剰発現マウスでは肝の線維化・脂肪化に引き続き肝細胞癌を発症する。非環式レチノイドはPDGF-C-Tgの肝の線維化を著名に抑制した。

・分担研究者(金子周一)

- (1) 肝幹細胞マーカーであるEpCAMとAFPを用いた新たな肝細胞癌分類システムを構築した。
- (2) EpCAM陽性癌幹細胞では5-FU耐性に関連するdUTPaseが高発現することを見出した。

・分担研究者(中本安成)

- (1) ペプチドまたは OK-432 によって調製された樹状細胞と TACE を併用した抗腫瘍免疫療法の安全性を検討した。
- ・分担研究者(古瀬純司)
- (1) 進行肝細胞がんに対するソラフェニブの臨床第 II 相試験：Child-Pugh B 患者における安全性と有効性の前向きな検討を開始した。
- ・分担研究者(上野義之)
- (1) 肝細胞癌に対する樹状細胞療法のための、肝硬変患者の血漿中アミノ酸濃度を基礎とした新規無血清培地の開発を行った。
- ・分担研究者(広石和正)
- (1) 腫瘍特異性 T 細胞応答と肝細胞癌治療後における肝癌再発までの期間を検討した。
- ・分担研究者(西口修平)
- (1) Hep3B 細胞を SCID マウス皮下に移植し、インターフェロン抗腫瘍効果を検討した。
- ・分担研究者(恩地森一)
- (1) 数種類の腫瘍抗原蛋白をパルスする肝細胞癌に対する樹状細胞免疫療法の開発を行った。
- ・分担研究者(工藤正俊)
- (1) 進行肝細胞癌に対するソラフェニブと低用量シスプラチン/フルオロウラシル肝動注療法の併用化学療法の第 I / II 相臨床試験を倫理委員会の承認を受けて開始した。
- ・分担研究者(汐田剛史)
- (1) 肝癌幹細胞に高発現する hTERT の発現調節を解析した。
- ・分担研究者(森脇久隆)
- (1) 非環式レチノイドと Trastuzumab や HDAC 阻害剤を併用し相乗的な細胞増殖抑制を認めた。
- ・分担研究者(横須賀收)
- (1) 「進行肝細胞癌患者を対象とした TS-1+ソラフェニブ併用療法の第 I 相試験」を倫理委員会の承認を受けて開始した。
- ・分担研究者(坂井田功)
- (1) 転写制御分子である Maid の役割をゼブラフィッシュ、ノックアウトマウスで解析した。
- ・分担研究者(山本和秀)
- (1) 糖鎖パターンの変化による、肝癌化学療法効果予測を可能とする前向き試験を開始した。
- ・分担研究者(池田健次)
- (1) 肝細胞癌患者における CellSearch システムを用いた血中循環癌細胞 (CTC) の検出を行った。
- ・分担研究者(林 紀夫)
- (1) α -GalCer により活性化した肝樹状細胞を用いたペプチドワクチンの結果、肝樹状細胞は強力な獲得免疫を誘導した。
- ・分担研究者(佐田通夫)
- (1) 高度進行肝細胞癌に対するリピオドール混和シスプラチンと 5-FU 併用動注化学療法を開始した

IV. 22～23年度の課題

- (1) ソラフェニブに関連した各種臨床試験を進め、治療効果、副作用について明らかにする。
- (2) 非環式レチノイド、インターフェロン及び抗がん剤の抗腫瘍効果の分子機序を明らかにし、併用療法の有効性を検討する。
- (3) 肝癌幹細胞関連分子の解析と樹状細胞を用いた免疫療法の開発を行う。
- (4) 分子標的薬や化学療法の治療効果を予測する分子マーカーを探索する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 進行肝癌に対する化学療法、分子標的薬の使用に関するガイドラインを作成する。
- (2) 肝がんは肝炎ウイルス感染症の終末像であり、肝がんを治癒あるいは制御することによってウイルス感染症がもたらす社会的問題を撲滅できる。患者が通常の社会生活をおくることができることから、社会への貢献も大きい。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

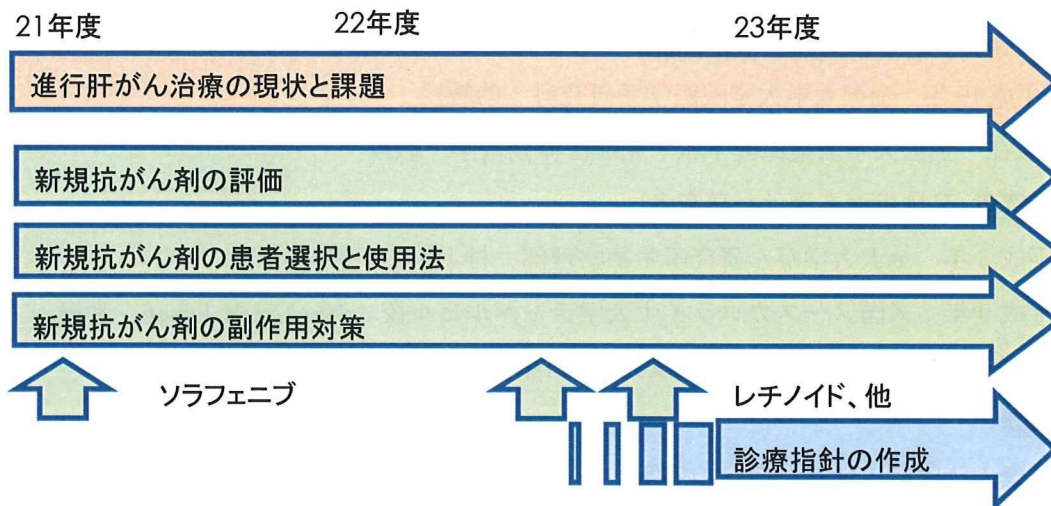
1. 研究代表者(本多政夫): Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1098-112.
2. 研究分担者(金子周一): T Yamashita, J Ji, A Budhu, M Forgues, W Yang, HY Wang, H Jia, Q Ye, LX Qin, E Wauthier, LM Reid, H Minato, M Honda, S Kaneko, ZY Tang, XW Wang. EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features. *Gastroenterology* 136(3):1012-1024, 2009.
3. 研究分担者(中本安成): Baba T, Nakamoto Y and 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.* 178: 574-583, 2009
4. 研究分担者(古瀬純司): Furuse J, Okusaka T, Ohkawa S, Nagase M, Funakoshi A, Boku N, Yamao K, Yamaguchi T, Sato T: A phase II study of uracil-tegafur plus doxorubicin and prognostic factors in patients with unresectable biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* *Cancer Chemother Pharmacol* 65(1):113-120, 2009
5. 研究分担者(上野義之): Kakazu E, Ueno Y, Kondo Y, Fukushima K, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Ninomiya M, Shimosegawa T. Branched chain amino acids enhance the maturation and function of myeloid dendritic cells ex vivo in patients with advanced cirrhosis. *Hepatology*. 2009 Dec;50(6):1936-45.
6. 研究分担者(広石和正): 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. Strong CD8+ T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free

- interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology* (in press), 2009.
7. 研究分担者(恩地森一): Uehara T, Hirooka M, Kisaka Y, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Usefulness of the hyperechoic rim for assessing the therapeutic efficacy of radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma patients. *Hepato Res* 2009; 39: 954-962.
 8. 研究分担者(工藤正俊): Okusaka T, Kasugai H, Shioyama Y, Yanaka K, Kudo M, Saisho H, Osaki Y, Sata M, Fujiyama S, Kumada T, Sato K, Yamamoto S, Hinotsu S, Sato T: Transarterial infusion chemotherapy alone versus transarterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma: Results of a multicenter randomized phase III trial. *J Hepatol* 2009 (in press).
 9. 研究分担者(森脇久隆): Role of acid sphingomyelinase of Kupffer cells in cholestatic liver injury in mice. Osawa Y, Seki E, Adachi M, Suetsugu A, Ito H, Moriwaki H, Seishima M, Nagaki M. *Hepatology*. 2009 in press.
 10. 研究分担者(山本和秀): Matsuo N, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Tanaka S, Nishina S, Nakanishi Y, Uemura M, Takaki A, Nakamura S, Kobayashi Y, Nouse K, Yagi T, Yamamoto K. Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2009 Jul 18;9:240.
 11. 研究分担者(池田健次): Kobayashi M, Ikeda K, Kawamura Y, Yatsuji H, Hosaka T, Sezaki H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Kumada H. High serum des-gamma-carboxy prothrombin level predicts poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2009;115:571-80.
 12. 研究分担者(林 紀夫): Akira Sasakawa, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara, Shinjiro Yamaguchi, Masashi Yamamoto, Kazuyoshi Ohkawa, Takuya Miyagi, Norio Hayashi. Activated liver dendritic cells generates strong acquired immunity in α -galactosylceramide treatment *Journal of Hepatology* 50: 1155-1162, 2009

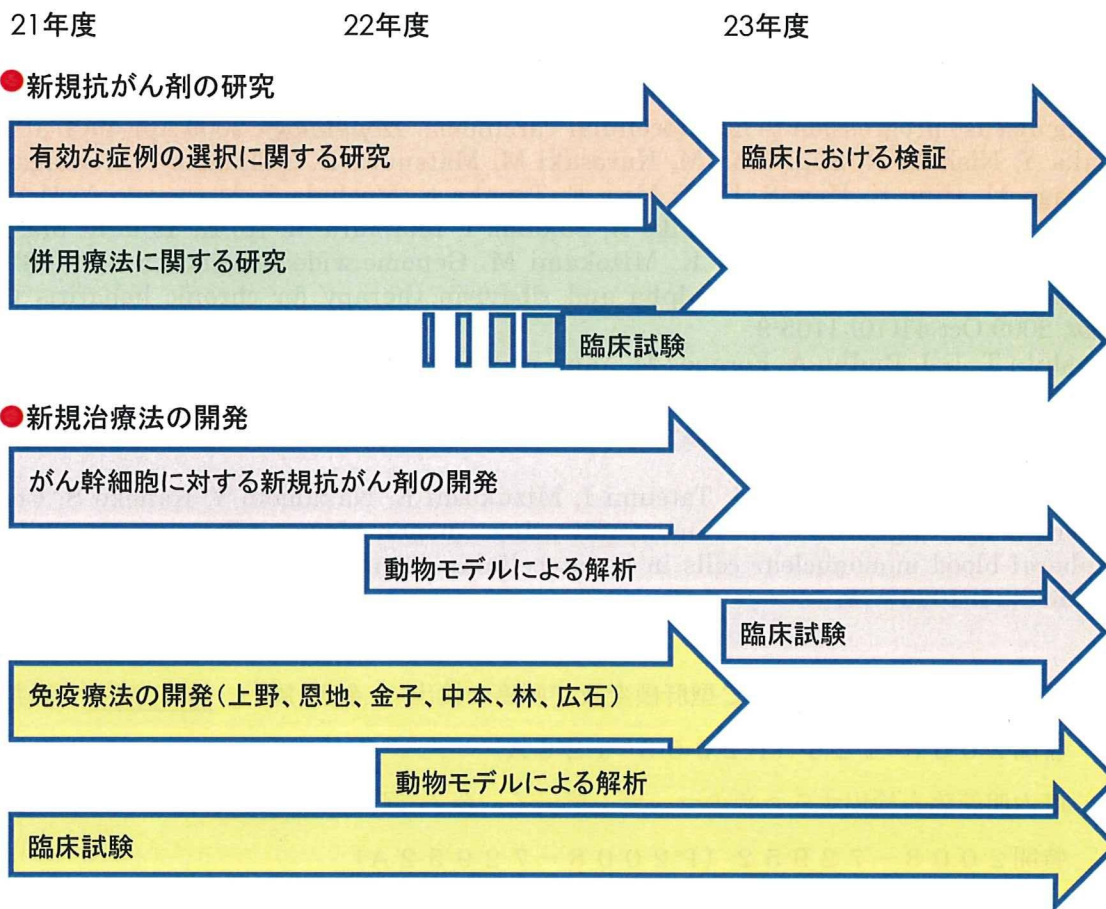
Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

全体研究(研究分担者全員)

● 新規抗がん剤の適正使用に関する研究



個別研究



○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

平成 2 年～平成 3 年 金沢大学がん研究所生物物理部
 平成 6 年～平成 9 年 米国ノースカロライナ大学チャペルヒル校
 平成 11 年 米国スタンフォード大学消化器・生化学部門短期留学
 (ウイルス肝炎財団海外派遣助成)
 平成 13 年～平成 19 年 金沢大学大学院医学系研究科 助教授
 平成 19 年～現在 金沢大学医薬保健学域・先端医療技術学 教授

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

平成 2 年～平成 3 年 金沢大学がん研究所生物物理部 村上清史 教授
 平成 6 年～平成 9 年 米国ノースカロライナ大学チャペルヒル校 Stanley M Lemon 教授
 平成 13 年～現在 金沢大学大学院医学系研究科 小林健一教授・金子周一教授

・主な研究課題

- ・慢性 C 型肝炎の治療抵抗性獲得機序の解明
- ・肝発癌の解析と、肝癌診断および治療に関する研究
- ・Genomics 技術を用いた肝臓病学、および血液を用いた診断学の研究

・これまでの研究実績

1. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1098-112
2. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1105-9.
3. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009 136(3):1012-24.
4. Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S. Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res*. 2008 Dec 15;68(24):10267-79.

- 特許 1. 遺伝子発現プロファイルによる C 型肝炎硬変及び肝癌の検出 金子周一 本多 政夫 酒井 佳夫
 特開 2008-126 (P2008-126A)
2. 肝内胆管癌を検出するためのマーカー遺伝子 金子周一 本多 政夫 山下 太郎 西野 隆平
 特開 2008-72952 (P2008-72952A)

平成 21 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：膜蛋白質発現系を利用したC型肝炎ウイルス感染受容体の生化学的・疫学的解析及び感染阻害剤の開発

課題番号：H21-肝炎-若手-016

研究代表者：阿部 康弘

I. 研究の意義

現在、世界には2億人、本邦には200万人のC型肝炎ウイルス(HCV)感染者がおり、世界では毎年300~400万人ずつ感染者が増加している。これまでに、HCV 排除活性を有するインターフェロン療法の進歩により、C型肝炎の奏効率は50%まで改善されているものの、重篤な副作用も報告されていること、耐性ウイルスの出現、高ウイルス量患者には効果が乏しいことから、HCV 感染阻害薬、感染受容体アンタゴニストの創出が急務となっている。周知のように、C型肝炎治療の基本戦略の第一は肝細胞中のHCVを排除すること、第二はHCVの新規感染を阻害することにある。しかしながら、HCV 感染受容体を intact な状態で精製するのが困難なこと、抗原性が低く細胞外領域に対する抗体の作製に成功した例が少ないことから、HCV 感染機構の生化学的解析は遅々として進展していない。本研究は、独自の基盤技術を駆使することで、HCV 感染受容体の生化学的解析を基に初めての HCV 感染阻害薬の創出を試みるものであり、独創性・優位性を兼ね備えたテーマである。

II. 研究の目的、期待される成果

本研究は、(1) 出芽バキュロウイルス(BV)膜蛋白質発現系を利用した感染受容体の生化学的解析によりC型肝炎ウイルス(HCV)感染機構を詳細評価し、(2) 独自のアンタゴニスト創出技術を活用して作製したHCV 感染受容体アンタゴニストを出発材料として、生体内安定性、阻害域を改変した感染阻害薬を創出することを目的とする。本研究成果は、患者のみならず医療従事者等のハイリスクグループに対して感染予防法を提供できること、肝細胞からのHCV排除活性を有するIFNとの併用によりC型肝炎の完治が期待されることから、国民の健康寿命の増進、完治に伴う医療費の削減に貢献し、本邦製薬業界に世界のメガファーマを凌駕する競争力を付与するものであり、多大な社会効果が期待される。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者(阿部康弘)

受容体発現出芽バキュロウイルス(BV)を用いたウイルス感染評価系の可否を検証するために、遺伝子導入技術として汎用されており、感染機構も解明されている5型アデノウイルス(Ad)を用いた解析を試み、以下の成果を得た。

(1) アデノウイルス感染受容体発現 BV の作製 : Bac-to-Bac Expression System を用いて、Ad の感染受容体 CAR をウイルス膜上に提示した CAR-BV の作製を試みた。ウエスタンブロッティングで確認した結果、CAR の発現が確認されたことから、CAR-BV を作製できたことが判明した。

(2) CAR-BV による Ad 感染阻害効果の解析 : 5 型 Ad はマウスメラノーマ細胞 B16 細胞には感染しない。そこで CAR 発現 B16 細胞 (阪大院薬水口裕之博士より供与) に対する 5 型 Ad ベクター (ルシフェラーゼ遺伝子を搭載) の遺伝子導入活性を指標に、CAR-BV の Ad 感染阻害効果を解析したところ、CAR-BV は添加濃度依存的に Ad ベクターの感染を抑制していた。以上の結果より、ウイルス感染受容体発現 BV はウイルスの感染評価系として有用であることが示された。

・研究分担者 (近藤昌夫)

HCV 感染受容体発現 BV を作製し、一部の受容体について感染阻害効果を解析し、以下の成果を得た。

(1) HCV 感染受容体発現 BV の作製 : Bac-to-Bac Expression System を用いて、HCV 感染受容体として同定されている CD81、CL-1、occludin、SR-BI を提示した BV の作製を試みた。ウエスタンブロッティングの結果、Occludin-BV、SR-BI-BV における Occludin、SR-BI の発現量は低いものの、4 種類全ての HCV 感染受容体の発現が確認され、CD81-BV、CL-1-BV、occludin-BV、SR-BI-BV を作製することに成功した。

(2) HCV 感染受容体群の解析 : CD81-BV、CL1-BV の HCV 感染阻害活性を HCVpp (ルシフェラーゼ発現により HCV 感染を評価可能) により解析したところ、CD81-BV および CL1-BV いずれの処理でも HCV 感染阻害活性は観察されなかった。

IV. 22～23 年度の課題

初年度の成果を踏まえ、残り 2 年間で、まず課題 1 : HCV 感染受容体発現 BV の作製 (複数の感染受容体発現 BV の作製を含む)、課題 2 : HCV 感染受容体群の解析を行い、HCV 感染に関与する受容体の生化学的解析を進める。その結果を踏まえ、課題 3 : HCV 感染受容体アンタゴニストの取得、課題 4 : 疫学調査を実施する予定である。

V. 行政施策への貢献の可能性

本研究成果は、患者のみならず医療従事者等のハイリスクグループに対して感染予防法を提供できること、肝細胞からの HCV 排除活性を有する IFN との併用により C 型肝炎の完治が期待されることから、国民の健康寿命の増進、完治に伴う医療費の削減に貢献し、厚生労働行政的観点からも多大な社会効果が期待される。

VI. 本研究の成果 (発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

・研究代表者 (阿部康弘)

本年度は下記を含め、22 報の論文を公表済みであり、国内学会 5 件 (共同研究者として 31 件)、国際学会 4 件 (共同研究者として 17 件) 発表している。

【論文発表】

1. **Abe Y.** : Development of novel DDS technologies for optimized protein therapy by creating functional mutant proteins with antagonistic activity., **Yakugaku Zasshi**,

129(8):933-939, 2009.

2. Nomura T[#], **Abe Y[#]** (**#equal contributor**), Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Taniai M, Ohta T, Tsunoda S, Tsutsumi Y. (2009) Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs. *Biochem Biophys Res Commun*, 30:388:667-71.
3. Kayamuro H[#], **Abe Y[#]** (**#equal contributor**), Yoshioka Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Hiroi T, Itoh N, Kawai Y, Kamada H, Nagano K, Tsunoda S, Tsutsumi Y (2009) The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials*, 29:5869-76.

【学会発表】

1. **Abe Y**, Nomura T, Kayamuro H, Yoshioka Y, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y : Creation and X-ray structural analysis of TNFR1-selective mutant TNF with antagonistic activity. HUPO 8th Annual World Congress, Toronto 2009, 26-30 September, 2009, Tronto Canada.
2. **阿部康弘**、角田慎一、堤 康央：創薬プロテオミクス研究を有効活用したバイオ創薬、CphI Japan 2009、平成21年4月、東京（招待講演）
3. **阿部康弘**、鎌田春彦、角田慎一、堤 康央：アンタゴニスト活性を有したTNFR1指向性変異体の新規自己免疫疾患治療薬としての有用性評価、第59回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成21年10月、大阪（日本薬学会近畿支部奨励賞 受賞講演）

・研究分担者（近藤昌夫）

【論文発表】

1. Saeki R, **Kondoh M**, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y and Yagi K. (2009) A novel tumor-targeting using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol*, 76:918-926.
2. Matsuhisa K, **Kondoh M**, Takahashi A and Yagi K. (2009) Tight junction modulators and drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, (2009) 6, 509-515.
3. **Kondoh M**, Takahashi A, Saeki R and Yagi K (2009) Claudin as a novel drug delivery system. *Drug Delivery System*, 24:532-537.

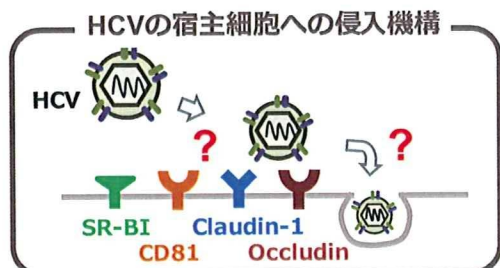
【学会発表】

1. **近藤昌夫**、生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究、第25回日本DDS学会学術集会、平成21年7月、東京（招待講演）
2. **近藤昌夫**、八木清仁、Claudin を利用した創薬研究の可能性、彩都バイオサイエンスセミナー、平成21年10月、大阪（招待講演）
3. **近藤昌夫**、八木清仁、創薬ターゲットとしてのタイトジャンクションの可能性、創剤フォーラム 第15回シンポジウム「タイトジャンクションをめぐる最近の研究成果と創薬への応用」、平成21年10月、東京（招待講演）
4. Toshiaki Yamaura, Azusa Takahashi, Hideki Kakutani, **Masuo Kondoh**, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, Development of a novel screening system for claudin binder using baculovirus display. 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

研究の背景・目的

- ・C型肝炎ウイルス (HCV) 感染者数：世界中で2億人、日本で200万人
- ・C型肝炎治療法：インターフェロン、リバビリン療法のみ (感染阻害薬は皆無)
- 問題点：奏効率50%、耐性ウイルスの出現、副作用 → 新たな抗HCV薬の開発が求められている！！



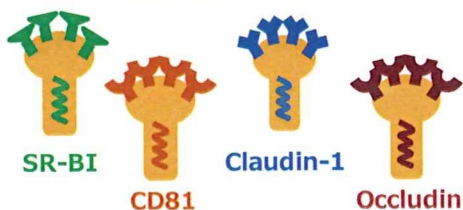
HCV感染阻害剤開発における問題点

- ・HCV感染受容体の蛋白質精製が困難
 - ・HCV感染受容体の抗原性が低い
- HCV感染機構の生化学的解析が皆無であるため、HCV感染受容体の重要度、受容体同士の相互作用については不明。

目的：本邦独自の膜蛋白質発現系出芽バキュロウイルス (BV) を用いたHCV感染機構の生化学的解析を出発点とした、HCV感染阻害分子の創出および感染受容体発現とC型肝炎との関連解析を目指す

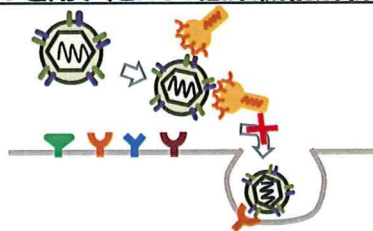
H21年度の成果

①HCV感染受容体発現BVの作製



Bac-to-Bac Expression Systemを用いて、HCV感染受容体として同定されているSR-BI、CD81、Claudin-1、Occludinを提示したBVの作製に成功した。なお、受容体発現量はウエスタンブロットで確認済みである。

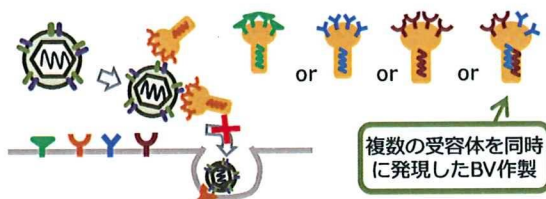
②BVを用いたHCV感染機構解析系の構築



アデノウイルスをモデルとして使い、受容体発現BVによるウイルス感染阻害効果の解析系を構築した。さらに本システムも用いてHCV感染機構を解析したところ、SR-BIおよびCL1-BV単独では感染阻害できないことを明らかとした。

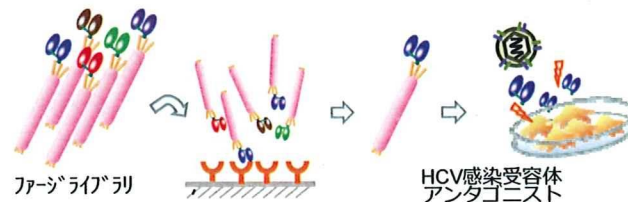
今後の予定

①HCV感染受容体群のバリデーション



H21年度に構築したHCV感染受容体解析系を用いて、HCV感染受容体群のバリデーションを試みる。

③HCV感染受容体アンタゴニストの創出



独自のファージ表面提示法を駆使することで、HCV感染受容体アンタゴニストを創出する。

②HCV感染受容体の生化学的解析

HCV関連受容体の発現量とC型肝炎発症・増悪の関連解明を試みるとともに、各受容体の生化学的解析を通じて、感染機構の解明を試みる。



臨床情報とリンク