

20. Nakatsura, T., Nishimura, Y. Usefulness of a novel oncofetal antigen Glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. (review) *BioDrugs* 19:71-77, 2005.
21. Nakatsura, T., Komori, H., Kubo, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Katagiri, T., Furukawa, Y., Oagawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Mouse homologue of a novel human oncofetal antigen, Glypican-3, evokes T cell-mediated tumor rejection without autoimmune reactions in mice. *Clin. Cancer Res.* 10: 8630-8640, 2004.
22. Nakatsura, T., Kageshita, T., Ito, S., Wakamatsu, K., Monji, M., Ikuta, Y., Senju, S., Ono, T. and Nishimura, Y. Identification of glypican-3 as a novel tumor marker for melanoma. *Clin. Cancer Res.* 10: 6612-6621, 2004.
23. Monji, M., Nakatsura, T., Senju, S., Yoshitake, Y., Sawatsubashi, M., Shinohara, M., Kageshita, T., Ono, T., Inokuchi, A. and Nishimura, Y. Identification of a novel human cancer/testis antigen, KM-HN-1, recognized by cellular and humoral immune responses. *Clin. Cancer Res.* 10: 6047-6057, 2004.
24. Yoshitake, Y., Nakatsura, T., Monji, M., Senju, S., Matsuyoshi, H., Tsukamoto, H., Hosaka, S., Komori, H., Fukuma, D., Ikuta, Y., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ito, H., Shinohara, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y.: Proliferation potential-related protein, an ideal esophageal cancer antigen for immuno-therapy, identified using complementary DNA microarray analysis. *Clin. Cancer Res.* 10: 6437-6448, 2004.
25. Kai, M., Nakatsura, T., Egami, H., Senju, S., Nishimura, Y., and Ogawa, M. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncology Reports* 10: 1777-1782, 2003.
26. Nakatsura, T., Monji, M., Senju, S., Yamada, K., Ogawa, M., and Nishimura, Y. Identification of cancer antigens by SEREX. *International Congress Series* 1255: 343-349, 2003.
27. Nakatsura, T., Yoshitake, Y., Senju, S., Monji, M., Komori, H., Motomura, Y., Hosaka, S., Beppu, T., Ishiko, T., Kamohara, H., Ashihara, H., Katagiri, T., Furukawa, Y., Fujiyama, S., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Nishimura, Y. Glypican-3, overexpressed specifically in human hepatocellular carcinoma, is a novel tumor marker. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 306: 16-25, 2003.
28. Azuma, K., Shichijo, S., Maeda, Y., Nakatsura, T., Nonaka, Y., Fujii, T., Koike, K., and Itoh, K. Mutated p53 Gene Encodes a Non-Mutated Epitope Recognized by HLA-B\*4601-restricted and Tumor-reactive CTLs at Tumor Site. *Cancer Res.* 63: 854-858, 2003.
29. Monji, M., Senju, S., Nakatsura, T., Yamada, K., Sawatsubashi, M., Inokuchi, A., and Nishimura, Y. Head and Neck Cancer Antigens Recognized by the Humoral Immune System. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 294: 734-741, 2002.
30. Maeda, Y., Ito, M., Harashima, N., Nakatsura, T., Hida, N., Imai, N., Sato, Y., Shichijo, S., Todo, S., and Itoh, K. Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)-derived peptides can induce HLA-A2-restricted and tumor-specific CTLs in the majority of gastrointestinal cancer patients. *Int. J. Cancer* 99: 409-417, 2002.
31. Nakatsura, T., Senju, S., Ito, M., Nishimura, Y., Itoh, K. Cellular and Humoral Immune Responses to A Human Pancreatic Cancer Antigen, CLP, Originally Defined by the SEREX Method. *Eur. J. Immunol.* 32: 826-836, 2002.
32. Yamada, K., Senju, S., Shinohara, T., Nakatsura, T., Murata, Y., Ishihara, M., Nakamura, S., Ohno, S., Negi, A., and Nishimura, Y. Lens epithelial derived growth factor as an autoantigen in Vogt-Koyanagi-Harada disease. *Immunol. Lts.* 78: 161-168, 2001.
33. Nakatsura, T., Senju, S., Yamada, K., Jyotsuka, T., Ogawa, M., and Nishimura, Y. Gene cloning of immunogenic antigens over-expressed in pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 281: 936-944, 2001.
34. Yamada, K., Senju, S., Nakatsura, T., Murata, Y., Ishihara, M., Nakamura, S., Ohno, S., Negi, A., and Nishimura, Y. Identification of a novel autoantigen UACA in patients with panuveitis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280: 1169-1176, 2001.
35. Haga, Y., Nakatsura, T., Shibata, Y., Sameshima, H., Nakamura, Y., Tanimura, M., and Ogawa, M. Human gastric carcinoid detected during long-term antiulcer therapy of H2 receptor antagonist and proton pump inhibitor. *Dig Dis Sci.* 43: 253-257, 1998.
36. Nakatsura, T., Hasebe, T., Tsubono, Y., Ryu, M., Kinoshita, T., Kawano, N., Konishi, M., Kosuge, T., Kanai, Y., and Mukai, K. Histological prognostic parameters for adenocarcinoma of the pancreatic head. Proposal for a scoring system for prediction of outcome. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 4:441-448, 1997.

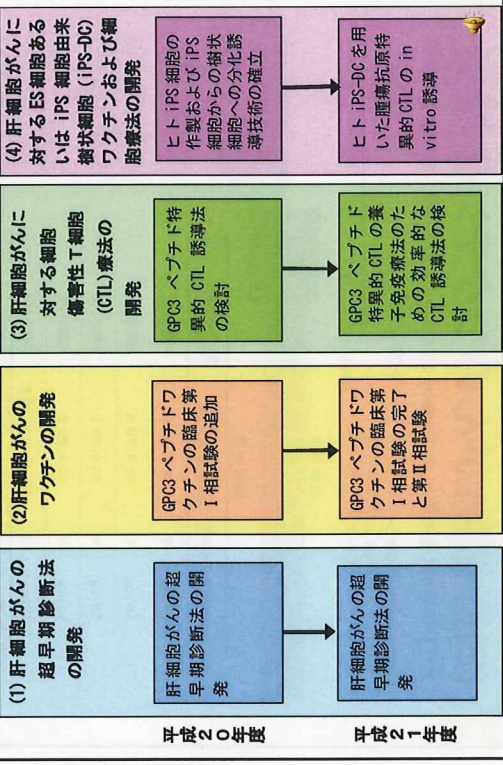
37. Tanizaki, H., Ryu, M., Kinoshita, T., Kawano, N., Konishi, M., Cho, A., Nakatsura, T., Natsume, T., Takahashi, S., Sugita, M., Izuishi, K., Yoshino, M., Furuse, J., Iwasaki, M., and Tsubono, Y. Comparison of clinical features and survival in patients with hepatitis B and C virus-related hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 27: 67-70, 1997.
38. 中面哲也, 標準化へ向けた glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験, *Biotherapy*, 23(2):192-197, 2009
39. 中面哲也, 木下平, 古瀬純司, 進行肝細胞がん患者を対象とした HLA-A24 および-A2 結合性 Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験, 臨床薬理の進歩, 財団法人臨床薬理研究振興財団, 30:160-166, 2009
40. 中面哲也, 第 2 部 がん免疫の最前線 file-3 がん免疫の専門医が語る, 免疫細胞治療 (武藤徹一郎監修), 幻冬舎, 100-109, 2009
41. 中面哲也, 臨床編 5. 肝細胞がん-新規腫瘍抗原 (glypican-3<GPC3>) を利用したワクチン療法, がんペプチドワクチン療法 (中村祐輔編), 中山書店, 76-83, 2009
42. 中津川宗秀, 中面哲也, 第 2 章 がん化学療法の標的 12. がん免疫療法, がん化学療法・分子標的治療 update (西條長宏, 西尾和人編), 中外医学社, 86-91, 2009
43. 中面哲也, 肝細胞癌に対する Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチンの臨床第 I 相試験, *リンパ学*, 31(2):66-70, 2008
44. 中面哲也, Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチンによる肝細胞癌の予防・治療法, *G. I. Research*, 16(1):17-23, 2008
45. 西村泰治, 中面哲也, 千住覚, 新規癌胎児性抗原 Glypican-3 の肝細胞癌の診断と免疫療法への応用, 日本臨床免疫学会会誌, 31(5):383-91, 2008
46. 中面哲也, 癌免疫療法, *腫瘍内科*, 1(5):449-453, 2007
47. 小森宏之, 中面哲也, 本村裕, 別府透, 西村泰治, 馬場秀夫, 癌胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした癌ワクチン療法, *Biotherapy*, 21(1):62-68, 2007
48. 小森宏之, 中面哲也, 本村裕, 別府透, 石河隆敏, 馬場秀夫, 西村泰治, 新規癌胎児性抗原 Glypican-3 を標的とした肝細胞癌の免疫療法, *分子細胞治療*, 6(2):57-61, 2007
49. 影下登志郎, 福島聡, 尹浩信, 西村泰治, 中面哲也, 悪性黒色腫の新しい血清マーカー Glypican-3 と SPARC, *臨床皮膚科*, 60(5)増刊号:169-172, 2006
50. 小森宏之, 中面哲也, 別府透, 西村泰治, 馬場秀夫, Glypican-3(GPC3)を標的とした免疫療法の有用性の検討, *癌と化学療法*, 33(12):1742-1744, 2006
51. 吉武義泰, 中面哲也, 西村泰治, 癌免疫療法の新展開, *日本臨床*, 63(4) (増刊:『臨床免疫学(上)-基礎研究の進歩と最新の臨床-』):46-55, 2005
52. 中面哲也, 西村泰治, 腫瘍抗原ペプチドを駆使した癌免疫療法の新展開, *実験医学*, 第 22 巻 5 号 (増刊; 免疫研究のフロンティア), 215-220, 2004
53. 中面哲也, 西村泰治, cDNA マイクロアレイ解析による腫瘍特異抗原の探索, *臨床免疫*, 41(4):369-378, 2004
54. 中面哲也, 西村泰治, cDNA マイクロアレイ解析による腫瘍特異抗原の探索「肝細胞癌の腫瘍マーカーおよび腫瘍特異抗原としての Glypican-3(GPC3)の同定; その臨床応用への可能性, 医学をゲノムする (第 27 回阿蘇シンポジウム記録 2003) 」, 115-127, 2004
55. 中面哲也, 西村泰治, 癌と HLA-癌細胞の排除における HLA の役割, *医学のあゆみ*, 207(8):543-548, 2003
56. 中面哲也, 門司幹男, 西村泰治, *SEREX Surgery Frontier*, 9(3):244-247, 2002
57. 江上寛, 甲斐幹男, 中面哲也, 小川道雄, Heat shock protein 救急・集中治療, 14(9):969-974, 2002
58. 小田竜也, 竜崇正, 中面哲也, 向井清, 長谷部孝裕, 膵臓癌の分子生物学的, 病理学的予後予測指標肝胆膵, 34(3):319-323, 1997
59. 竜崇正, 木下平, 小西大, 井上和人, 中面哲也, 夏目俊之, *Grisson 鞘一括肝中央 2 区域切除外科*, 59(4):425-430, 1997

## 特許の取得及び申請状況；

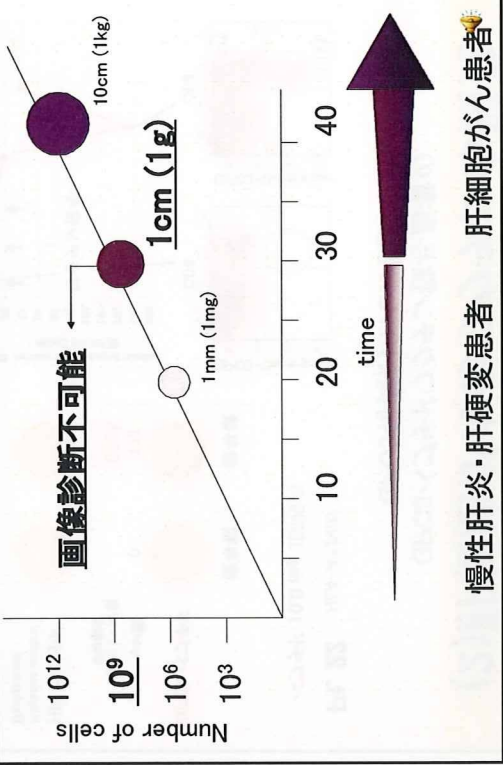
国内：特許取得：0件、出願中：8件、海外：特許取得：1件、出願中：8件

1. 国際特許出願番号：PCT/JP2006/315631, (国内：2005-230702),  
発明者：西村泰治、中面哲也、小森宏之、  
発明の名称：HLA-A2 陽性者用 Glypican-3(GPC3)由来癌拒絶抗原ペプチド及びこれを含む医薬、  
出願人：西村泰治、中面哲也、小森宏之、(国内：国立大学法人熊本大学)、  
出願日：2006年8月8日(国内：2005年8月9日)
2. 国際特許出願番号：PCT/JP2006/315630, (国内：2005-230671),  
発明者：西村泰治、中面哲也、小森宏之、  
発明の名称：HLA-A2 陽性者用 HSP105 由来癌拒絶抗原ペプチド及びこれを含む医薬、  
出願人：西村泰治、中面哲也、小森宏之、(国内：国立大学法人熊本大学)、  
出願日：2006年8月8日(国内：2005年8月9日)
3. 国際特許出願番号：PCT/JP2005/14567, (国内：2004-303688),  
発明者：西村泰治、中面哲也、生田義明、  
発明の名称：悪性黒色腫の新規な診断剤、  
出願人：西村泰治、中面哲也、生田義明、(国内：国立大学法人熊本大学)、  
出願日：2005年8月9日(国内：2004年10月19日)
4. 国際特許出願番号：PCT/JP2005/14566, (国内：2004-235087),  
発明者：西村泰治、中面哲也、保坂征司、  
発明の名称：RNAi を利用した抗腫瘍剤、  
出願人：西村泰治、中面哲也、保坂征司、(国内：国立大学法人熊本大学)、  
出願日：2005年8月9日(国内：2004年8月12日)
5. 国際特許出願番号：PCT/JP2004/016374, (国内：2003-368725),  
発明者：西村泰治、中面哲也、  
発明の名称：悪性黒色腫(メラノーマ)の診断剤、  
出願人：くまもとテクノ産業財団、  
出願日：2004年10月28日(国内：2003年10月29日)
6. 国際特許出願番号：PCT/JP2004/011736, (国内：2003-291073),  
発明者：中面哲也、吉武義泰、中村祐輔、西村泰治、  
発明の名称：食道癌の抗原およびその利用、  
出願人：くまもとテクノ産業財団、  
出願日：2004年8月10日(国内：2003年8月11日)
7. 国際特許出願番号：PCT/JP03/11049, (国内：2002-255668)  
発明者：中面哲也、西村泰治、  
発明の名称：癌抗原及びその利用、  
出願人：くまもとテクノ産業財団、  
出願日：2003年8月29日、(国内：2002年8月30日)
8. 国際特許出願番号：PCT/JP03/10459, (国内：2002-245831),  
発明者：西村泰治、中面哲也、中村祐輔、  
発明の名称：「ペプチド及びこれを含む医薬」、  
出願人：キリンビール株式会社、  
出願日：2003年8月26日、(国内：2002年8月19日)

癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発  
国立がんセンター東病院長臨床開発センター機能再生室 中田 晋也



(1)肝細胞がんの超早期診断法の開発



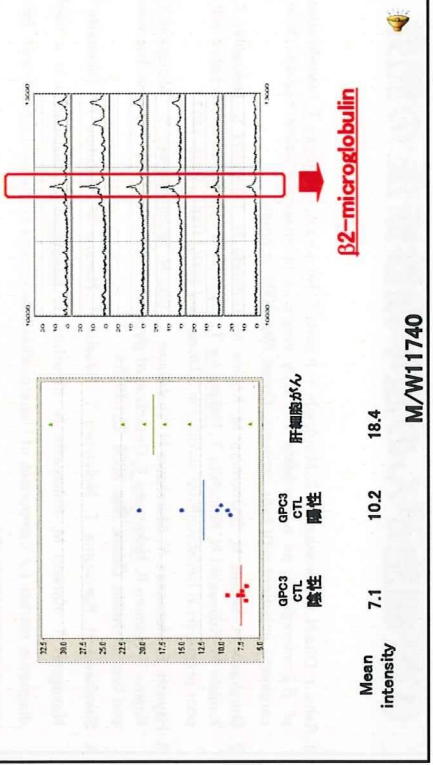
(1)肝細胞がんの超早期診断法の開発

肝細胞がんの超早期診断につながる可能性のある我々のこれまでの研究成果

- HLA-A24あるいはA2陽性の慢性肝炎・肝硬変患者47症例中10症例(21%)の末梢血中に**GPC3ペプチド特異的IFN-γを産生するCTL**の存在が認められた。
- そのGPC3ペプチド特異的CTL陽性患者血漿中に、SELDI/TOF-MSを用いたプロテオーム解析により、CTL陰性の患者血漿では低く、肝細胞がん患者血漿での発現レベルに近いピークを見つけた。この蛋白質は**β2ミクログロブリン**と考えられ、現在検証を進めている。
- 我々はこれまでに**血清中のGPC3が肝細胞がんの腫瘍マーカー**になることを報告してきたが、その感度は40-50%である。GPC3に対する新規抗体を用いて、血清GPC3の高感度検出法を検討中である。
- 既存の腫瘍マーカー、AFP・PIVKA-IIも超早期診断に使える可能性がある。
- 血清中のGPC3に対するIgG抗体価**の測定も肝細胞がんの診断に有用であることを見出しつつある。

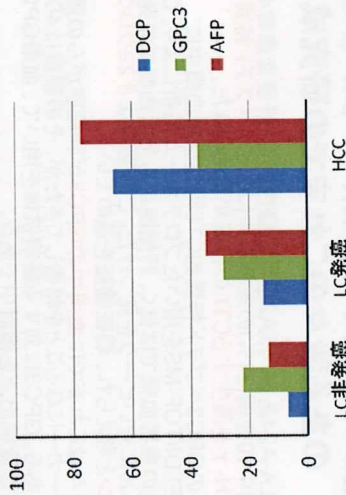
(1)肝細胞がんの超早期診断法の開発

慢性肝炎・肝硬変において GPC3特異的CTL陽性群でCTL陰性群より有意に発現したピーク



# (1)肝細胞がんの超早期診断法の開発

各群の腫瘍マーカー陽性率(%)



1999年~2007年に大塚市民病院にて患者の同意が得られ血清保存がなされていた肝硬変非発癌例 148例 (3年以上非発癌)、肝硬変発癌例 66例 (2005年以降発癌)、肝細胞癌 128例、の計342例 (全例HCV抗体陽性)を対象とした。

# (1)肝細胞がんの超早期診断法の開発

1. Saito Y, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura I. Identification of  $\beta$ 2-microglobulin as a candidate for early diagnosis of imaging invisible hepatocellular carcinoma in patient with liver cirrhosis. *Oncol. Rep.* 2009, in press.
2. Shirakawa H, Suzuki H, Shimomura M, Kojima M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura I. Glypican-3 expression is correlated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2009; 100(8):1403-1407.
3. Hayashi E, Motomura Y, Shirakawa H, Yoshikawa T, Oba N, Nishinakagawa S, Mizuguchi Y, Kojima T, Nomura K, Nakatsura I. Detection of glypican-3-specific CTLs in chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Oncol. Rep.* 2009; 22:149-54.
4. Shirakawa H, Kuronuma T, Nishimura Y, Hasebe T, Nakano M, Gotohda N, Takahashi S, Nakagohri T, Konishi M, Kobayashi N, Kinoshita T, Nakatsura I. Glypican-3 is a useful diagnostic marker for component of Hepatocellular Carcinoma in Human Liver Cancer. *Int. J. Oncol.* 2009; 34:649-656.

# (2)肝細胞がんのワクチンの開発

進行肝細胞がんを対象としたGlypican-3(GPC3)ペプチドワクチン臨床第1相試験

GPC3ペプチドワクチン  
HLA-A2 GPC3<sub>44-152</sub> (FVGEFFTDV)  
HLA-A24 GPC3<sub>398-306</sub> (EYLSLEEL)

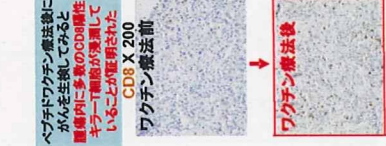


**有害事象**  
28例全例に、痛みや腫みを経験し、1例は注射部位の発赤や腫脹を認めた。また、2例に一過性の血圧性の発熱、2例に一過性の38度以上の発熱を認めたのみで、**安全性に問題なし。**

**臨床効果**

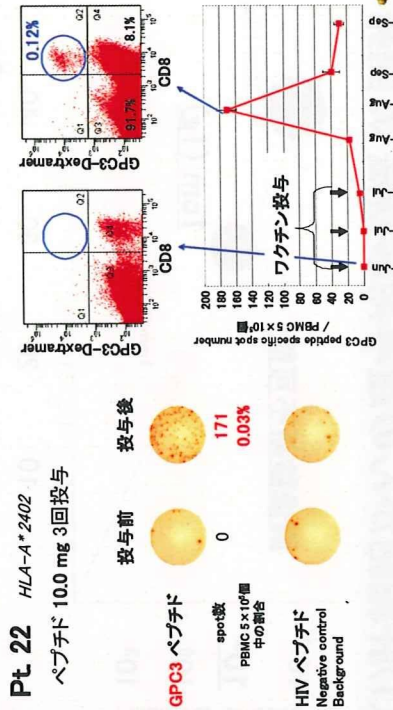
1回投与量	発癌例	1回目のワクチン後8週後のRECIST評価	腫瘍マーカー低下 PIMA-II
0.3 mg	6	SD 3, PD 3	6例中2例
1.0 mg	6	SD 4, PD 2	5例中4例
3.0 mg	6	SD 4, PD 2	5例中5例
10 mg	6	SD 4, PD 2	5例中4例
30 mg	6	PR 1, SD 3, PD 2	6例中6例
計	30	PR 1, SD 18, PD 11	27例中21例 (SD以上63%) (マーカー低下78%)

ほぼ全例で末梢血中GPC3特異的CTLの頻度の増加が検出



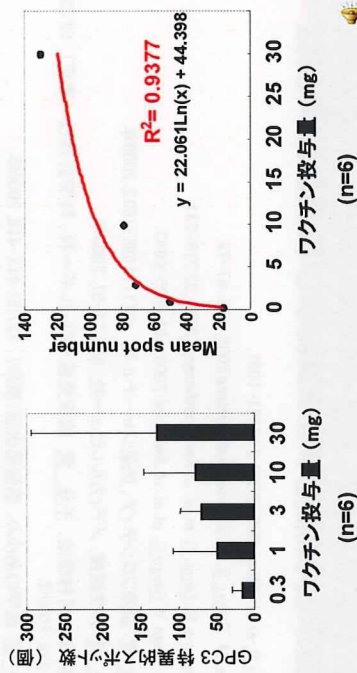
# (2)肝細胞がんのワクチンの開発

GPC3ペプチドワクチン投与患者のGPC3特異的CTLの検出



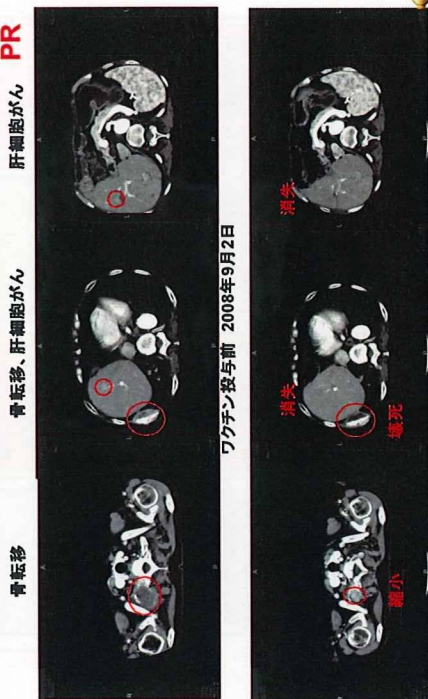
## (2)肝細胞がんのワクチンの開発

ワクチンの投与量と投与後GPC3特異的CTLの頻度の最大値の相関



## (2)肝細胞がんのワクチンの開発

PL24 75才女性 多発肝細胞がん、骨転移、肺転移、リンパ節転移 HLA-A\*0207/1101  
HLA-A2 glypican-3 ペプチドワクチン療法: 1回30 mg, 3回投与により**著明な臨床効果**出現



## (2)肝細胞がんのワクチンの開発

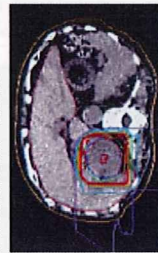
- Motomura Y, Ikuta Y, Kuronuma T, Komori H, Ito M, Tsuchihara M, Tsunoda Y, Shirakawa H, Baba H, Nishimura Y, Kinoshita T, Nakatsura I, HLA-A2 and -A24-restricted glypican-3-derived peptide vaccine induce specific CTLs: Preclinical study using mice. *Jnc J Oncol*. 2008, 32:985-990.
- 中面哲也, 標準化へ向けた glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験, *Biotherapy*, 23(2):192-197, 2009
- 中面哲也, 木下平, 古瀬純司, 進行肝細胞がん患者を対象としたHLA-A24および-A2結合性 Glypican-3(GPC3)由来ペプチドワクチンの臨床第I相試験, *臨床薬理の進歩*, 財団法人臨床薬理研究振興財団, 30:160-166, 2009
- 中面哲也, 標準化へ向けた glypican-3 ペプチドワクチンの臨床試験, *Biotherapy*, 23(2):192-197, 2009
- 中面哲也, 臨床第5肝細胞がん-新規腫瘍抗原(glypican-3(GPC3))を利用したワクチン療法, *がんペプチドワクチン療法(中村祐輔編)*, 中山書店, 76-83, 2009
- 中津川宗秀, 中面哲也, 第2章 がん化学療法の標的 12.がん免疫療法, *がん化学療法-分子標的治療update(西條長宏, 西尾和人編)*, 中外医学社, 86-91, 2009
- 中面哲也, 肝細胞癌に対するGlypican-3(GPC3)ペプチドワクチンの臨床第I相試験, *リンパ学*, 31(2):66-70, 2008

## 肝細胞がんに陽子線治療は有効である

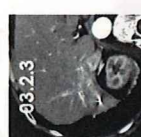
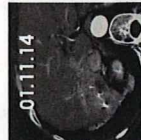
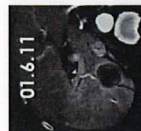
### Case Presentation

70F, HCC, moderately differentiated

•Prior Treatment: None



01.4.2 - 01.5.8, 76GyE/20Fr/37Days



AFP 231.9

AFP 56.7

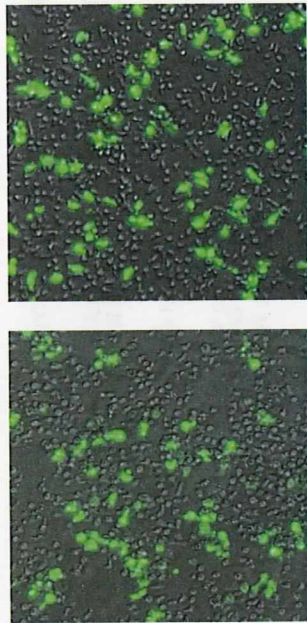
AFP 18.4

AFP 15.0

### (3)肝細胞がんに対するCTL療法の開発

ペプチドワクチン療法後に誘導されたペプチド特異的CTLクローンはペプチドが載った細胞だけを殺傷する

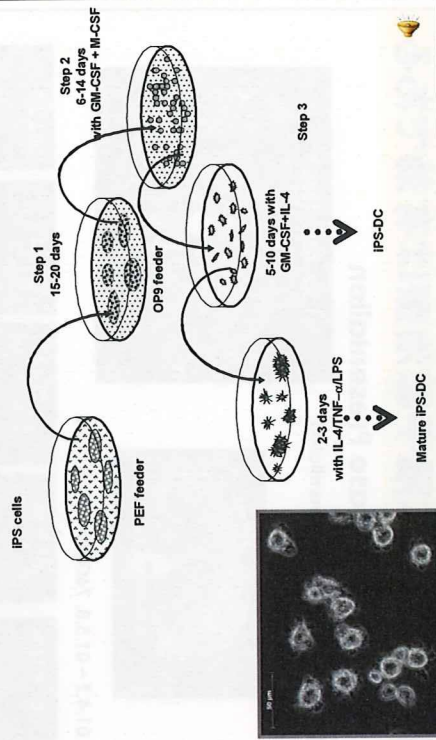
エフェクター細胞：HLA-A2402拘束性GPC3由来ペプチド特異的CTLクローン



ターゲット：GPC3由来ペプチドを載せたT2-A24細胞  
エフェクター / ターゲット比 = 10 : 1  
HIV由来ペプチドを載せたT2-A24細胞

### (4)肝細胞がんに対するES細胞あるいはiPS細胞由来樹状細胞ワクチンおよび細胞療法の開発

ヒトiPS細胞から樹状細胞への分化誘導培養



### (4)肝細胞がんに対するES細胞あるいはiPS細胞由来樹状細胞ワクチンおよび細胞療法の開発

- Senju S, et al. *Stem Cells*. 2009; 27:1021-1031.
- Inoue M, Senju S, et al. *Immunol. Letters* 2009; 126: 67-72.
- Fukushima S, Senju S, et al. *J. Immunotherapy*. 2009; 32:219-231.
- Matsunaga Y, Senju S, et al. *J. Immunol.* 2008; 181:6635-6643.
- 壬住 寛 血液フロンティア、医薬ジャーナル社 19(11)1685-1692, 2009年
- 壬住 寛 再生医療、メデイカルビュー社 8(3) 34-37, 2009年
- 福島 聡、西村泰治、壬住 寛 臨床免疫・アレルギー科、科学評論社 (東京), 52(3): 331-338, 2008年
- 壬住 寛 医学のあゆみ、医薬出版(東京), 227(5): 413-418, 2008年
- 千住 寛 実験医学増刊(樹状細胞による免疫制御と臨床応用)羊土社 26(20) 212-217, 2008年
- 西村泰治, 日本組織適合性学会誌, 15(1): 51-60, 2008年
- 千住 寛 再生医療、メデイカルビュー社 7(3) 43-45, 2008年
- 西村泰治, 腫瘍内科, 科学評論社(東京), 2(2): 164-170, 2008年

### 癌胎児性抗原を利用した肝がんの超早期診断法と発症予防ワクチンの開発

肝細胞がんの超早期診断法の開発	肝細胞がんのワクチンの開発	肝細胞がんに対するES細胞あるいはiPS細胞由来樹状細胞(IPS-DC)ワクチンおよび細胞療法の開発
<p>肝細胞がんの超早期診断法の検証と血中循環がん細胞検出技術の臨床的有用性の検討(中面、清上、野村、藤山、小井戸、豊田)</p>	<p>慢性肝炎、肝硬変患者を対象としたGPC3ペプチドワクチンの臨床試験の計画と実施(中面、清上、野村、藤山、小井戸、豊田)</p> <p>・陽子線治療とワクチン併用の臨床試験の計画と実施(中面、河島)</p> <p>・GPC3のO4+1細胞エヒトープの同定(西村)</p>	<p>・ヒト化マウスを用いたIPS-DCによる腫瘍抗原特異的CTLのin vivo誘導(千住)</p> <p>・IPS細胞がんワクチンの開発(本間)</p>

(明後される功果)  
肝細胞がんの超早期診断法：予防法の開発、肝癌ウイルスキャリアの肝細胞がんの免疫抑制、肝細胞がんの治療成績の向上、医療費の削減、IPS細胞の有用性の認知

## 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：インターフェロンの抗肝線維化分子機構の解明とその応用

課題番号：H20-肝炎一般-003

研究代表者：河田 則文

**I. 研究の意義**

- (1) 本邦には約350万人に及ぶウイルス性肝炎感染者がおり、大きな厚生労働問題となっている。肝炎の治療法は急速に進歩し、C型肝炎では治療を受けた約半数の患者でウイルス排除可能になってきた。しかし、依然としてC型肝炎患者の半数は治療抵抗性であり、B型肝炎ウイルスの完全排除は困難を極めている。また、患者層は高齢化しており治療導入困難例が増えている。
- (2) 今後増加する高齢者の肝線維症・肝硬変を予防するためにもそれらに対する対処法が切望されている。しかしながら、現在の肝庇護療法は効果が不明確であり、分子論的基盤も未熟である。従って、ウイルスを排除する治療以外にも線維化を遅延させる治療法が望まれる。
- (3) インターフェロン (interferon, IFN) は抗ウイルス作用、免疫調節作用、抗腫瘍作用以外に抗肝線維化効果を持つことが知られているため、その薬理作用の詳細かつモダンな解析により新しい抗肝線維化剤が見出される可能性がある。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) 肝線維化は星細胞 (HSC) と筋線維芽細胞が主役であり、IFNの本細胞への作用を検討する必要がある。申請者らはIFNがヒトHSCの増殖を抑制することを報告したが、詳細な分子機構は不明である。そこでHSCの活性化とmicroRNA (miR) 発現との関連性、それらに及ぼすIFNの効果を検討する。
- (2) 星細胞機能の中でも細胞増殖やコラーゲン発現が肝線維化に直接的に関与するため、この細胞機能に作用するmiRを抽出する。同定されたmiRの標的遺伝子3' UTRへの結合性を確認する。また、miRを強制発現させHSC増殖、コラーゲン蛋白やその転写調節因子発現に及ぼす影響を検討する。
- (3) 最終的に当該miRに作用するか、その代替となる経口可能な低分子物質群をスクリーニングし、IFNの副作用を軽減させ得る新治療法の開発へと繋ぐ。
- (4) 一方、C型肝炎では肝線維化進行群 (stage3-4) はHCVの遺伝子型に関わらずIFN治療によるウイルス駆除率が不良であるが、ウイルス側因子のみでは説明できない。そこで宿主側因子を明らかにする目的で、肝組織中におけるmiR発現の相違を、線維化軽度群 (stage1-2) と網羅的に比較検討する。得られた情報から線維化進行群のIFN治療効果改善方策を立案する。

**III. 2年間の研究成果**

## ・研究代表者 (河田則文)

- (1) 研究グループ全体の研究成果をまとめながらHSCの増殖やコラーゲン発現に対するmiRの作用について以下の研究を行った。

## (2) IFNによる肝星細胞増殖抑制作用のメカニズム解明

ヒト星細胞株 (LX-2) を用いてmiR-195のIFNによる発現調節およびIFNによる細胞増殖の調節との関連について検討した。IFNは10~100 IU/mLで濃度依存的にLX-2増殖抑制を示し、これはp21の発現増加とcyclin E1の発現減少を介するCDK2活性低下によることが示唆された。miR-195発現はIFNにより約1.5倍増加し、miR-195 precursorにより細胞増殖は抑制された。現在miR-195のターゲット分子を探索し、IFNを介する肝星細胞増殖抑制への関与を検討中である。

## (3) IFNによる肝星細胞コラーゲン発現抑制作用のメカニズム解明

コラーゲン発現関連遺伝子のうち3' UTRにmiR-29b、-143および-218の予想結合領域を持つ遺伝子を探索した。miR-29bは1型コラーゲン $\alpha$ 1鎖(Coll1a1)、1型コラーゲン $\alpha$ 2鎖(Coll1a2)およびSp1、miR-143はColl1a1およびSmad3、また、miR-218はColl1a1、Sp1およびSocs3の3' UTRに予想結合領域が認められた。これら候補遺伝子の3' UTRを組み込んだルシフェラーゼリポーターベクターを用いて解析した結果、miR-29bおよびmiR-218が、Coll1A1とSp1の3' UTRと相互作用した。以上、miR-29bおよびmiR-218がColl1a1発現調整に関与することが示唆された。

## ・研究分担者 (池田一雄)

## (1) 星細胞におけるマイクロRNAの発現変動

ラットから分離・培養した星細胞の活性化に伴うmiR変動を検討した結果、発現低下する9個と増加する8個を見出した。低下する一つであるmiR-92はmiR-19、17-5p、18a、20aとクラスターを形成する。事実、miR-17-5p、18a、20aは星細胞の活性化に伴って発現低下することを確認した。



(2) microRNAの強制発現による星細胞の活性化への影響

このmiRクラスターを強制発現した細胞においてE2Fの核内発現が減少した。E2Fの蛋白発現は減少し、PTENの発現が増加した。解析の結果、E2F1 3' UTR上にはmiR17, miR20aが結合した。miR-92クラスターの星細胞増殖抑制効果をさらに検討中である。

## ・研究分担者(小川智弘)

(1) miR-29b と miR-218 は星細胞の I 型コラーゲンの発現を抑制する

miRのデータベース TargetScan を用いて、ヒト collagen 1A1 の 3' UTR に結合すると想定される miR-29b, 143, 218 について検討した。LX-2 を TGF- $\beta$ 1 で刺激すると Colla1 の mRNA の発現は増加し、miR-143 は濃度依存的に増加、miR-218 は減少した。一方、IFN $\alpha$ ,  $\beta$  は miR-143 を減少させ、miR-29b を増加させた。レポーターアッセイでは、miR-29b と -218 が collagen 1A1 と Sp1 の 3' UTR に結合することが確認された。miR-218 と miR-29b の precursor を導入した結果、I 型コラーゲンと Sp1 の発現が遺伝子およびタンパク質レベルで抑制されることが判明した。以上の結果から、miR-29b と -218 が星細胞の I 型コラーゲンの発現に関与することが示唆された。

## ・研究分担者(田守昭博)

- (1) 13 例の SVR 肝癌と 44 例の HCV 肝癌について肝癌組織と担癌肝組織における遺伝子変化を解析した結果、SVR 後に発症した肝癌と HCV 持続感染例からの肝癌では癌抑制遺伝子のメチル化パターンとミトコンドリア遺伝子変異が両群で異なっていた。
- (2) SVR 肝癌と HCV 肝癌について B 型肝炎ウイルス(HBV)に関する感染既往を評価するために肝組織内の HBV DNA の存在有無を PCR にて解析した。その結果、SVR 肝癌では Occult HBV 感染(HBs 抗原陰性、HBV DNA 陽性)を合併する症例が多数存在した。
- (3) SVR 例において発癌例と非発癌例においてインターフェロン治療前後の肝生検像を比較した。その結果、組織学的な炎症程度は両群ともに改善していたが線維化程度は非発癌例では改善を認めたが発癌例では改善していない症例を多数認めた。

## ・研究分担者(榎本大)

(1) C 型慢性肝炎における肝線維化進行例に特有な肝内 microRNA 発現の変化を同定

遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎 30 例の肝組織より microRNA を抽出し 3D-Gene Human miRNA Oligo chip v10.1 を用いて網羅的解析を行なった。肝線維化軽度群 (stage 1-2) と肝線維化進行群 (stage 3-4) の間で比較した結果、進行群では 7 種の miR 発現が有意に低下 (fold change, 0.59~0.83) し、17 種が有意に亢進 (fold change, 1.21~2.59) していた。有意に低下したもののうち、miR-422a は  $p < 0.01$  であった。有意に亢進した miR-222、miR-214、miR-199a-3p (miR-199b-3p)、miR-199a-5p は  $p < 0.01$  であった。

(2) C 型慢性肝炎におけるインターフェロン治療効果を規定する肝内 microRNA 発現の変化を同定

遺伝子型 1b の C 型慢性肝炎 30 例を対象に、インターフェロン治療前の肝生検組織において microRNA 発現の網羅的解析を行なった。治療効果については PEG-IFN- $\alpha$ 2b 1.5  $\mu$ g/kg (または PEG-IFN- $\alpha$ 2a 180  $\mu$ g) 週 1 回とリバビリン 600~1,000 mg 連日を 48 週間投与し、治療終了 6 ヶ月後に血中 HCV RNA 陰性のものを SVR と判定した。SVR 症例において 11 種の miR が有意に低下 (fold change, 0.69~0.90) し、2 種が有意に亢進 (fold change, 1.03~1.80) していた。有意に低下したもののうち、miR-660、miR-324-5p、miR-532-5p は  $p < 0.01$  であった。

## ・研究分担者(鈴木知比古)

- (1) I 型 IFN が抗ウイルス作用とは独立して、直接肝星細胞に作用し、増殖抑制、細胞周期抑制、コラーゲン分解酵素産生亢進、TGF- $\beta$  抑制等の多様な効果をもたらすことを示した。
- (2) 現在慢性肝炎に用いられている I 型 IFN のうち、上記(1)の作用は IFN $\alpha$  よりも IFN $\beta$  の効果が強いことを明らかにした。
- (3) 上記(1)の作用のうち細胞周期抑制のメカニズムとして p21 の発現亢進を見出すとともに、その他の Cell cycle 関連遺伝子の発現が IFN $\beta$  で誘導されることを明らかにした。
- (4) 肝細胞癌株との比較で肝星細胞により選択的に IFN $\beta$  が IFN $\alpha$  よりもダイナミックな遺伝子発現変動をもたらす可能性をしめした。
- (5) 肝星細胞の *in vitro* の培養細胞系において、IFN および他の抗線維化薬の miR 発現に及ぼす影響はあまり大きくない可能性を示した。一方 *in vivo* 動物レベルにおいて、病態時の miR 発現の変化は明確に認められた。変動した miR の幾つかは肝傷害、肝癌と関連する miR であった。
- (6) 肝細胞癌株の遺伝子発現レベルにより IFN の肝がん増殖抑制効果 (感受性) を予測しうる可能性を示した (特許出願準備中のため詳細記載せず)。

## IV. 22 年度の課題

- (1) 以上の実験により選択された miR-29b, miR-92 クラスター (miR-19, 17-5p, 18a, 20a, 92) 及び miR-195 に関しては直接的な標的遺伝子である colla1, Sp1 や E2F1 が明らかとなってきたため、詳細なメカニズム解析を進めると同時に、これらの miR を星細胞に輸送する方法論を模索する。一方、標的分子の 3 次元立体構造のコンピューター解析により阻害可能な低分子物質をスクリーニングする。また、既存・既知の抗線維化作用を有する低分子物質との共通性についても検証する。
- (2) 臨床サンプルを用いた網羅的解析から得られたデータに関しては、さらに解析を行うと同時に、各

miRに関してリアルタイムPCRで定量解析を行う。また、他施設と共同研究にて多数のサンプルを用いた解析を行う。具体的には京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター疾患ゲノム疫学解析分野の村上善基先生と共同研究の協議を開始している。

- (3) 最終目標は、各種実験により選択されたmiRの機能を代償できる低分子物質を獲得し、*in vivo*モデルでの効果を検討して、臨床応用への道を開く。

#### V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 本邦には B、C 型肝炎ウイルス感染者が併せて約 350 万人存在し、国内最大の感染症として厚生労働上重大な問題であり、IFN 治療の公的助成制度や肝疾患連携拠点病院の整備が進んでいる。
- (2) しかし、ウイルス性肝炎を治癒させうる肝炎患者は未だ一部であり、副作用から治療を中断する患者も多い。その結果、多数の患者は緩徐に進行する線維化と伴に肝硬変、肝癌に至り死亡するため、この連鎖を断ち切る手段を早急に確立する必要がある。
- (3) 患者が高齢化する現状や、具体的な治療法・予防法がない肝硬変に対応するためにも肝線維化機構を詳細に検討し、その制御を行なえる薬剤の開発は急務である。
- (4) MicroRNA という分子生物学の新領域を利用しつつ、肝線維症の制御法を確立することは、創薬や検査薬開発とその商品化へと続く可能性や、患者の予後を規定する肝硬変、門脈圧亢進症への対策を講じることに直結するため、国民の保健・医療・福祉の向上等に繋がる。

#### 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 (河田則文)

- (1) Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 [Epub ahead of print]
- (2) Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. Ogawa T, Kawada N, Ikeda K. *Hepato Int*. 2009 [Epub ahead of print]
- (3) Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis. Otagawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N. *Hepato Int*. 2009 Jun;3(2):378-83.

##### ・研究分担者 (池田一雄)

- (1) Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. Higashiyama R, Moro T, Nakao S, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, Ikeda K, Adachi E, Bou-Gharios G, Okazaki I, Inagaki Y. *Gastroenterology*. 2009 Oct;137(4):1459-66.

##### ・研究分担者 (小川智弘)

- (1) Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 [Epub ahead of print]
- (2) Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. Ogawa T, Kawada N, Ikeda K. *Hepato Int*. 2009 [Epub ahead of print]

##### ・研究分担者 (田守昭博)

- (1) Tamori A, Enomoto M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Sakaguchi H, Habu D, Shiomi S, Imanishi Y, Kawada N. Add-on combination therapy with adefovir dipivoxil induces renal impairment in patients with lamivudine-refractory hepatitis B virus. *J Viral Hepat*. In print. 2009
- (2) Tamori A, Hayashi T, Shinzaki M, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Morikawa H, Sakaguchi H, Shiomi S, Takemura S, Kubo S, Kawada N. Frequent detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma of patients with sustained virologic response for hepatitis C virus. *J Med Virol*. 2009 Jun;81(6):1009-14. Sep;38(9):954-9.

##### ・研究分担者 (榎本大)

- (1) Enomoto M, Nakanishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N. Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis. *Ann Intern Med* 2008 Dec 16;149(12):912-3.
- (2) Enomoto M, Tamori A, Kawada N. Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus. *Rev Recent Clin Trials* 2009, in press.

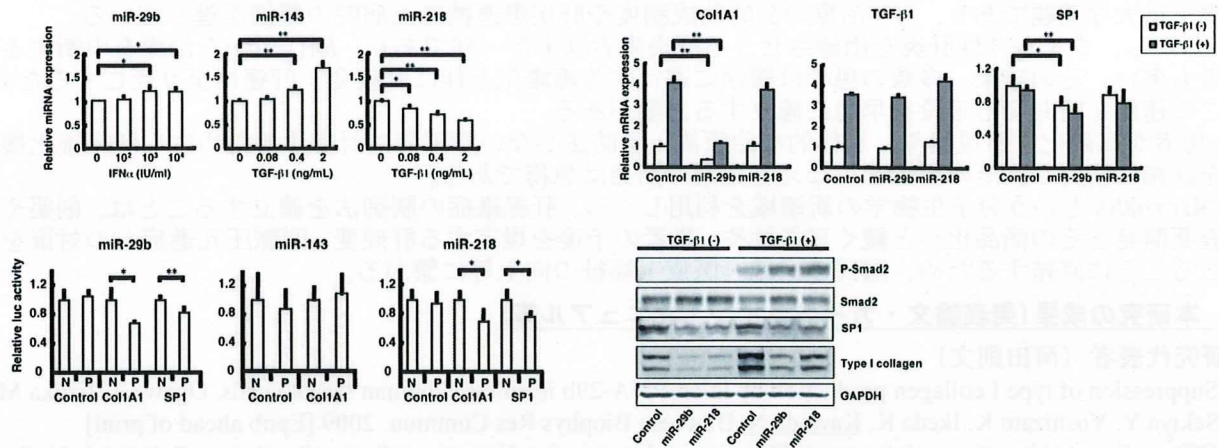
##### ・研究分担者 (鈴木知比古)

- (1) I 型インターフェロンの肝線維化改善メカニズム (The mechanism of action of type I interferon to improve liver fibrosis). 西村和美, 鈴木知比古. *細胞*, 41(6), 35-38, 2009.
- (2) 「種交差性の判定方法及びその判定方法を使用したアッセイキット」(特許出願番号 2009-078975 発明者: 鳥居裕一, 鈴木知比古, 下菌利恵子)。
- (3) 「インターフェロンの抗肝癌作用予測方法」(特許出願準備中 発明者: 鈴木知比古, 倉橋香菜, 他)。

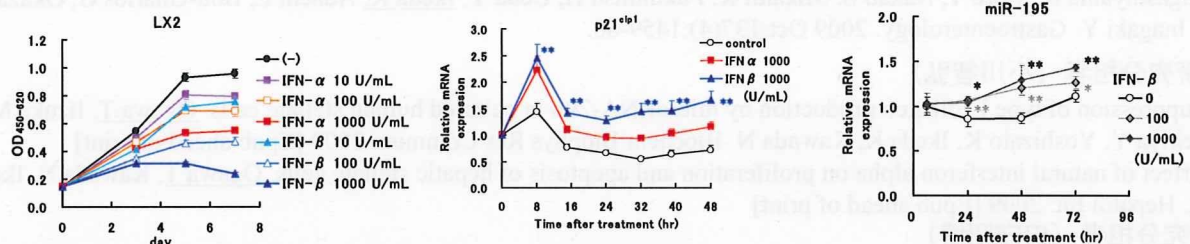
Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

<基礎研究>

(1) LX-2に TGFβ を添加すると I 型コラーゲンの mRNA 発現は増加し、同時に miR-143 増加、miR-218 減少がみられた。また、IFNα, β 刺激で miR-143 は減少し、miR-29b は増加した (左上)。レポーターアッセイでは、miR-29b と-218 が colla1 と Sp1 の 3'UTR に結合することが確認された (左下)。miR-218 と miR-29b の precursor を細胞導入した結果、miR-29b の導入で I 型コラーゲンと Sp1 の発現が遺伝子およびタンパク質レベルで抑制されることがわかった (右)



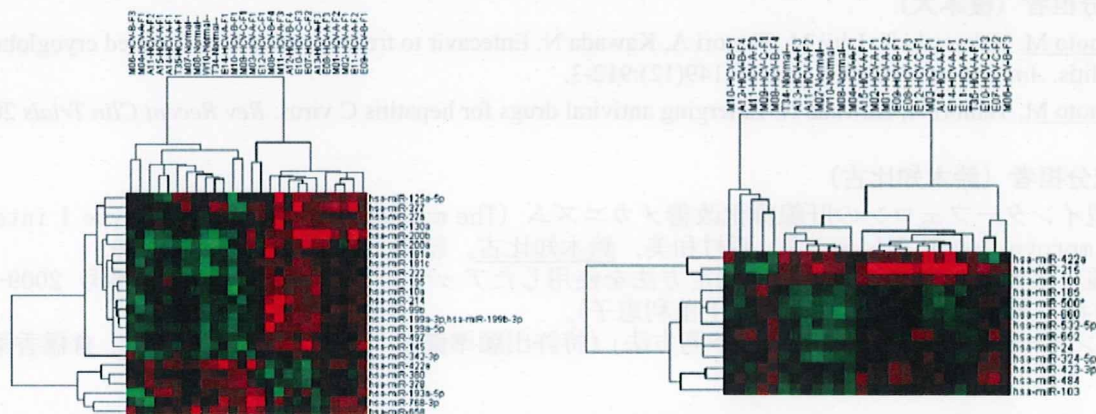
(2) LX-2 を用いて miR-195 の IFN による発現調節および IFN による細胞増殖の調節との関連について検討した。IFN は 10~100 IU/mL で濃度依存的に LX-2 増殖抑制を示し (左)、これは p21 の発現増加と cyclin E1 の発現減少を介する CDK2 活性低下によることが示唆された (図中及び示していない図)。miR-195 発現は IFN により約 1.5 倍増加し (右)、miR-195 precursor により細胞増殖は抑制された。また、miR-92 クラスターが E2F 経路で増殖に関与する可能性を見出した (図なし)。



<臨床研究>

(1) MicroRNA 発現と線維化との関連ならびに IFN 治療予測

線維化進行例では 7 種の発現が有意に低下 (fold change, 0.59~0.83) し、17 種の発現が有意に亢進 (fold change, 1.21~2.59) していた。有意に低下したもののうち、miR-422a は p<0.01 であった。有意に亢進した miR-222, miR-214, miR-199a-3p (miR-199b-3p), miR-199a-5p は p<0.01 であった (左)。SVR 症例において 11 種の miR が有意に低下 (fold change, 0.69~0.90) し、2 種が有意に亢進 (fold change, 1.03~1.80) していた。有意に低下したもののうち、miR-660, miR-324-5p, miR-532-5p は p<0.01 であった (右)。



**○研究代表者の研究歴等****・過去に所属した研究機関の履歴**

1986：大阪市立大学医学部卒業

1991：医学博士

1991-1992：フライブルグ大学（ドイツ）生化学研究施設客員研究員

1994：大阪市立大学医学部第3内科、助手

2003：大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科、講師

2005：大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科、助教授

2007：大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科、教授

**・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)**

森澤誠司（元大阪市立大学医学部生化学、教授）、和気健二郎（元東京医科歯科大学解剖学、教授）

小林絢三（元大阪市立大学医学部第3内科、教授）、黒木哲夫（元大阪市立大学医学部第3内科、教授）、山本尚三（元徳島大学医学部生化学、教授）、上田夏生（現香川大学医学部生化学、教授）

吉里勝利（広島大学名誉教授、現、大阪市立大学客員教授）、井上正康（現大阪市立大学医学部生化学、教授）、向谷（立野）知世（現、（株）フェニックスバイオ）、池田一雄（現名古屋市立大学解剖学、教授）

吉里勝利（広島大学名誉教授、現、大阪市立大学客員教授）、井上正康（現大阪市立大学医学部生化学、教授）、向谷（立野）知世（現、（株）フェニックスバイオ）、池田一雄（現名古屋市立大学解剖学、教授）

**・主な研究課題**

・肝臓の炎症過程における類洞壁細胞の関与に関する研究

・肝臓の線維化過程における星細胞の関与の研究

・星細胞から発見したサイトグロビンの機能解析

・NASHモデルの作製とその病態解析

・IFNを用いたHCV排除の臨床研究

**・これまでの研究実績**

・論文の本数： 英文原著論文 150 編、英文著書 34 編、英文総説 25 編、和文原著 25 編  
和文著書 49 編、和文総説 55 編、症例報告 5 編

・受賞数： 3 回（大阪市医学会市長賞、日本肝臓学会研究奨励賞、Karl von Kupffer 賞）

・特許の出願数： 3

・政策提言： 0

・主要な論文（最近5年間；2005～2009）

- 1) Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet. Mu YP, Ogawa T, Kawada N. Lab Invest. 2009 Nov 30. [Epub ahead of print]
- 2) Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Nov 12. [Epub ahead of print]
- 3) Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD. Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. Gut. 2009 Nov;58(11):1566-7
- 4) Add-on combination therapy with adefovir dipivoxil induces renal impairment in patients with lamivudine-refractory hepatitis B virus. Tamori A, Enomoto M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Sakaguchi H, Habu D, Shiomi S, Imanishi Y, Kawada N. J Viral Hepat. 2009 Aug 5. [Epub ahead of print]
- 5) Two cases of hepatocellular adenomatosis treated with transcatheter arterial embolization. Kobayashi S, Sakaguchi H, Takatsuka M, Suekane T, Iwai S, Morikawa H, Enomoto M, Tamori A, Kawada N. Hepatol Int. 2009 Jun;3(2):416-20.
- 6) Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis. Otagawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N. Hepatol Int. 2009 Jun;3(2):378-83
- 7) A case of primary small cell carcinoma of the liver that was treated with chemotherapy. Morikawa H, Nakayama Y, Maeda T, Nadatani Y, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Tamori A, Sakaguchi H, Oshitani N, Kudoh S, Kawada N. Hepatol Int. 2008 Dec;2(4):500-4.

- 8) Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. Ogawa T, Kawada N, Ikeda K. *Hepatol Int.* 2009 Apr 21. [Epub ahead of print]
- 9) A randomized pilot trial of oral branched-chain amino acids in early cirrhosis: validation using prognostic markers for pre-liver transplant status. Kawamura E, Habu D, Morikawa H, Enomoto M, Kawabe J, Tamori A, Sakaguchi H, Saeki S, Kawada N, Shiomi S. *Liver Transpl.* 2009 Jul;15(7):790-7.
- 10) Frequent detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma of patients with sustained virologic response for hepatitis C virus. Tamori A, Hayashi T, Shinzaki M, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Morikawa H, Sakaguchi H, Shiomi S, Takemura S, Kubo S, Kawada N. *J Med Virol.* 2009 Jun;81(6):1009-14.
- 11) Noninvasive laboratory tests proposed for predicting cirrhosis in patients with chronic hepatitis C are also useful in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Ohfuji S, Mori M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Ikura Y, Ueda M, Kawada N. *J Gastroenterol.* 2009;44(6):608-14.
- 12) Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium. Smedsrød B, Le Couteur D, Ikejima K, Jaeschke H, Kawada N, Naito M, Knolle P, Nagy L, Senoo H, Vidal-Vanaclocha F, Yamaguchi N. *Liver Int.* 2009 Apr;29(4):490-501.
- 13) Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention. Zion O, Genin O, Kawada N, Yoshizato K, Roffe S, Nagler A, Iovanna JL, Halevy O, Pines M. *Pancreas.* 2009 May;38(4):427-35
- 14) Sildenafil-induced severe cholestatic hepatotoxicity. Enomoto M, Sakaguchi H, Ominami M, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *Am J Gastroenterol.* 2009 Jan;104(1):254-5.
- 15) Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis. Enomoto M, Nakanishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N. *Ann Intern Med.* 2008 Dec 16;149(12):912-3.
- 16) Platelet-associated IgG for the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura during peginterferon alpha and ribavirin treatment for chronic hepatitis C. Enomoto M, Yamane T, Hino M, Ohnishi M, Tamori A, Kawada N. *Liver Int.* 2008 Nov;28(9):1314-5.
- 17) Clinical role of FDG-PET for HCC: relationship of glucose metabolic indicator to Japan Integrated Staging (JIS) score. Kawamura E, Habu D, Ohfuji S, Fukushima W, Enomoto M, Torii K, Kawabe J, Kondo K, Tamori A, Kawada N, Shiomi S. *Hepatogastroenterology.* 2008 Mar-Apr;55(82-83):582-6.
- 18) Does a late evening meal reduce the risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis C? Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Habu D, Takeda T, Tamori A, Sakaguchi H, Seki S, Kawada N, Nishiguchi S, Shiomi S, Hirota Y. *Hepatol Res.* 2008 Sep;38(9):860-8.
- 19) Optimal duration of additional therapy after biochemical and virological responses to lamivudine in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: a randomized trial. Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, Hayashi T, Morikawa H, Jomura H, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Shiomi S, Nishiguchi S. *Hepatol Res.* 2008 Sep;38(9):954-9.
- 20) Differences in molecular alterations of hepatocellular carcinoma between patients with a sustained virological response and those with hepatitis C virus infection. Hayashi T, Tamori A, Nishikawa M, Morikawa H, Enomoto M, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Kubo S, Nishiguchi S, Shiomi S. *Liver Int.* 2009 Jan;29(1):126-32.
- 21) Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. Otagawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Kawada N. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Feb;294(2):R311-20.
- 22) Mutational patterns of hepatitis B virus genome and clinical outcomes after emergence of drug-resistant variants during lamivudine therapy: analyses of the polymerase gene and full-length sequences. Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, Morikawa H, Habu D, Sakaguchi H, Takeda T, Seki S, Kawada N, Shiomi S, Nishiguchi S. *J Med Virol.* 2007 Nov;79(11):1664-70.
- 23) Characterization of vitamin A-storing cells in mouse fibrous kidneys using *Cygb/STAP* as a marker of activated stellate cells. Kida Y, Asahina K, Inoue K, Kawada N, Yoshizato K, Wake K, Sato T. *Arch Histol Cytol.* 2007 Jul;70(2):95-106.
- 24) Role of oxidative stress and Kupffer cells in hepatic fibrosis. Kawada N, Otagawa K. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Jun;22 Suppl 1:S85-6.
- 25) Expression of connective tissue growth factor in the human liver with idiopathic portal hypertension. Morikawa H, Tamori A, Nishiguchi S, Enomoto M, Habu D, Kawada N, Shiomi S. *Mol Med.* 2007 May-Jun;13(5-6):240-5.
- 26) Lamivudine and IFN-beta sequential therapy in HBe antigen-positive patients with chronic hepatitis B virus genotype C infection. Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, Hayashi T, Jomura H, Habu D, Sakaguchi H, Takeda T, Kawada N, Seki S, Shiomi S, Koh N, Nishiguchi S. *J Interferon Cytokine Res.* 2007 Mar;27(3):201-7.
- 27) Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Ikura Y, Ueda M, Arakawa T, Hato F, Kawada N. *Am J Pathol.* 2007 Mar;170(3):967-80.
- 28) Development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C who had a sustained virological response to interferon therapy: a multicenter, retrospective cohort study of 1124 patients. Kobayashi S, Takeda T,

- Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Habu D, Sakaguchi H, Kuroda T, Kioka K, Kim SR, Kanno T, Ueda T, Hirano M, Fujimoto S, Jomura H, Nishiguchi S, Seki S. *Liver Int.* 2007 Mar;27(2):186-91.
- 29) Inhibition of fibroblast to myofibroblast transition by halofuginone contributes to the chemotherapy-mediated antitumoral effect. Sheffer Y, Leon O, Pinthus JH, Nagler A, Mor Y, Genin O, Iluz M, Kawada N, Yoshizato K, Pines M. *Mol Cancer Ther.* 2007 Feb;6(2):570-7.
- 30) Thiopurine S-methyltransferase gene polymorphism in Japanese patients with autoimmune liver diseases. Tamori A, Shinzaki M, Kosaka S, Hayashi T, Iwai S, Enomoto M, Habu D, Sakaguchi H, Kawada N, Hino M, Shiomi S, Nishiguchi S. *Liver Int.* 2007 Feb;27(1):95-100.
- 31) Expression of large tenascin-C splice variants by hepatic stellate cells/myofibroblasts in chronic hepatitis C. El-Karef A, Kaito M, Tanaka H, Ikeda K, Nishioka T, Fujita N, Inada H, Adachi Y, Kawada N, Nakajima Y, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T. *J Hepatol.* 2007 Apr;46(4):664-73.
- 32) Laparoscopic observation of 2 cases of nodular regenerative hyperplasia of the liver. Fujii H, Sakaguchi H, Enomoto M, Yamamori K, Inagawa M, Watanabe T, Kawada N, Seki S, Arakawa T. *Gastrointest Endosc.* 2007 Jan;65(1):171-3.
- 33) Gene expression during chemically induced liver fibrosis: effect of halofuginone on TGF-beta signaling. Gnainsky Y, Kushnirsky Z, Bilu G, Hagai Y, Genina O, Volpin H, Bruck R, Spira G, Nagler A, Kawada N, Yoshizato K, Reinhardt DP, Libermann TA, Pines M. *Cell Tissue Res.* 2007 Apr;328(1):153-66.
- 34) Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. Kinoshita K, Imuro Y, Otagawa K, Saika S, Inagaki Y, Nakajima Y, Kawada N, Fujimoto J, Friedman SL, Ikeda K. *Gut.* 2007 May;56(5):706-14.
- 35) Identification of vitamin A-free cells in a stellate cell-enriched fraction of normal rat liver as myofibroblasts. Ogawa T, Tateno C, Asahina K, Fujii H, Kawada N, Obara M, Yoshizato K. *Histochem Cell Biol.* 2007 Feb;127(2):161-74.
- 36) Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre/loxP system to antagonise hepatic fibrosis. Kinoshita K, Imuro Y, Fujimoto J, Inagaki Y, Namikawa K, Kiyama H, Nakajima Y, Otagawa K, Kawada N, Friedman SL, Ikeda K. *Gut.* 2007 Mar;56(3):396-404.
- 37) Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Habu D, Tamori A, Sakaguchi H, Takeda T, Kawada N, Seki S, Nishiguchi S, Shiomi S, Hirota Y. *Hepatol Res.* 2006 Nov;36(3):201-8.
- 38) Human hepatic stellate cells are resistant to apoptosis: implications for human fibrogenic liver disease. Kawada N. *Gut.* 2006 Aug;55(8):1073-4.
- 39) High-resolution structure of human cytoglobin: identification of extra N- and C-termini and a new dimerization mode. Makino M, Sugimoto H, Sawai H, Kawada N, Yoshizato K, Shiro Y. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2006 Jun;62(Pt 6):671-7.
- 40) Cancer serum proteomics in gastroenterology. Kawada N. *Gastroenterology.* 2006 May;130(6):1917-9.
- 41) Localization of oxidized phosphatidylcholine in nonalcoholic fatty liver disease: impact on disease progression. Ikura Y, Ohsawa M, Suekane T, Fukushima H, Itabe H, Jomura H, Nishiguchi S, Inoue T, Naruko T, Ehara S, Kawada N, Arakawa T, Ueda M. *Hepatology.* 2006 Mar;43(3):506-14.
- 42) Does alcohol increase the risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus infection? Fukushima W, Tanaka T, Ohfuji S, Habu D, Tamori A, Kawada N, Sakaguchi H, Takeda T, Nishiguchi S, Seki S, Shiomi S, Hirota Y. *Hepatol Res.* 2006 Mar;34(3):141-9.
- 43) Interferon-beta plus ribavirin for patients with hepatitis C virus genotype 1: a randomised pilot trial. Enomoto M, Tamori A, Kawada N, Jomura H, Nishiguchi S, Saibara T, Onishi S, Mochida S, Fujiwara K. *Gut.* 2006 Jan;55(1):139-40.
- 44) Structural characterization of the proximal and distal histidine environment of cytoglobin and neuroglobin. Sawai H, Makino M, Mizutani Y, Ohta T, Sugimoto H, Uno T, Kawada N, Yoshizato K, Kitagawa T, Shiro Y. *Biochemistry.* 2005 Oct 11;44(40):13257-65.
- 45) BMP-7 opposes TGF-beta1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. Izumi N, Mizuguchi S, Inagaki Y, Saika S, Kawada N, Nakajima Y, Inoue K, Suehiro S, Friedman SL, Ikeda K. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jan;290(1):L120-6.
- 46) Analysis of proteins dominantly expressed in hepatic stellate cells of activated phenotype. Kawada N. *Methods Mol Med.* 2005;117:371-9.
- 47) Chemiluminescence enzyme immunoassay for monitoring hepatitis C virus core protein during interferon-alpha2b and ribavirin therapy in patients with genotype 1 and high viral loads. Enomoto M, Nishiguchi S, Tamori A, Kohmoto M, Habu D, Sakaguchi H, Takeda T, Kawada N, Seki S, Shiomi S. *J Med Virol.* 2005 Sep;77(1):77-82.
- 48) Cell type-specific intervention of transforming growth factor beta/Smad signaling suppresses collagen gene expression and hepatic fibrosis in mice. Inagaki Y, Kushida M, Higashi K, Itoh J, Higashiyama R, Hong YY, Kawada N, Namikawa K, Kiyama H, Bou-Gharios G, Watanabe T, Okazaki I, Ikeda K. *Gastroenterology.* 2005 Jul;129(1):259-68.

- 49) Effect of S-adenosyl-L-methionine on the activation, proliferation and contraction of hepatic stellate cells. Matsui H, Kawada N. *Eur J Pharmacol*. 2005 Feb 10;509(1):31-6.
- 50) Overexpression of thioredoxin prevents thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. Okuyama H, Nakamura H, Shimahara Y, Uyama N, Kwon YW, Kawada N, Yamaoka Y, Yodoi J. *J Hepatol*. 2005 Jan;42(1):117-23.
- 51) Quantitative detection of hepatitis B surface antigen by chemiluminescent microparticle immunoassay during lamivudine treatment of chronic hepatitis B virus carriers. Kohmoto M, Enomoto M, Tamori A, Habu D, Takeda T, Kawada N, Sakaguchi H, Seki S, Shiomi S, Nishiguchi S. *J Med Virol*. 2005 Feb;75(2):235-9.

## (2000-2004年の主要な論文: 抜粋)

- 1) Herb medicine Inchin-ko-to (TJ-135) regulates PDGF-BB-dependent signaling pathways of hepatic stellate cells in primary culture and attenuates development of liver fibrosis induced by thioacetamide administration in rats. Imanishi Y, Maeda N, Otagawa K, Seki S, Matsui H, Kawada N, Arakawa T. *J Hepatol*. 2004 Aug;41(2):242-50.
- 2) Structural basis of human cytoglobin for ligand binding. Sugimoto H, Makino M, Sawai H, Kawada N, Yoshizato K, Shiro Y. *J Mol Biol*. 2004 Jun 11;339(4):873-85.
- 3) Sulfur-containing amino acids attenuate the development of liver fibrosis in rats through down-regulation of stellate cell activation. Matsui H, Ikeda K, Nakajima Y, Horikawa S, Imanishi Y, Kawada N. *J Hepatol*. 2004 Jun;40(6):917-25.
- 4) Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. Nakatani K, Okuyama H, Shimahara Y, Saeki S, Kim DH, Nakajima Y, Seki S, Kawada N, Yoshizato K. *Lab Invest*. 2004 Jan;84(1):91-101.
- 5) Carbenoxolone inhibits DNA synthesis and collagen gene expression in rat hepatic stellate cells in culture. Uyama N, Shimahara Y, Okuyama H, Kawada N, Kamo S, Ikeda K, Yamaoka Y. *J Hepatol*. 2003 Nov;39(5):749-55.
- 6) Interferon alfa down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice. Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, Sheng Y, Higashi K, Ikeda K, Kawada N, Shirasaki F, Takehara K, Sugiyama K, Fujii M, Yamauchi H, Nakao A, de Crombrugge B, Watanabe T, Okazaki I. *Hepatology*. 2003 Oct;38(4):890-9.
- 7) Characterization of the heme environmental structure of cytoglobin, a fourth globin in humans. Sawai H, Kawada N, Yoshizato K, Nakajima H, Aono S, Shiro Y. *Biochemistry*. 2003 May 6;42(17):5133-42.
- 8) Overexpression of thioredoxin prevents acute hepatitis caused by thioacetamide or lipopolysaccharide in mice. Okuyama H, Nakamura H, Shimahara Y, Araya S, Kawada N, Yamaoka Y, Yodoi J. *Hepatology*. 2003 May;37(5):1015-25.
- 9) Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai K, Yoshizato K. *J Biol Chem*. 2003 May 23;278(21):18938-44.
- 10) Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF-alpha/kallikrein-mediated activation of latent TGF-beta. Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriwaki H, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S. *Gastroenterology*. 2002 Jul;123(1):352-64.
- 11) Regulation of cultured rat hepatocyte proliferation by stellate cells. Uyama N, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Okuyama H, Iimuro Y, Yamaoka Y. *J Hepatol*. 2002 May;36(5):590-9.
- 12) Kupffer cell-mediated recruitment of rat dendritic cells to the liver: roles of N-acetylgalactosamine-specific sugar receptors. Uwatoku R, Suematsu M, Ezaki T, Saiki T, Tsuiji M, Irimura T, Kawada N, Suganuma T, Naito M, Ando M, Matsuno K. *Gastroenterology*. 2001 Dec;121(6):1460-72.
- 13) Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF-beta. Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S. *Gastroenterology*. 2001 Jun;120(7):1784-800.
- 14) Regulation of cell growth by redox-mediated extracellular proteolysis of platelet-derived growth factor receptor beta. Okuyama H, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Kristensen DB, Yoshizato K, Uyama N, Yamaoka Y. *J Biol Chem*. 2001 Jul 27;276(30):28274-80.
- 15) Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, Yoshizato K. *J Biol Chem*. 2001 Jul 6;276(27):25318-23.
- 16) Clinicopathological characterization of prion: a novel marker of activated human hepatic stellate cells. Kitada T, Seki S, Ikeda K, Nakatani K, Sakaguchi H, Kawada N, Kadoya H, Kaneda K. *J Hepatol*. 2000 Nov;33(5):751-7.
- 17) Inhibition of hepatic stellate cell proliferation and activation by the semisynthetic analogue of fumagillin TNP-470 in rats. Wang YQ, Ikeda K, Ikebe T, Hirakawa K, Sowa M, Nakatani K, Kawada N, Kaneda K. *Hepatology*. 2000 Nov;32(5):980-9.
- 18) Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. Kristensen DB, Kawada N, Imamura K, Miyamoto Y, Tateno C, Seki S, Kuroki T, Yoshizato K. *Hepatology*. 2000 Aug;32(2):268-77.

平成21年度厚生労働科学研究補助金「肝炎等克服緊急対策事業」研究発表会  
平成22年1月20日 国立感染症研究所 共用第一会議室

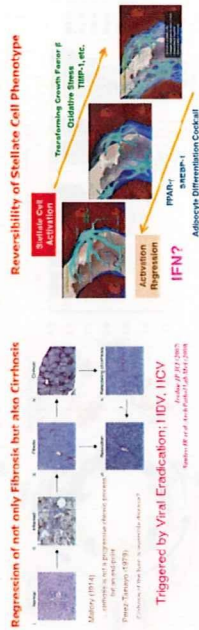
## インターフェロンの抗肝線維化分子機構の解明とその応用

(H20-肝炎—一般—003)

研究代表者：河田則文 (大阪市立大学肝胆腫瘍内科学)  
研究分担者：小川智弘 (大阪市立大学肝胆腫瘍内科学)  
田守昭博 (大阪市立大学肝胆腫瘍内科学)  
榎本大 (大阪市立大学肝胆腫瘍内科学)  
池田一雄 (名古屋大学機能解剖学)  
鈴木知比古 (株式会社医薬研究研究所)

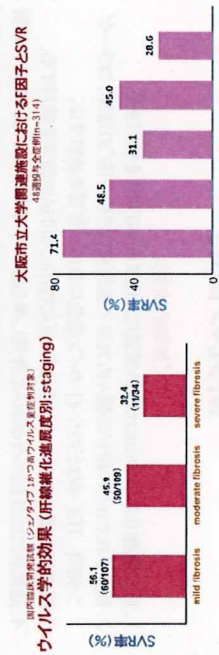
## 研究の背景 1

1. インターフェロン(interferon, IFN)は肝炎ウイルス駆除を主目的として臨床使用される。
2. 近年、IFNが直接的な肝線維化抑制効果を持つ事が示唆されてきたが、その分子機構は不明である。
3. 肝線維化は星細胞(HSC)と筋線維芽細胞(MFB)が主役の型コラーゲン蓄積症であり、IFNの本細胞群への直接的分子作用を検討する必要がある。



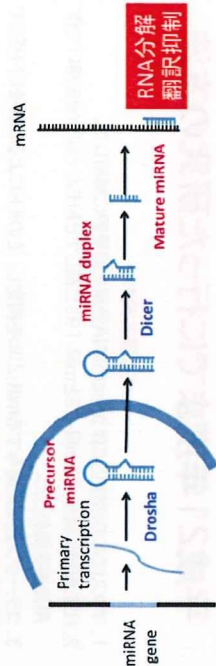
## 研究の背景 2

1. C型慢性肝炎では肝線維化進行群(stage 3-4)はHCVの遺伝子型に関わらずIFN治療によるウイルス駆除率が不良だが理論的背景は不明であり、ウイルス側因子のみでは説明できない。
2. 最近、宿主側の遺伝子因子として田中や溝上らがIL-28B遺伝子領域の多型(SNPs)がIFN+リバビリン療法の治療効果に関係することを報告した。



## 研究の背景 3

1. MicroRNAは20~25塩基程度の一本鎖RNAで、蛋白質をコードしないノンコーディングRNAの一種である。
2. 現在までに約10<sup>3</sup>個のmicroRNAがヒトで同定されており、mRNA分解や翻訳抑制により蛋白質発現に関与して細胞機能の調節を行うことが知られている。
3. miR-122がIFN治療効果に関係すること(Nature 2007)、miR-15bとmiR-16がHSCのアポトーシスに関係する可能性が報告された(J Hepatol 2009; FEBS Lett 2009)。





## 研究の目的

### <基礎的検討>

1. 肝星細胞(HSC)のmicroRNA発現に及ぼすIFNの効果を検討する。
2. 同定されたmicroRNAを種々の方法で強制発現させ、HSCの増殖、コラーゲン発現、TGF- $\beta$ などのサイトカイン産生に及ぼす影響を検討する。
3. 肝線維化動物モデルに対するIFN反応性microRNAの効果を検討する。
4. 最終的には当該microRNAに作用し得る経口可能で毒性のない低分子物質をスクリーニングし、IFNの副作用を軽減させ得る新しい治療法の開発に繋ぐ。

### <臨床的検討>

1. 線維化軽度群(stage 1-2)と進行群(stage 3-4)における肝組織中microRNA発現の相違を網羅的に比較検討する。同時に、肝線維化進行例でIFN反応を低下させる要因をmicroRNAの見地から明らかにする。

## 平成21年度までに行った研究の方法

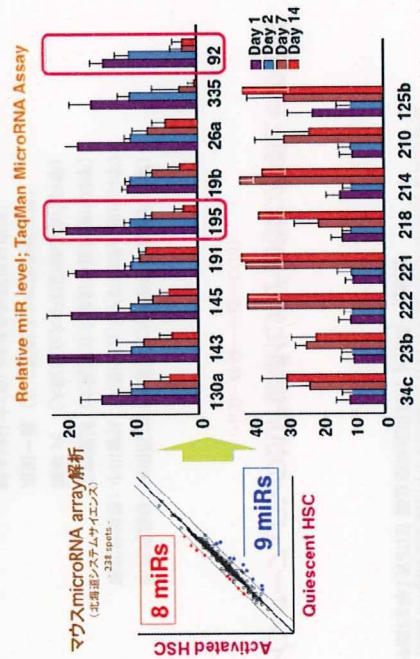
### <基礎的検討>

1. マウスHSCの活性化に伴うmicroRNA発現を網羅的に解析した。
2. HSC増殖に関与するmiR-92とmiR-195に関してヒトHSC cell lineを用いて作用機序を解析した。
3. コラーゲン発現に関与するmiR-29bを同定し、そのIFNによる制御をヒトHSCで検討した。
4. 同定されたmicroRNAsがターゲットとするmRNAの3'UTR領域への結合性をレポーターアッセイで確認した。

### <臨床的検討>

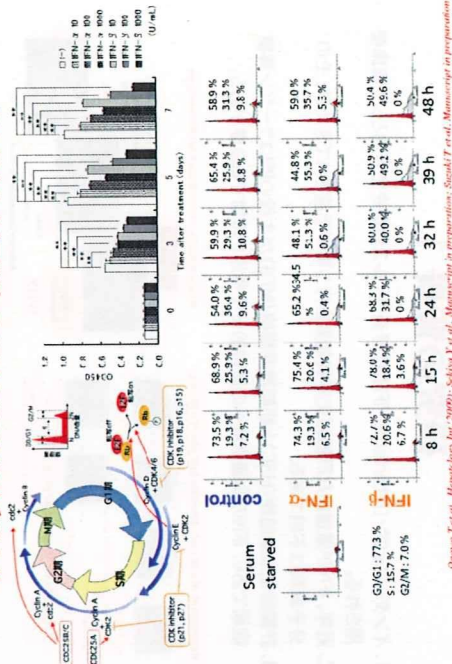
1. 線維化軽度群(stage 1-2)と進行群(stage 3-4)の肝生検肝組織からtotal RNAを抽出して、3D-Gene Human miRNA Oligo chip v10.1を用いて網羅的解析を行った。

## マウスHSCの活性化と伴に変動するmiRs



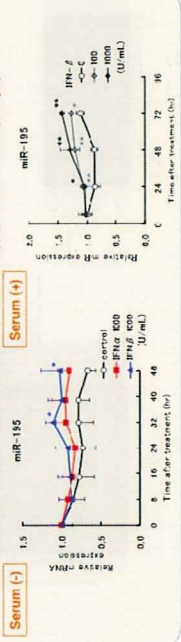
Rehli K et al., Manuscript in preparation

## IFNのHuman HSC増殖抑制作用

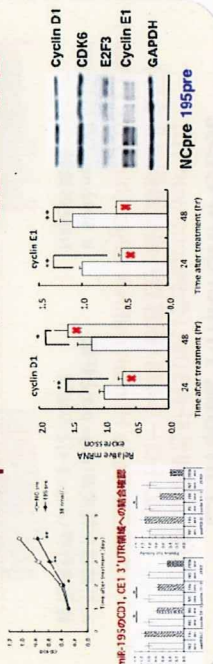


Osawa T et al., Hepatology Int 2009; Sakata Y et al., Manuscript in preparation

### IFNのhHSCのmiR-195発現への影響

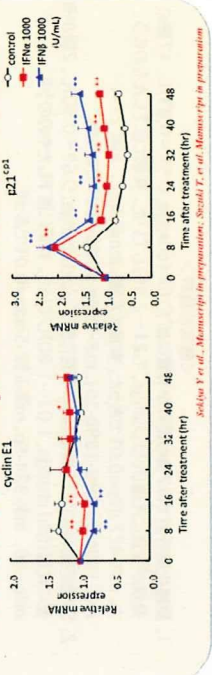


### miR-195 precursorのhHSC増殖への影響



Sekiba Y et al. *Manuscript in preparation*

### IFNのHSC Cell Cycle Protein発現への影響



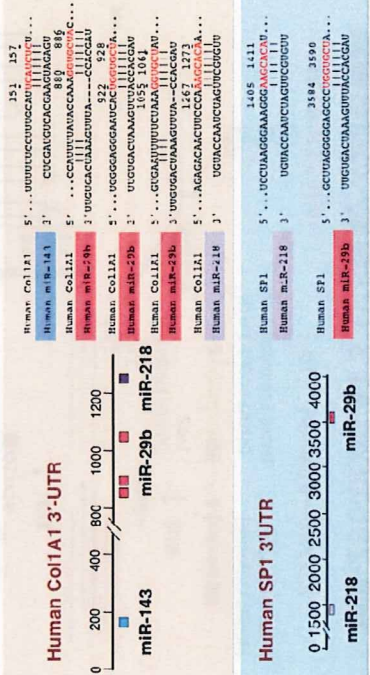
\* HSC活性化に伴って減少するmiR-92

miR-19, 17-5p, 18a, 20aとクラスターを形成  
E2F1発現への影響を介してHSC増殖を制御

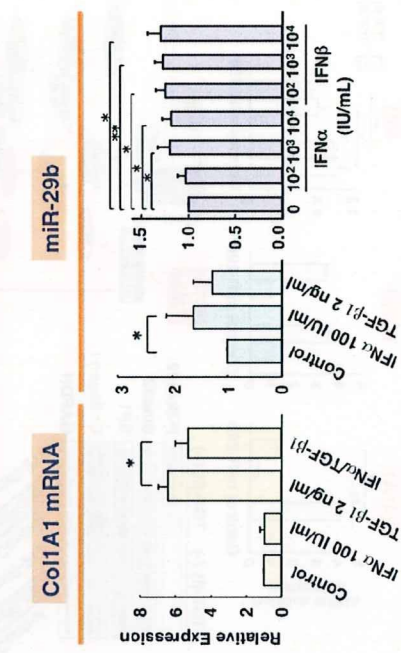
Kudo K et al. *Manuscript in preparation*

### Col1A1 & SP1 3'UTR におけるmiR予想結合領域

種間における保存性が高い  
miRNA予想結合領域

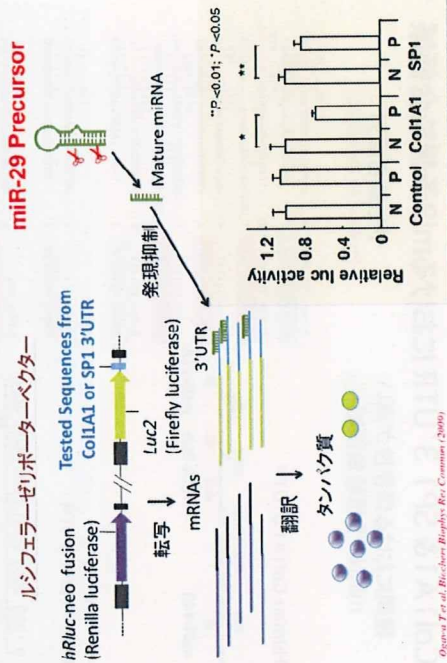


### Col1A1およびmiR-29b発現へのIFNの影響



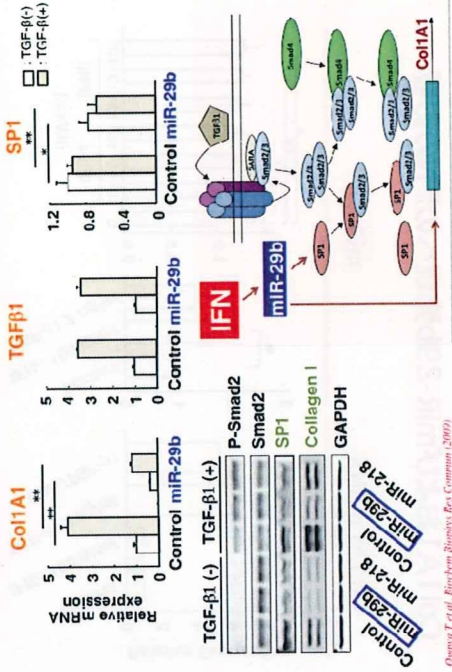
\*P < 0.01; P < 0.05  
Oyama T et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2009

### miR-29bのCol1A1 3'UTR領域への結合確認



Opawa T et al. *Biochem Biophys Res Commun* (2009)

### miR-29bのCol1A1およびSP1発現に対する影響

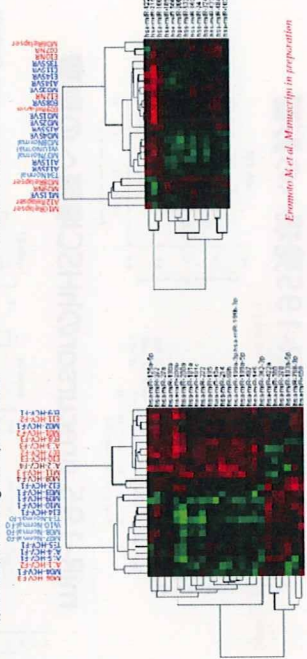


Opawa T et al. *Biochem Biophys Res Commun* (2009)

### ヒト肝組織中microRNA発現

対象: C型慢性肝炎30例 (全例genotype 1b)  
 コントロール4例 (転移性肝癌切除例の非癌部)  
 方法 3D-Gene Human miRNA Oligo chip v10.1 (東レ)

A. 肝線維化軽度群 (stage 0-2) と肝線維化進行群 (stage 3-4) との比較  
 B. SVRとnon-SVR (relapser/NR) との比較



Enomoto K et al. *Manuscript in preparation*

### まとめ

#### <基礎的検討>

1. HSCの活性化と伴に減少するmiR-92とmiR-195は星細胞の増殖を制御するmicroRNAであることが判明した。
2. IFNのHSC増殖抑制効果の一部はmiR-195を介することが示された。
3. miR-92はmiR-19, 17-5p, 18a, 20aとクラスターを形成し、E2F1発現制御を介してHSC増殖を制御する可能性が示唆された。
4. IFNによるコラーゲン産生の抑制はmiR-29bを介する直接的、あるいは、Sp-1発現を介した効果であることが示された。

#### <臨床的検討>

1. 線維化進行例では7種の発現が有意に低下 (fold change, 0.59~0.83) し、17種の発現が有意に亢進 (fold change, 1.21~2.59) していた。有意に低下したのものうち、miR-422aはp<0.01であった。有意に亢進したmiR-222, miR-214, miR-199a-3p (miR-199b-3p), miR-199a-5pはp<0.01であった。
2. SVR症例において1種のmiRが有意に低下 (fold change, 0.69~0.90) し、2種が有意に亢進 (fold change, 1.03~1.80) していた。有意に低下したのものうち、miR-660, miR-324-5p, miR-532-5pはp<0.01であった。

## 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課題番号：H20-肝炎一般-004研究代表者：佐田 通夫**I. 研究の意義**

肝硬変は肝疾患の終末像としてとらえられ、全身に種々の疾患を引き起こす。したがって多方面からの対策が肝要であるため以下の研究を実施した。

- (1) 肝炎・肝硬変に対する有効な再生医療やワクチンが存在しない。
- (2) 肝疾患に合併する様々な代謝異常については病態が解明されていない。
- (3) ウイルス肝炎の予後、増悪因子、合併症の実態が把握できておらず、国民の認知度も十分でない。
- (4) 肝炎ウイルス以外の肝臓の危険因子が明らかでない。
- (5) 自己免疫性肝疾患の病態や予後は十分には解明されていない。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) 肝炎・肝硬変に対する細胞移植療法およびワクチンの臨床応用
- (2) 肝疾患にみられる代謝異常の病態解析と治療介入の効果
- (3) ウイルス肝炎の予後、増悪因子、合併症の実態調査と国民への啓発活動
- (4) 肝臓に対する肝炎ウイルス以外の危険因子同定（生物統計学的解析・病理学的解析）
- (5) 自己免疫性肝疾患の病態解析と予後調査

**III. 2年間の研究成果**

・研究代表者・研究分担者(中村 徹・伊東 恭悟)

- (1-1) 血管内皮前駆細胞の純化と新たな投与経路を確立に成功した。この方法で治療した患者では、総ビリルビン値の低下、アルブミン値の増加、Child-Pugh スコアの改善、腹水の減少並びに内服利尿剤の減量が確認できた。
- (1-2) IFN 治療抵抗性の C 型慢性肝炎・肝硬変に対し、ペプチドワクチン療法を行った。観察期間において肝発癌例はなく、投与中止後に 2 例に発癌が認められた。以上より、発癌予防効果が示唆された。

・研究代表者・研究分担者(川口 巧・長尾 由実子・角間 辰之・清家 正隆)

- (2-1) 我々が開発した分岐鎖アミノ酸・亜鉛含有食品（アミノフィール®）の市販後全例調査を実施した。統計解析は生物統計学の専門家によって行われた。慢性肝疾患患者 203 名のうち解析対象者は 188 名で、非摂取群に対し摂取群に有効性と安全性が確認された。
- (2-2) 慢性肝疾患患者 9 名に対し、アミノフィール®摂取前と摂取後の 4 味（甘・塩・酸・苦）についての味覚定性定量検査並びに生化学検査を実施した。味覚感度並びに血清亜鉛値が有意に改善しており、アミノフィール®の有用性を確認した。
- (2-3) 分岐鎖アミノ酸および電気刺激運動療法が、肝予備能の改善、病態進展に関与する肥満やインスリン抵抗性を改善する事を明らかにした。
- (2-4) 肥満マウスの脾臓摘出によるインスリン抵抗性惹起と脂肪肝の存在を確認した。肥満の改善や脾臓の機能を回復するとインスリン抵抗性と脂肪肝が改善した。

・研究代表者・研究分担者(長尾 由実子・山崎 一美)

- (3-1) 肝疾患患者 1,336 例に対しビブリオ・バルニフィカス感染症に関する認知度を調査した結果、患者の認知度は極めて低かったため、国民への啓発目的で小冊子を作成した。平成 21 年度の再調査では認知度は 52.2%に向上、同一回答者では 78.4%に向上した。