

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

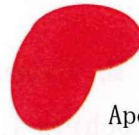
HCVに感染すると慢性肝炎から肝硬変に至り肝細胞癌に発育する。

計画

この三年で得られた事

感染防止機能

ウイルス遺伝子をターゲットに持つマイクロRNAをあらかじめ発現させておくと in vitro ウイルス感染直後の複製が阻害できた。



HCV感染にアポリポタンパク質Eに重要な働きをしている。さらに Apo-E の isoform の違いで感染性が異なる

正常肝 事を明らかにした。

ウイルス遺伝子の制御

HCVを認識するマイクロRNAの同定を行なった。
マウス肝に効率よく肝毒性のないように RNA 発現実験を行なった。
抗ウイルス機能を持つマイクロRNAのスクリーニングの系を確立した。



ヒト肝組織を持つキメラマウスを用いてマイクロRNAがウイルス効果を示す事を確認した。

慢性肝炎

新たな観点での肝炎治療

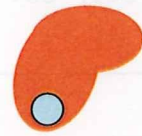
ペグインターフェロン+リバビリン併用療法の効果別にマイクロRNA発現プロファイルを作成した。
肝線維化程度別にマイクロRNA発現プロファイルを作成した。



薬剤応答予測方法を確立した。
肝線維化診断の布石を作成した。

肝硬変

肝癌と肝硬変のマイクロRNA発現プロファイルを作成した。
病理組織学的悪性度別のマイクロRNA発現プロファイルを作成した。



肝癌の発生に関係する遺伝子候補を同定するアルゴリズムの作成
肝癌と肝癌の悪性度に関するマイクロRNAの同定を行なった。

末梢血を用いた肝癌の診断法の作成

肝癌治療前後で発現の変化した末梢血中のマイクロRNAを同定した。

肝細胞癌

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

1995-1999 京都府立医科大学大学院医学研究科病理学専攻

1999-2001 フランス国立保険医学研究所

2004-2007 京都大学ウイルス研究所 ヒトがんウイルス研究部門

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

1995-1999 京都府立医科大学病理学第一 芦原 司、同内科学第三 岡上 武

1999-2001 フランス国立保険医学研究所 Christian Brechot、Patrizia Paterlini-Brechot

2004- 京都大学ウイルス研究所 下遠野邦忠、東海大学分子生命科学 井ノ上逸朗、田嶋敦、千葉東病院 西郷健一、大垣市民病院 豊田秀徳、

・主な研究課題

1995- HBV ゲノムの宿主遺伝子組み込みにおける発癌メカニズムの解析

2004- マイクロ RNA 発現プロファイルを用いた慢性肝疾患の進展、特に発癌メカニズムの解析、HCV 感染、複製の制御

・これまでの研究実績

1. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. *MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. Biomarkers. 2009; 14: 529-38.*
2. Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, and Shimotohno K. *Regulation of the Hepatitis C Virus genome replication by miR-199a**. *Journal of Hepatology. 2009; 50: 453-460*
3. Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, and Murakami Y. *Impact of Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Integration in Liver Tissue on Hepatocellular Carcinoma Development in Serologically HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients. Journal of Hepatology. 2008; 48: 43-50*
4. Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, and Inoue I. *Integration of Hepatitis B Virus DNA into the Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia (MLL4) Gene and Rearrangements of MLL4 in Human Hepatocellular Carcinoma. Human mutation. 2008; 29:703-708*
5. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, and Shimotohno K. *Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. Oncogene. 2006; 25: 2537-2545*
6. Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Brechot, C, and Paterlini-Brechot P. *Large scaled analysis of Hepatitis B Virus (HBV) DNA integration in*

- HBV-related hepatocellular carcinomas (HCC). Gut. 2005; 54: 1162-1168
7. Murakami Y, Minami M, Daimon Y, and Okanoue T. (2004) Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. J Med Virol. 2004; 72: 203-214
 8. Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. Oncogene. 2003 ; 22: 3911-6.
 9. Daimon Y, Yamanishi K, Murakami Y, Kirishima T, Ito Y, Minami M, Okanoue T. Novel single nucleotide polymorphisms of the cytokeratin 19 pseudogene are associated with primary biliary cirrhosis. Hepatol Res. 2003; 25: 281-286.
 10. Gozuacik D, Chami M, Lagorce D, Faivre J, Murakami Y, Poch O, Biermann E, Knippers R, Brechot C, Paterlini-Brechot P. Identification and functional characterization of a new member of the human Mcm protein family: hMcm8. Nucleic Acids Res. 2003; 31: 570-579.
 11. Gozuacik D, Murakami Y, Saigo K, Chami M, Mugnier C, Lagorce D, Okanoue T, Urashima T, Brechot C, Paterlini-Brechot P. Identification of human cancer-related genes by naturally occurring Hepatitis B Virus DNA tagging. Oncogene. 2001; 20: 6233-6240.
 12. Brechot C, Gozuacik D, Murakami Y, Paterlini-Brechot P. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). Semin Cancer Biol. 2000 ; 10: 211-231.

発明特許

1. C型肝炎ウイルスの複製を制御するマイクロRNA 特願2007-91723 (H19-3-30) 下遠野 邦忠、村上善基
2. 慢性C型肝炎の治療効果予測方法 特願2009-229977 (H21-9-7) 村上善基
3. 遺伝子発現解析を用いた肝線維化の評価方法 京都大学発明評価委員会より国内特許出願予定 村上善基 (京都大学との供願)

・平成22年度 肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

申請なし

non-coding RNAを用いた新たな慢性C型肝炎制御による治療法開発

平成21年度厚生労働省研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
(H19-肝炎-一般-006)

京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター
村上 善基

東海大学医学部分子生命科学
井ノ上逸朗

千葉工業大学附属総合研究所
下遠野邦忠

慢性ウイルス性肝炎の現状

抗ウイルス剤の薬効率が50-60%である。
継続化そのものを対象とした治療方法がない。

→ 病状を克服するための問題点
抗ウイルス剤の副作用が無視できない。
抗ウイルス剤の作用メカニズムが十分に解明されていない。

→ 本研究班の目標 (以下のマイクロRNAを同定する)

1. HCV複製の制御
2. 肝の繊維化過程への関与
3. 癌抑制剤に関与
4. 肝発癌に関与

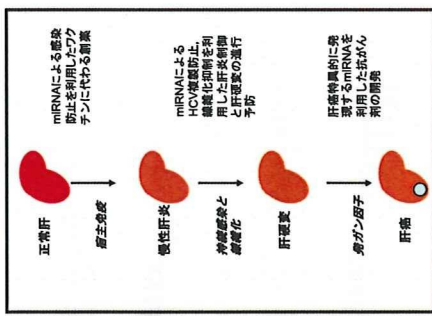
→ 知見を基にした病態説明

マイクロRNAはウイルス性肝炎の持続感染や
肝発癌を含めた病態の進展に関与している。

→ 臨床応用への可能性

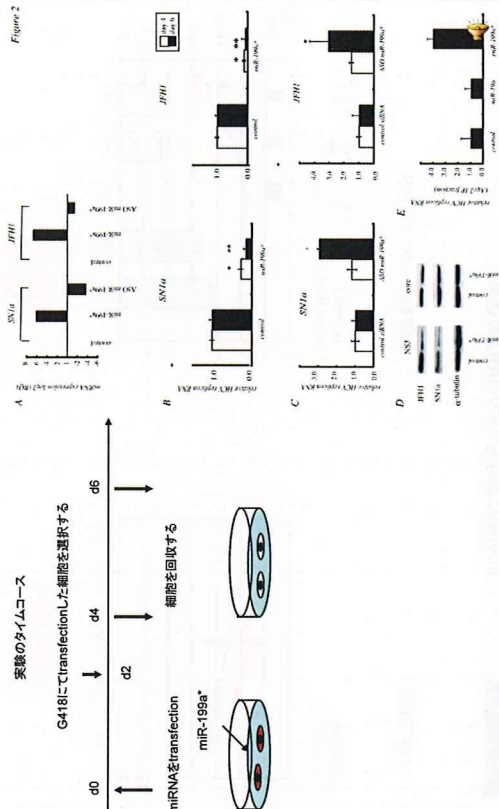
マイクロRNAを用いた診断
マイクロRNAを用いた慢性肝炎疾患の治療

ウイルス感染から肝発癌への経路



miR-199a*はHCV複製を制御する

(1) HCV複製制御

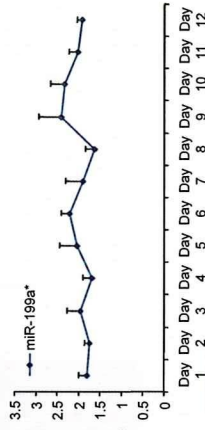


(1) HCV複製制御

標的臓器特異的な発現



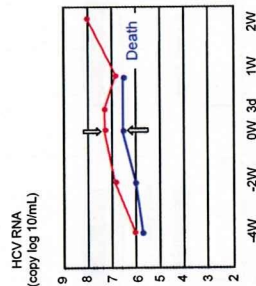
標的臓器での持続発現



in vivoにおけるマイクロRNAの効果

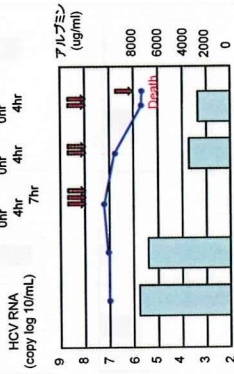
(1) HCV複製抑制

(1) 単回投与



miR-199a* 10 nmol
control 10 nmol

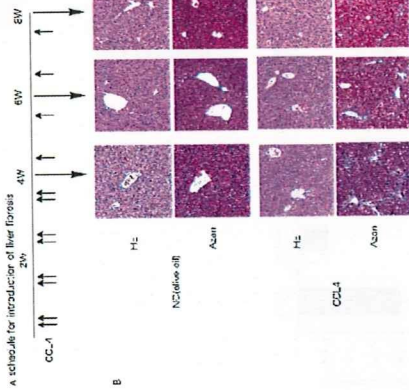
(2) 複数回投与 + カカテル投与



miR-199a* 7nmol
miR-B 7nmol

(2) 肝線維化

A schedule for introduction of liver fibrosis

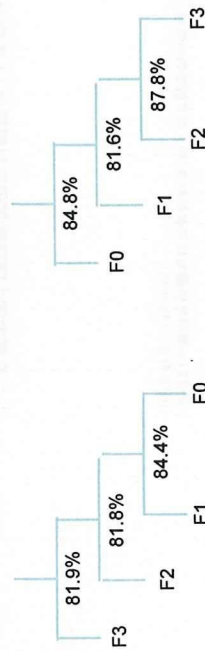


(2) 肝線維化

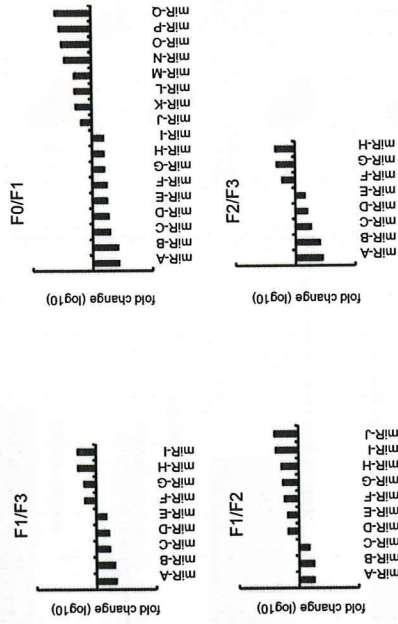
マイクロRNA発現プロファイルを用いた肝線維化程度のカテゴリ

grade	sample	M:F	age
F0	7	4:3	43.4
F1	56	27:29	58.2
F2	25	15:10	60.2
F3	17	7:10	63.4

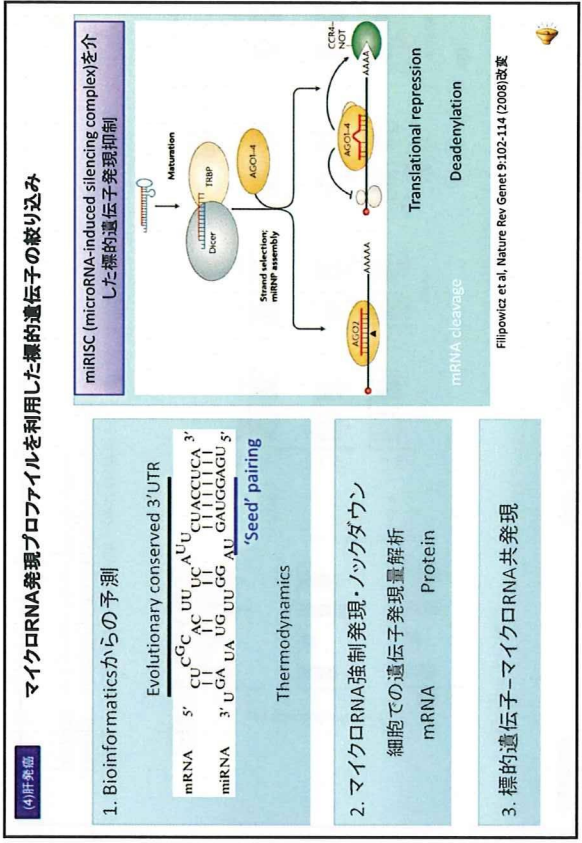
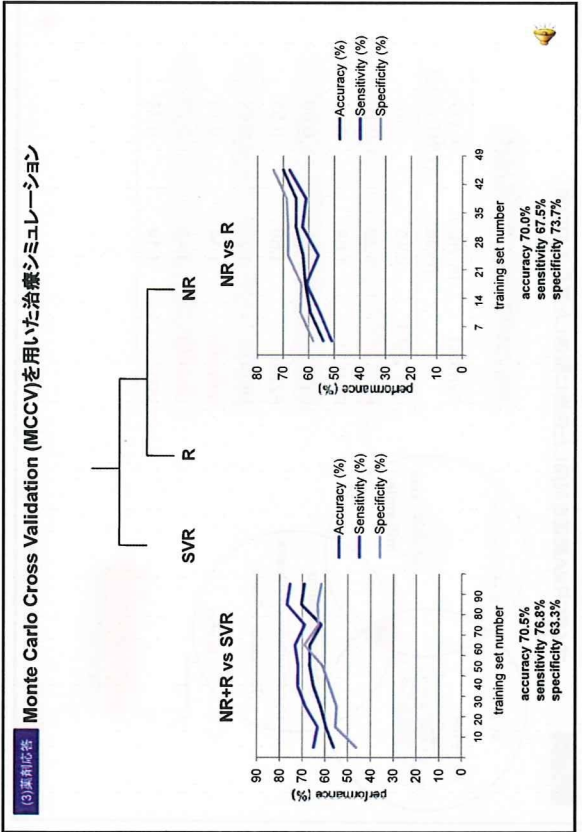
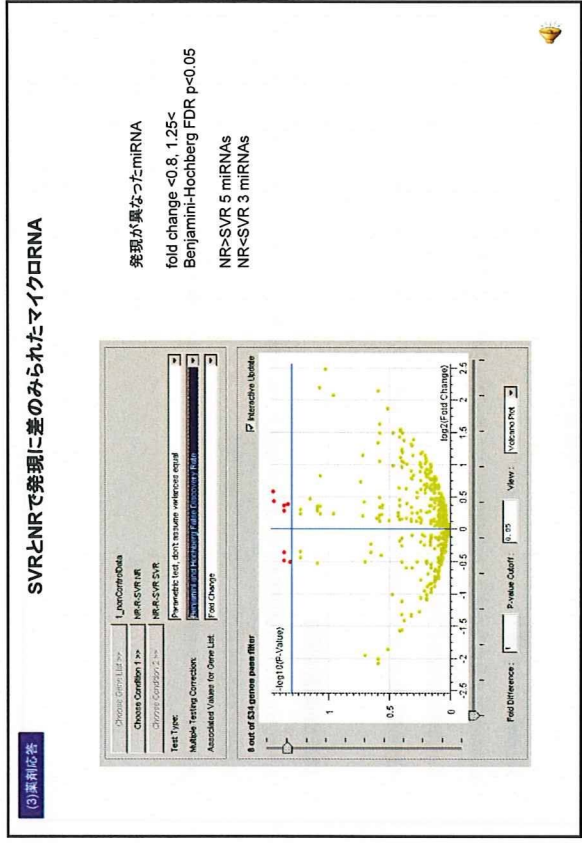
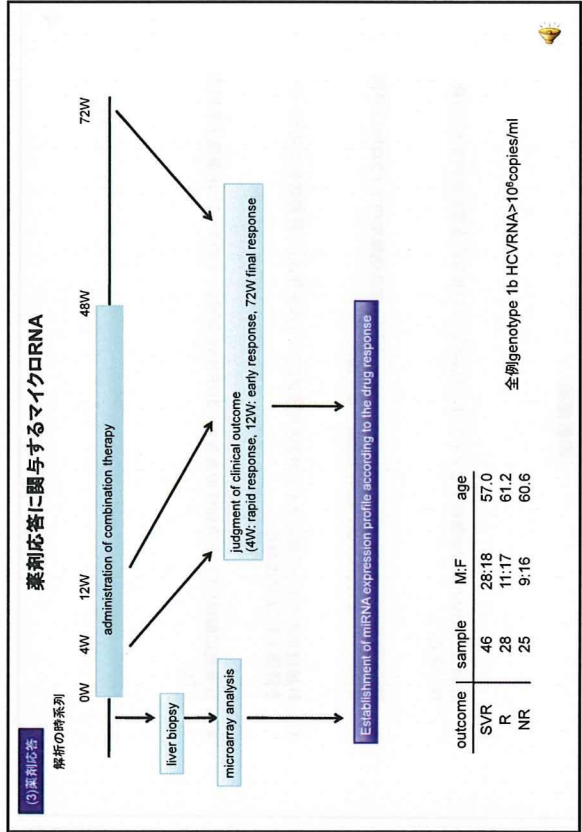
Leave One Out Cross Validation (LOOCV)を用いた2群間分類



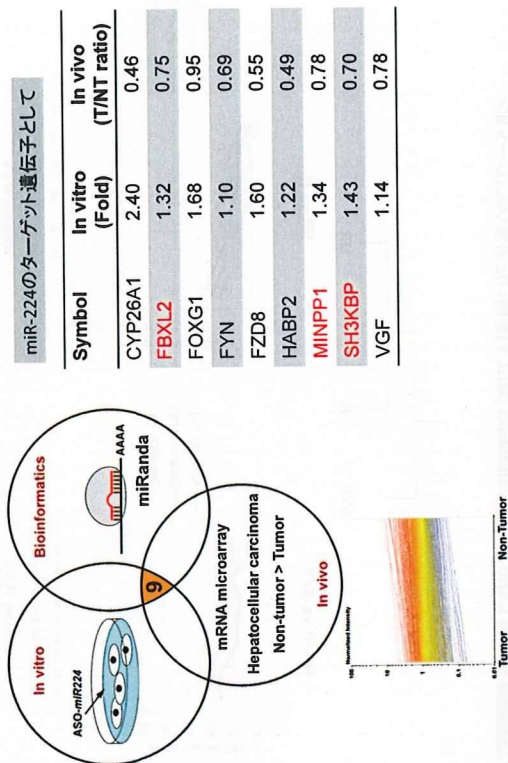
肝線維化別に発現に差のあるマイクロRNA



全例 genotype 1b HCV/RNA > 10⁶ copies/ml

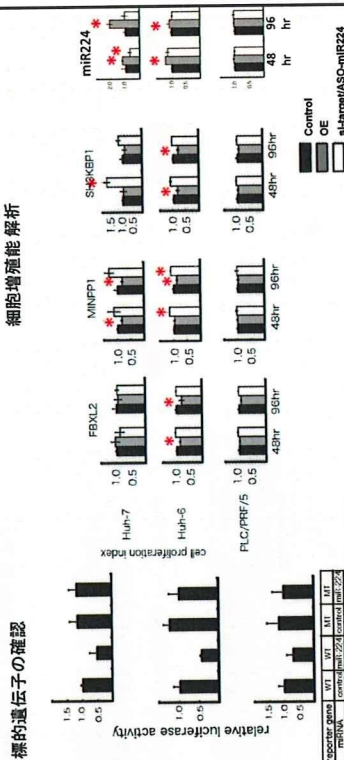


マイクロRNA発現を利用した発症に関係した遺伝子の検索



標的遺伝子の機能解析

細胞増殖能解析



FBXL2 F-box and leucine-rich repeat protein 2
MINPP1 multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase, 1
SH3KBP1 SH3-domain kinase binding protein 1

解析結果

1. *in vitro*でHCVの複製を制御するマイクロRNAは*in vivo*でHCVの複製を制御できる可能性がある。
2. 慢性C型肝炎に対するペグインターフェロン+リビリン療法効果異別のマイクロRNA発現プロファイルを作成し、高い確率で効果予想が出来た。
3. 肝線維化のステージ別のマイクロRNA発現プロファイルを作成し、肝線維化のステージを評価することが出来た。
4. 肝発症に関係している可能性のあるマイクロRNAを同定し、そのターゲット遺伝子を同定した。

今後の予定

- (1) 診断ツールの開発**
1. 治療効果予測方法を確立し臨床情報に応じた治療方法選択方法を開発する。
 2. 肝線維化の遺伝子診断の確立。
 3. 肝発症に関与したマイクロRNAの標的遺伝子の効率のよいスクリーニング系の確立。
- (2) RNA治療の開発**
1. *in vivo*でのHCV複製抑制をするための条件設定、HCV複製制御する新たなマイクロRNAの同定。
 2. 線維化の制御を目標とした遺伝子治療の確立。
 3. インターフェロン効果を増強するまたはそれに変わる抗ウイルス療法の開発。

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：B 型及び C 型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の病態解明とその予防・治療法の開発に関する研究

課題番号：H19-肝炎-一般-007

研究代表者：林 紀夫

I. 研究の意義

- (1) ウイルス性肝炎を基盤とした肝がんの発生とそれによる死亡が増加している
- (2) ウイルス性肝炎からの肝がんの発生のメカニズムが不明であり、予防法が確立していない
- (3) 肝がんは時間的・空間的に多発性を示し、再発・転移を制御する治療法が確立していない

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 肝炎ウイルスの増殖・発がん機構の解明と発がん抑止法の開発
- (2) 肝がんの分子病態の網羅的解析と新規診断マーカー・治療法の開発
- (3) 肝がんの免疫病態の解明と再発抑止を目指したがん免疫治療法の探索

III. 3 年間の研究成果

・主任研究者

- (1) 肝がんに対する樹状細胞治療のアジュバントとして α GalCer が有用であることを解明 (林)
- (2) 1 型 IFN が NK 細胞を介したがん治療に有用であることを解明 (林)
- (3) MICA 分泌阻害活性のある薬剤の候補を探索 (林)
- (4) C 型肝炎における樹状細胞機能の低下のメカニズムを Toll 様レセプター経路の視点から解明 (林)

・分担研究者

- (1) HCV コア蛋白の SPP による成熟機構を解明 (松浦)
- (2) HCV コアによる肝脂肪化、発がんにおける PA28 γ による分解の意義の解明 (松浦)
- (3) HCV コア蛋白アミノ酸置換により TGF β シグナルの抑制と STAT3 活性化が起こることを解明 (松浦)
- (4) HCV コア蛋白による病態形成機構をプロテオーム解析により網羅的に解析 (小池)
- (5) HCV コアによるミトコンドリア機能障害におけるプロヒビチンの意義の解明 (小池)
- (6) HBV preS1 に結合する宿主因子の候補の同定 (上田)
- (7) 血清プロテオーム解析により肝がん患者の診断マーカーとして C3a フラグメントを同定 (井戸)
- (8) 炎症性発がんにおけるオステアクチビンの意義の解明 (井戸)
- (9) 肝がん患者における HLA-A24 拘束性エピトープを同定 (中本)
- (10) 肝がんにおける CTL エピトープとして MRP31 の意義の解明 (中本)
- (11) 1 型 IFN により樹状細胞による免疫治療効果が増強することを解明 (広石)

- (12) 肝がん患者において可溶性 MICA が増加しており治療により低下することを解明 (竹原)
- (13) 肝がんからの MICA の分泌に ADAM ファミリー蛋白が関与することを同定 (竹原)
- (14) 抗がん剤治療が ADAM ファミリーを抑制し肝がんの免疫病態を改善することを解明 (竹原)
- (15) 肝がん患者において制御性 T 細胞が増加していることを解明 (考藤)
- (16) 肝がんに対する治療介入により制御性 T 細胞が減少することを示した (考藤)

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) HCV コア蛋白成熟を標的とした治療法の開発
- (2) HCV コア感染による病態形成の包括的な理解のもとに、治療法を構築する
- (3) HBV のエントリー機構を解明し、HBV 感染の成立と発がんのメカニズムを解明する
- (4) 肝臓の線維化と発がんにおけるオステオアクチビンの意義を解明する
- (5) 肝がんに対する CTL エピトープの全容を解明し、ペプチド治療法を開発する
- (6) ADAM ファミリー (MICA 分泌) を標的とした肝がん治療法を開発する
- (7) 肝発がんにおける制御性 T 細胞の意義を解明する
- (8) 肝がんに対する樹状細胞とアジュバントの併用治療法を開発する

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 肝発がんのメカニズムが解明され、発がんや再発の予防法が提示できる可能性がある
- (2) 肝がんの早期診断血清マーカーが開発される可能性がある
- (3) 肝がんの免疫病態が解明され、新規の免疫治療法が開発される可能性がある
- (4) HCV コアアミノ酸置換の病態形成における意義が解明される可能性がある

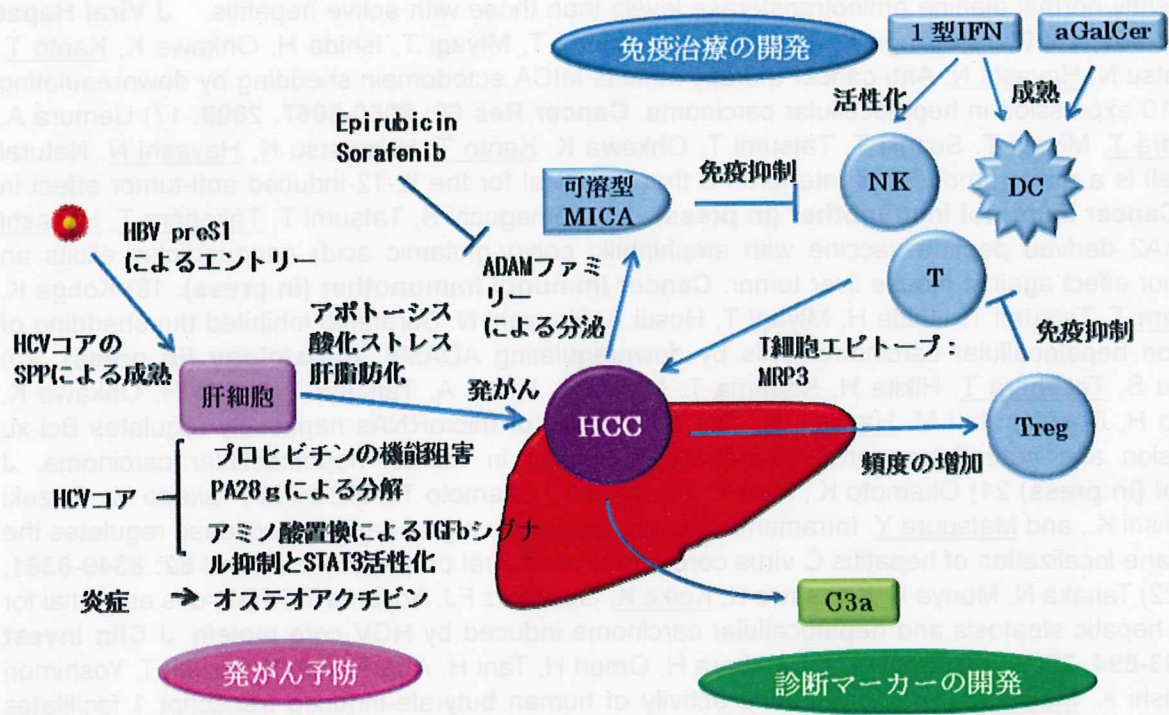
VI. 本研究の成果 (発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

1) Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Yamaguchi S, Sakamori R, Hiramatsu N, Kanto T, Ohkawa K, Hayashi N. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4⁺ CD25⁺ T cells with PD-1-dependent regulatory activities. *Immunology* **120**: 73-82, 2007. 2) Takehara T, Uemura A, Tatsumi T, Suzuki T, Kimura R, Shiotani A, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Natural killer cell-mediated ablation of metastatic liver tumors by hydrodynamic injection of IFN α gene to mice. *Int J Cancer* **120**: 1252-1260, 2007. 3) Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Sakamori R, Ohkawa K, Kohga K, Uemura A, Hayashi N. Intrahepatic delivery of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor. *Hepatology* **45**: 22-30, 2007. 4) Miyatake H, Kanto T, Inoue M, Sakakibara M, Kaimori A, Yakushijin T, Itose I, Miyazaki M, Kuzushita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* **14**: 404-412, 2007. 5) Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Miyagi T, Jinushi M, Sakamori R, Kohga K, Uemura A, Ohkawa K, Storkus WJ, Hayashi N. Injection of IL-12 gene-transduced dendritic cells into mouse liver tumor lesions activates both innate and acquired immunity. *Gene Ther* **14**: 863-871, 2007. 6) Itose I, Kanto T, Inoue M, Miyazaki M, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Oze T, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Involvement of dendritic cell frequency and function in virological relapse in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients. *J Med Virol* **79**: 511-521, 2007. 7) Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sakamori R, Uemura A, Mizushima T, Ohkawa K, Storkus WJ, Hayashi N. Immunotherapy of murine colon cancer using receptor tyrosine kinase EphA2-derived peptide-pulsed dendritic cell vaccines. *Cancer* **110**: 1469-1477, 2007. 8) Ae

T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. **J Virol**, **2007**, **81**:8953-8966. 7) Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, Ishida Y, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Ido A, Stuver SO, Tsubouchi H. Early diagnosis potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. **Hepatology** **2007**; **45**: 948-56. 8) Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Marukawa Y, Kitahara M, Mukaida N and Kaneko S: Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. **J. Immunol.** **178**: 574-583, **2007**. 9) Miyazaki M, Kanto T, Inoue M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Kakita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I. **J Med Virol** **80**:980-988, **2008**. 10) Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Hikita H, Kohga K, Uemura A, Sakamori R, Ohkawa K, Hayashi N. Dendritic cell-based vaccines suppress metastatic liver tumor via activation of local innate and acquired immunity. **Cancer Immunol Immunother** **57**: 1861-1869, **2008**. 11) Tanaka H, Imai Y, Hiramatsu N, Ito Y, Imanaka K, Oshita M, Hijioka T, Katayama K, Yabuuchi I, Yoshihara H, Inoue A, Kato M, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Hayashi N, Tsukuma H. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990 to 2003. **Ann Intern Med** **148**: 820-826, **2008**. 12) Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Kasugai T, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Serum levels of soluble MHC class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and the changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. **Cancer Sci** **99** 1643-1649, **2008**. 13) Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Yamamoto M, Fujita Y, Miyagi T, Ohkawa K, Hayashi N. Decreased expressions of CD1d molecule on liver dendritic cells in subcutaneous tumor bearing mice. **J Hepatol** **49**:779-786, **2008**. 14) Sasakawa A, Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Yamamoto M, Ohkawa K, Miyagi T, Hayashi N. Activated liver dendritic cells generates strong acquired immunity in α -galactosylceramide treatment. **J Hepatol** **50**: 1155-1162, **2009**. 15) Itose I, Kanto T, Kakita N, Takebe S, Inoue M, Higashitani K, Miyazaki M, Miyatake H, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Enhanced ability of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients with persistently normal alanine aminotransferase levels than those with active hepatitis. **J Viral Hepat** **16**: 844-852, **2009**. 16) Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. **Cancer Res** **69**: 8050-8057, **2009**. 17) Uemura A, Takehara T, Miyagi T, Suzuki T, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Natural killer cell is a major producer of interferon α that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice. **Cancer Immunol Immunother (in press)**. 18) Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Hayashi N. EphA2 derived peptide vaccine with amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles elicits an antitumor effect against mouse liver tumor. **Cancer Immunol Immunother (in press)**. 19) Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ishida H, Miyagi T, Hosui A, Hayashi N. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. **Hepatology (in press)**. 20) Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol (in press)** 21) Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. **J Virol** **82**: 8349-8361, **2008**. 22) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- α is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. **J Clin Invest** **118**: 683-694, **2008**. 23) Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. **J Virol** **83**: 10427-10436, **2009**. 24) Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. **J Virol** **83**: 7959-7969, **2009**. 25) Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T,

Miyamura T, Matsuura Y, Suzuki T. Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28-Dependent Mechanism. **J. Virol** 83: 2389-2392, 2009. 26) Moriya K., Miyoshi H., Tsutsumi T., Shinzawa S., Fujie H., Shintani Y., Yotsuyanagi H., Moriishi K., Matsuura Y., Suzuki T., Miyamura T., Koike K. Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. **Am J Pathol** 175: 1515-1524, 2009. 27) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. **Hepatology** 50: 378-386, 2009. 28) Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, Ishida Y, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Ido A, Stuver SO, Tsubouchi H. Early diagnosis potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. **Hepatology** 45: 948-956, 2007. 29) Uto H, Stuver SO, Hayashi K, Kumagai K, Sasaki F, Kanmura S, Numata M, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kusumoto K, Hasuike S, Nagata K, Kohara M, Tsugouchi H. Increased rate of death related to presence of viremia among hepatitis C virus antibody-positive subjects in a community-based cohort study. **Hepatology** 50: 393-9, 2009. 30) Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Marukawa Y, Kitahara M, Mukaida N, Kaneko S. Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. **J Immunol** 178: 574-583, 2007. 31) Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S. Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 49: 946-954, 2008. 32) 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.** 68: 10267-10279, 2008. 33) Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N. Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. **J Immunol** 178: 574-583, 2009.

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等



○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 49 年 7 月 大阪大学医学部第一内科
 昭和 54 年 9 月 米国テキサス大学医学部生化学教室
 昭和 56 年 5 月 大阪大学医学部第一内科
 平成 10 年 9 月 大阪大学大学院医学系研究科分子制御治療学
 平成 17 年 6 月 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

鎌田武信, JA Peterson, 笠原彰紀, 佐々木 裕

・主な研究課題

アルコール性肝障害の病態解明
 ウイルス性肝炎・肝がんの病態解明と新しい治療法の開発

・これまでの研究実績

1. ***Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. Hepatology (in press)***
2. BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. ***Hepatology (in press)***
3. ***Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. Cancer Res 69: 8050-8057, 2009.***
4. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. ***Hepatology 50: 1217-1226, 2009.***
5. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. ***Hepatology 46: 1564-1573, 2007.***
6. ***Intrahepatic delivery of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor. Hepatology 45: 22-30, 2007.***
7. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. ***J Immunol 173: 6072-6081, 2004.***
8. Concanavarin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an anti-tumor effect in murine liver. ***Hepatology 40: 1190-1196, 2004.***
9. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. ***Gastroenterology 127: 1189-1197, 2004.***
10. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. ***J Biol Chem 279: 11719-11726, 2004.***
11. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC

class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. **J Immunol 171: 5423-5429, 2003.**

12. Hepatitis C virus core protein differentially regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli. **J Biol Chem 278: 28562-28571, 2003.**
13. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on interferon α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: Impairment in chronic hepatitis C virus infection. **J Immunol 170:1249-1256, 2003.**
14. Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. **Cancer Res 61:7563-7567, 2001.**

・平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

有 「ウイルス性肝炎からの発がん及び肝がん再発の抑制に関する研究 (22200501)」

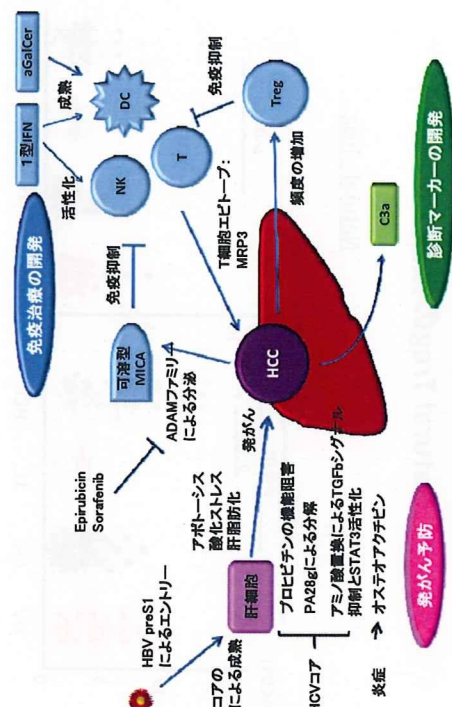
B型及びC型肝炎ウイルスの感染による肝がん発症の病態解明とその予防・治療法の開発に関する研究

代表研究者
林 紀夫

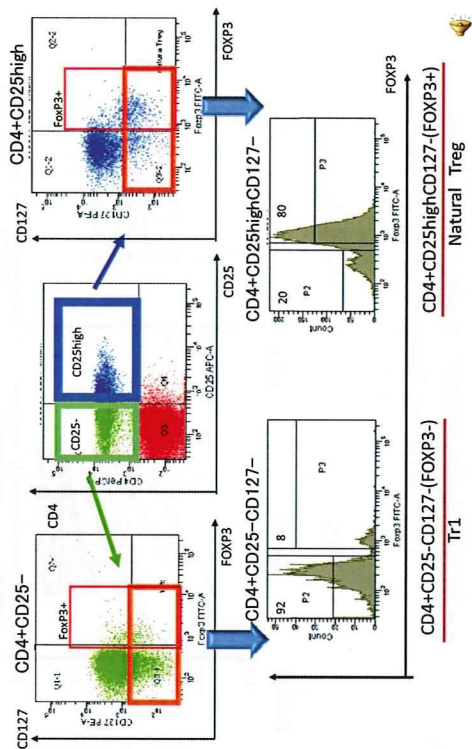
分担研究者

- 松浦 善治: 大阪大学微生物病研究所 分子ウイルス分野
- 上田 啓次: 浜松医科大学医学部 感染症学
- 小池 和彦: 東京大学医学部 感染症内科
- 井戸 彰雄: 鹿児島大学大学院医学総合研究科 消化器疾患・生活習慣病学
- 中本 安成: 金沢大学医学部附属病院 消化器内科学
- 広石 和正: 昭和大学医学部 第二内科
- 竹原 徹郎: 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学
- 考藤 達哉: 大阪大学大学院医学系研究科 消化器内科学

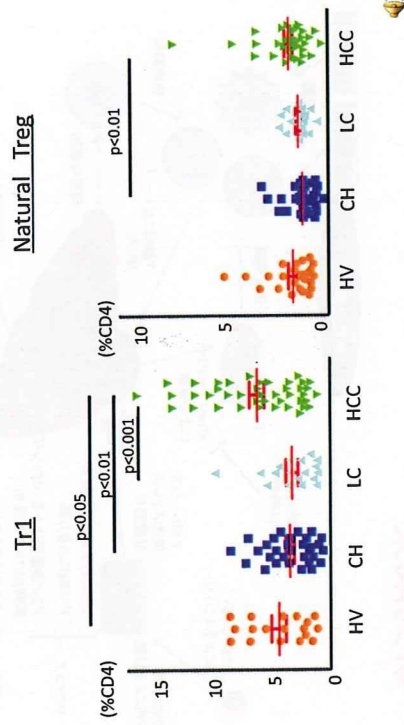
研究成果



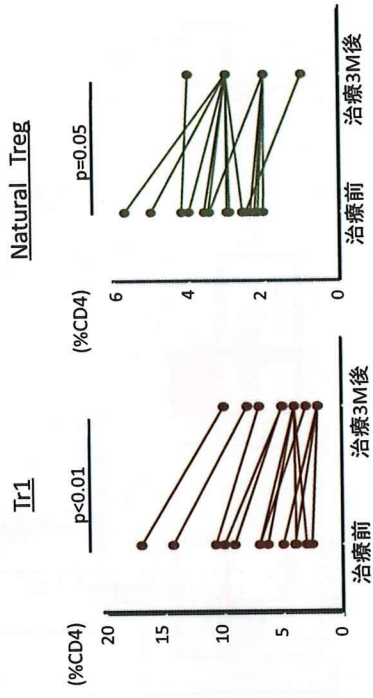
CD127を加えたTregサブセットの同定



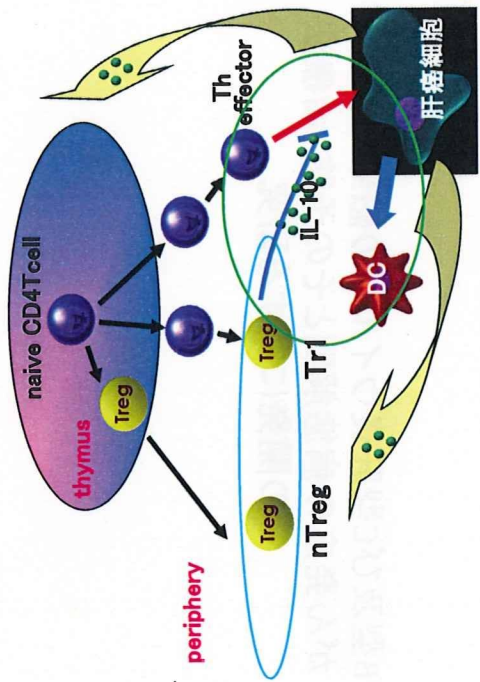
C型慢性肝疾患におけるTr1と Natural Tregの頻度



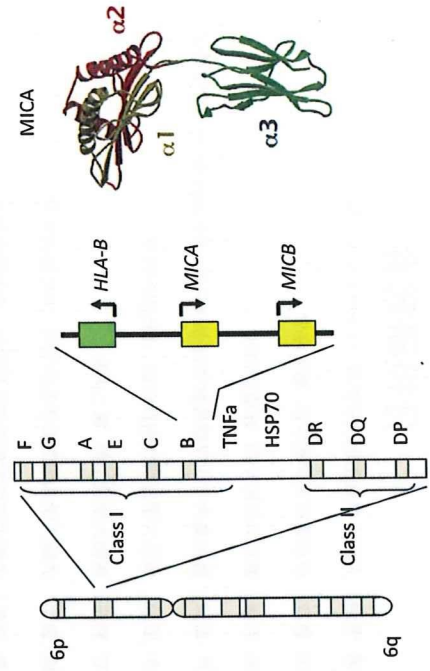
RFAによるcomplete ablationによる Tr1/Natural Tregの頻度変化



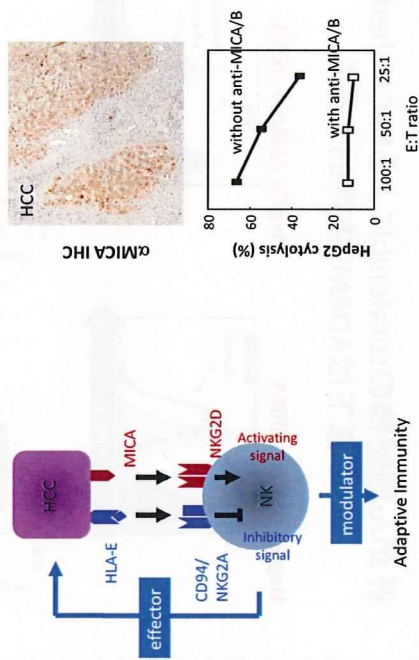
腫瘍細胞によるTr1を介した抗腫瘍免疫抑制



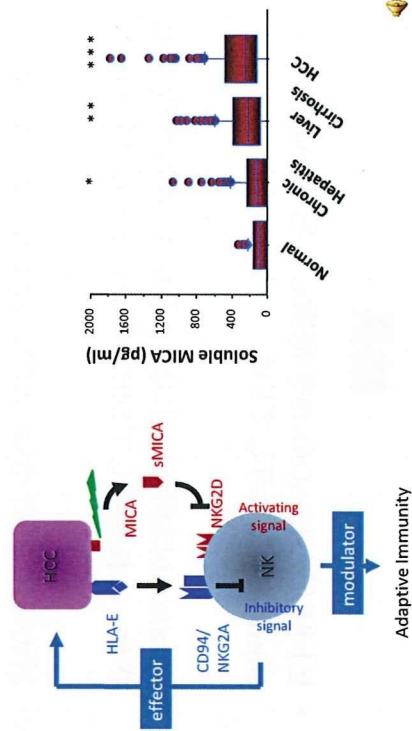
MICA: MHC class I-related chain gene A



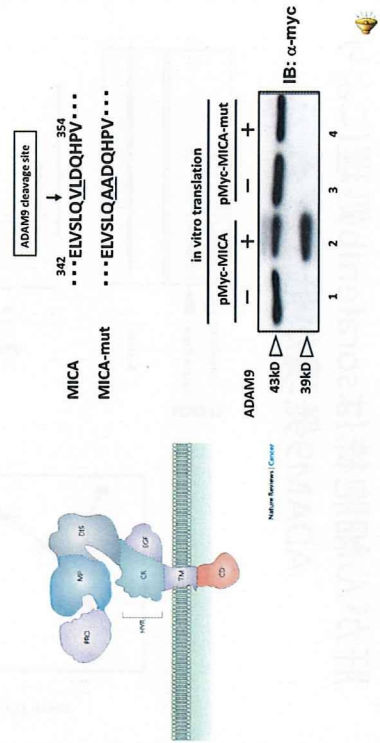
MICA: NK細胞による肝がん認識機構



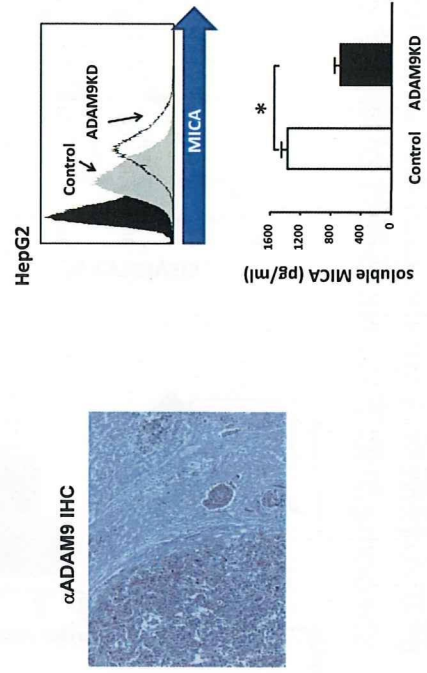
肝疾患の進展における可溶性MICAの分泌



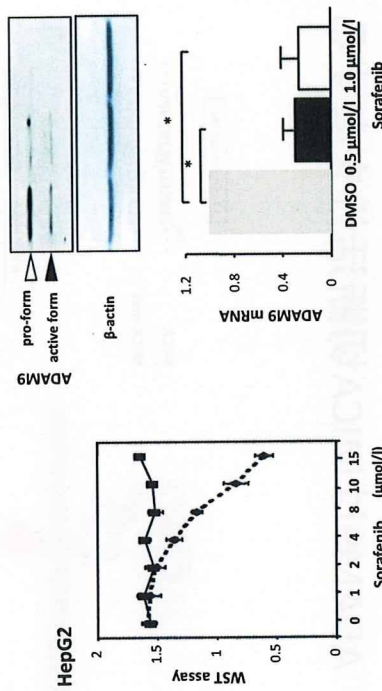
ADAM9はMICA切断活性を有する



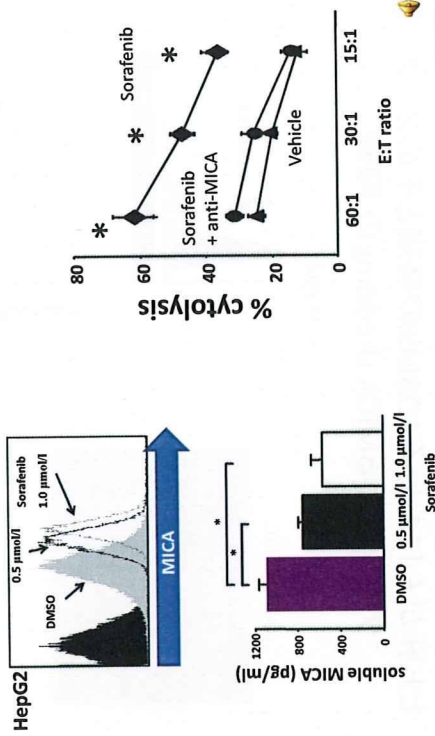
ヒト肝がんにおけるADAM9の発現とそのノックダウンによるMICA sheddingの抑制



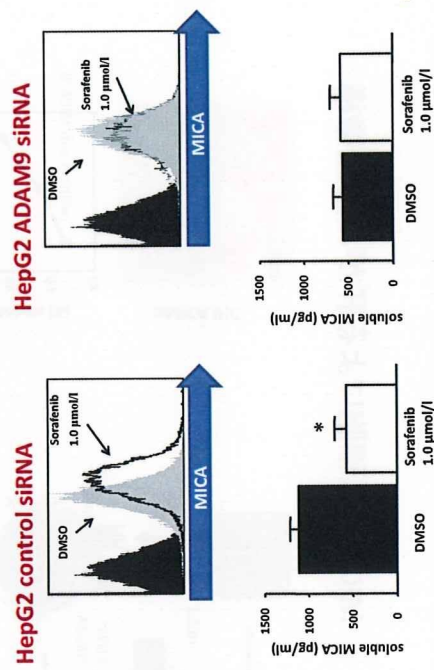
肝がん細胞株はsorafenib処理によりADAM9発現が低下する



肝がん細胞株はsorafenib処理によりMICA sheddingが低下し、NK感受性が増強する



肝がん細胞株のsorafenibによるMICA sheddingの低下はADAM9依存的である



結果

- ヒト肝がんはADAM9を発現しており、MICAのsheddingに関与していた
- Sorafenibは肝がんにおけるADAM9の発現を低下させ、これを介してMICAのsheddingを抑制した
- 肝がんにおけるMICAのsheddingにはADAM9が関与しており、この発現を制御する薬剤は肝がんの免疫病態を改善する可能性がある

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：ウイルス肝炎による肝がんの再発防止メカニズムの解明に関する研究課題番号：H19-肝炎-一般-008代表研究者：小俣 政男**I. 研究の意義**

- (1) 診断・治療の進歩にもかかわらず肝がんの長期予後はなお不良である。
- (2) その最大の原因は年率 15-20%に及ぶ治療後再発である。
- (3) 長期予後改善には肝がん再発メカニズムを明らかにし、防止することが急務である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 肝がん再発に関連する遺伝素因解明のため SNP (一塩基多型) を解析する。
- (2) 肝がん再発機序解明のため、肝がん結節における遺伝子異常を解析する。
- (3) 個別的再発防止策の確立を目指す。

III. 3年間の研究成果

・研究代表者

- (1) 肝がん細胞株における遺伝子異常を網羅的に解析した。
- (2) 肝がん患者における網羅的 SNP 解析を行った。

・研究分担者(吉田・金井・浅岡)

- (1) ヒト肝がん結節における遺伝子増幅、欠損を解析した。
- (2) 肝がん結節遺伝子の LOH 解析により異時性再発のクロナリティを検討した。

・研究分担者(椎名・建石・石橋・正木・金井)

- (1) 肝がん患者における網羅的 SNP とその検証を行った。
- (2) 肝がん治療後の予後について臨床的解析を行った。
- (3) 進行肝がんに対する治療法の検討を行った。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) 肝癌再発リスクと関連した SNP の検証と機能解析。
- (2) ポリクローナルな肝癌再発に関する危険因子、予後規定因子の解析。
- (3) 具体的肝癌再発防止策の取り組み。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 再発高危険度患者の鑑別と対策
- (2) 肝癌再発機序解明により抜本的再発防止策を構築

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

小俣政男 (研究代表者)、吉田晴彦、椎名秀一朗、建石良介、浅岡良成 (研究分担者)

- Ohki T, Tateishi R, Shiina S, Goto E, Sato T, Nakagawa H, Masuzaki R, Goto T, Hamamura K, Kanai F, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Visceral fat accumulation is an independent risk factor of hepatocellular carcinoma recurrence after curative treatment in NASH-suspected patients. *Gut* 2009;58:839-844.
- Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sato T, Ohki T, Imamura J, Goto T, Kanai F, Kato N, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients by transient elastography. *Hepatology* 2009;49:1954-1961.
- Tateishi R, Shiina S, Ohki T, Sato T, Masuzaki R, Imamura J, Goto E, Goto T, Yoshida H, Obi S, Sato S, Kanai F, Yoshida H, Omata M. Treatment strategy for hepatocellular carcinoma: expanding the indications for radiofrequency ablation. *J Gastroenterol* 2009;44:S142-S146.
- Sato T, Tateishi R, Yoshida H, Ohki T, Masuzaki R, Imamura J, Goto T, Kanai F, Obi S, Kato N, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Ultrasound surveillance for early detection of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2009; in press.
- Ohki T, Tateishi R, Goto E, Sato T, Masuzaki R, Imamura J, Goto T, Kanai F, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Influence of anti-HBc seropositivity on the risk of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients after adjusting for confounding factors. *J Viral Hepat* 2009; in press.
- Ohki T, Tateishi R, Sato T, Masuzaki R, Imamura J, Goto T, Yamashiki N, Yoshida H, Kanai F, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Obesity is an independent risk factor for hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:459-464.
- Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Yoshida H, Sato S, Kato N, Kanai F, Sugioka Y, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Risk assessment of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients by transient elastography. *J Clin Gastroenterol* 2008;42:839-843.
- Yoshida H, Yoshida H, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Tateishi R, Goto T, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Safety and efficacy of lamivudine after radiofrequency ablation in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* 2008;2:89-94.
- Tateishi R, Yoshida H, Matsuyama Y, Mine N, Kondo Y, Omata M. Diagnostic accuracy of tumor markers for hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Hepatol Int* 2008;2:17-30.
- Masuzaki R, Yoshida H, Tateishi R, Shiina S, Omata M. Hepatocellular carcinoma in viral hepatitis:improving standard therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008;22:1137-1151.
- Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sato T, Ohki T, Goto T, Yoshida H, Kanai F, Sugioka Y, Ikeda H, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Comparison of liver biopsy and transient elastography based on clinical relevance. *Can J Gastroenterol* 2008;22 :753-757.
- Kondo Y, Yoshida H, Tateishi R, Shiina S, Kawabe T, Omata M. Percutaneous radiofrequency ablation of liver cancer in the hepatic dome using the intrapleural fluid infusion technique. *Br J Surg* 2008;95:996-1004.
- Kanda M, Tateishi R, Yoshida H, Sato T, Masuzaki R, Ohki T, Imamura J, Goto T, Yoshida H, Hamamura K, Obi S, Kanai F, Shiina S, Omata M. Extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma: incidence and risk factors. *Liver Int* 2008;28:1256-1263.
- Masuzaki R, Omata M. Treatment of hepatocellular carcinoma. *Indian J Gastroenterol* 2008;27:113-122.

- Kondo Y, Yoshida H, Tateishi R, Shiina S, Mine N, Yamashiki N, Sato S, Kato N, Kanai F, Yanase M, Yoshida H, Akamatsu M, Teratani T, Kawabe T, Omata M. Health-related quality of life of chronic liver disease patients with and without hepatocellular carcinoma. **J Gastroenterol Hepatol** 2007;22:197-203.
- Ohki T, Tateishi R, Shiina S, Sato T, Masuzaki R, Yoshida H, Kanai F, Obi S, Yoshida H, Omata M. Obesity did not diminish the efficacy of percutaneous ablation for hepatocellular carcinoma. **Liver Int** 2007;27:360-367.
- Yamashiki N, Yoshida H, Tateishi R, Shiina S, Teratani T, Yoshida H, Kondo Y, Oki T, Kawabe T, Omata M. Recurrent hepatocellular carcinoma has an increased risk of subsequent recurrence after curative treatment. **J Gastroenterol Hepatol** 2007;22:2155-60.
- Koike Y, Yoshida H, Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Akamatsu M, Tateishi R, Fujishima T, Hoshida Y, Kanda M, Ishikawa T, Shiratori Y, Omata M. Changes in hepatic functional reserve after percutaneous tumor ablation for hepatocellular carcinoma: long-term follow up for 227 consecutive patients with a single lesion. **Hepatol Int** 2007;1:295-301.

石橋大海 (研究分担者)

- Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Higashi M, Ishibashi H. Effective prediction of outcome of combination therapy with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin in Japanese patients with genotype-1 chronic hepatitis C using early viral kinetics and new indices. **J Gastroenterol** 2009;44:338-345.
- Nomura H, Miyagi Y, Tanimoto H, Ishibashi H. Impact of early viral kinetics on pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin therapy in Japanese patients with genotype 2 chronic hepatitis C. **J Viral Hepat** 2009;16:346-351.
- Kusumoto K, Yatsushashi H, Nakao R, Hamada R, Fukuda M, Tamada Y, Taura N, Komori A, Daikoku M, Hamasaki K, Nakao K, Ishibashi H, Miyakawa Y, Eguchi K. Detection of HBV core promoter and precore mutations helps distinguish flares of chronic hepatitis from acute hepatitis B. **J Gastroenterol Hepatol** 2008;23:790-793.
- Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Miyazoe S, Nakao K, Yatsushashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Polymorphisms of interleukin-1beta in Japanese patients with hepatitis B virus infection. **J Hepatol** 2007;46:381-386.
- Takii Y, Abiru S, Fujioka H, Nakamura M, Komori A, Ito M, Taniguchi K, Daikoku M, Meda Y, Ohata K, Yano K, Shimoda S, Yatsushashi H, Ishibashi H, Migita K. Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human hepatocellular carcinoma. **Liver Int** 2007;27:989-996.

正木尚彦 (研究分担者)

- 長沖祐子、正木尚彦、野崎雄一、赤澤直樹、大嶋隆夫、櫻井俊之、永田尚義、矢郷祐三、酒匂赤人、小早川雅男、笹島圭太、秋山純一、柳瀬幹雄、今村雅俊、上村直実。肝硬変の予後に関する実態調査—1990～1997年と2001～2006年との比較—。肝硬変の成因別実態 2008(恩地森一、青柳豊、西口修平、道堯浩二郎 編) 中外医学社、東京、pp116-120、2008。
- 西村 崇、正木尚彦。原発性胆汁性肝硬変、自己免疫性肝炎に合併した肝細胞癌。日本臨牀 vol.67 増刊号 3 肝癌—基礎・臨床研究のアップデート—、日本臨牀社、大阪、pp445-451、2009。

金井文彦 (研究分担者)

- Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Muroyama R, Fukai K, Imazeki F, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M. Down-regulation of hedgehog-interacting protein through genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma. **Clin Cancer Res** 2008;14:3768-3776.
- Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Tateishi R, Sanada M, Nannya Y, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Yokosuka O, Ogawa S, Omata M. Gain of GRHL2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 2008;49:746-757.
- Imamura J, Tateishi R, Shiina S, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Goto T, Yoshida H, Kanai F, Hamamura K, Obi S, Yoshida H, Omata M. Neoplastic seeding after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. **Am J Gastroenterol** 2008;103:3057-3062.
- Hua R, Tanaka Y, Fukai K, Tada M, Seto M, Asaoka Y, Ohta M, Goto T, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M. Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using TaqMan-minor groove binder probes. **Clin Chim Acta** 2008;395:151-154.
- Li Y, Tanaka Y, Tada M, Hua R, Seto M, Asaoka Y, Ohta M, Kanai F, Yoshida H, Kawabe T, Sano T, Motojima T, Yokosuka O, Omata M. Absence of the AKT1 pleckstrin homology domain mutation in Japanese gastrointestinal and liver cancer patients. **APMIS** 2008;116:931-933.