

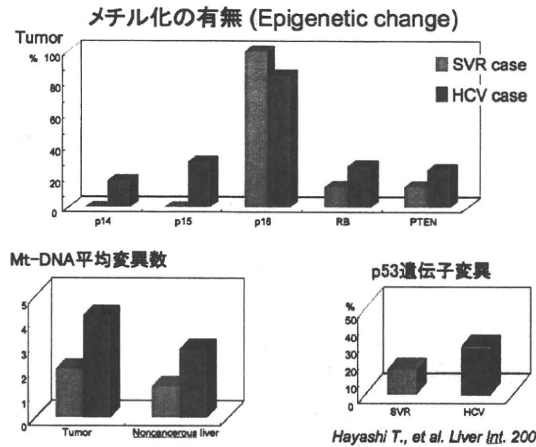
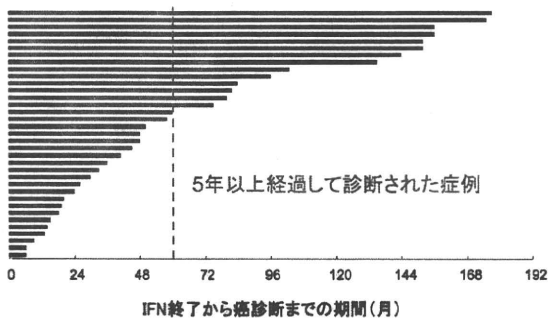
非C型肝炎 63例(HBs 抗原陰性かつ HCV 抗体陰性)を対象とした。

### C. 研究結果

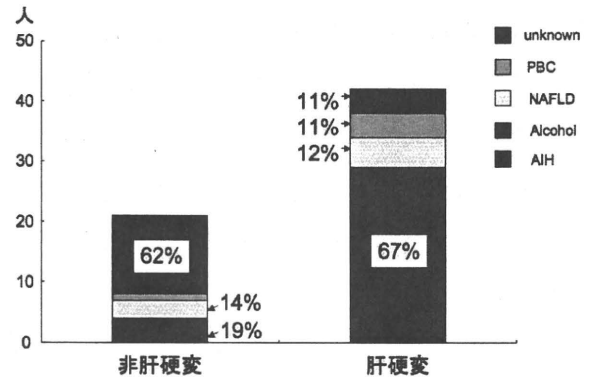
13例のSVR肝癌と44例のHCV肝癌について肝癌組織と担癌肝組織における遺伝子変化を解析した。癌部の遺伝子メチル化頻度は、(SVR肝癌、HCV肝癌)の各々においてp14 (18%:0%), p15 (30%:0%), p16 (77%:100%), RB (27%:14%), PTEN (25%:14%)であった(図2)。非癌部ではp14 (9%:0%), p15 (32%:0%), p16 (30%:15%), RB (25%:15%), PTEN (11%:0%)であった。p53遺伝子変異はHCV肝癌44例中12例(27%)検出され、SVR肝癌では14例中2例(14%)検出された。Mt-DNA変異数の平均はHCV肝癌4.2、SVR肝癌2.0であり非癌部ではそれぞれ2.8, 1.3であった(図)。SVR例での臨床背景の比較では性別、平均年齢、HBc抗体陽性率、IFN前の肝線維化に統計学的な有意差を認めた。すなわち発癌例では男性が多く高齢者、HBc抗体陽性例が多かった。また肝線維化の進行した患者での発癌が多かった。非発癌例ではIFN前後の線維化程度は2.2から1.0へ改善した。一方、発癌例では2.6から2.4へ改善していた。

#### 当院にて診断・治療されたSVR肝癌35例

性別: 男性31例、女性4例  
年齢: 64歳(54-68)



非B非C型肝炎; 平均年齢 70 (45-87) 性別は(女 11、男 52) 肝硬変例 42 例あり、背景肝疾患の主因はアルコール性肝障害 32 例、非アルコール性脂肪肝関連 8 例、PBC 5 例、AIH 1 例、17 名が不明。BMI 24.1 (17.3-34.1), HBc 抗体陽性例 24 例, AFP 100 ng/ml 以上 9 例, PIVKA-II 200 mAU/ml 以上 40 例, 平均腫瘍径 42 mm (10-155), であった。



非B非C型肝炎の臨床背景: SVR 肝癌はすべて非硬変肝に発生したため、非硬変に発生した非B非C型肝炎 21 例と SVR 肝癌と比較した。

SVR 肝癌: IFN 終了後の平均期間 116 ヶ月 (48-186)。平均年齢 68 (55-76) 性別は(女 2、男 13) HBc 抗体陽性例 9 例, AFP 100ng/ml 以上 4 例, PIVKA-II 200mAU/ml 以上 7 例, 平均腫瘍径 31mm (17-55), 背景肝に脂肪沈着症例 2 例、鉄沈着例 1 例、正常肝 1 例。非B非C型肝炎; 平均年齢 75 (45-89) 性別は(女 3、男 18) HBc 抗体陽性例 9 例, AFP 100ng/ml 以上 2 例, PIVKA-II 200mAU/ml 以上 16 例, 平均腫瘍径 60mm (20-155), 背景肝疾患ではアルコール

性肝障害 5 例、非アルコール性脂肪沈着 3 例、PBC1 例、原因不明の慢性肝疾患 6 例、正常肝 3 例であった。

#### D. 考察

SVR 症例において治療前の HCV による影響がどの位の期間、持続するのかは明らかではない。本研究では高齢男性や HBc 抗体陽性例さらに肝線維化進展例では、HCV 消失後に肝癌が発症する可能性が示唆された。さらに HCV 消失後の肝線維化の改善具合が不良な症例において発癌することが明らかとなった。

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 Mt-DNA の変異が両群で異なっていた。以上より SVR 肝癌は C 型肝癌と異なる遺伝子変化を背景として発生している可能性が示唆された。一方、非 B 非 C 型肝癌例と抗ウイルス治療終了後 4 年以上経て発癌した SVR 肝癌例を比較したが、性別や腫瘍マーカーの上昇パターンなど類似点を認めた。すなわち SVR 肝癌には非 B 非 C 型肝癌と区別できない症例が含まれているものと推測された。

#### E. 結論

SVR 症例からの肝発癌危険群の設定が可能と考えられた。一方、SVR 肝癌は非硬変非 B 非 C 型肝癌と類似点を示し、HCV 感染とは無関係に発症する症例が存在することも示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Investigation of Interferon- $\alpha$  Response by a Single Amino Acid Substitution of Nonstructural Protein 5A in Hepatitis C Virus Infected Patients. Noguchi N, Tamori A, Ogura N, Hori Y, Ikeda S, Nishiguchi S. J Interferon Cytokine Res. 2011 in press
2. Association of IL28B polymorphism with response to

pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Nishimura-Sakurai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Ito Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M. J Med Virol. 2011 83: 871-878.

3. Sequences in the Interferon Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Izumi N. J Med Virol. 2011 83: 445-52.
4. Real-time tissue elastography as a tool for the noninvasive assessment of liver stiffness in patients with chronic hepatitis C. Morikawa H, Fukuda K, Kobayashi S, Fujii H, Iwai S, Enomoto M, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. J Gastroenterol. 2010 46: 350-8.
5. Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). Izumi N, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. Hepatol Res. 2010 40: 347-68.
6. Comparison of the effect of BCAA granules on between decompensated and compensated cirrhosis. Habu D, Nishiguchi S, Nakatani S, Lee C, Enomoto M, Tamori A, Takeda T, Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Kawamura E, Shiomi S. Hepatogastroenterology. 2009; 56: 1719-1723.
7. Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus. Enomoto M, Tamori A, Kawada N. Rev Recent Clin Trials. 2009; 4:179-184.
8. Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD. Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. Gut. 2009;58: 1566-1567.
9. 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*. 2010;17: 123-129
10. 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;15:790-797.
  11. Development of pouchitis with combination therapy with peg-interferon alpha-2b and ribavirin for chronic hepatitis C in a patient with ulcerative colitis who underwent pouch surgery. Morimoto K, Yamagami H, Hosomi S, Ohira M, Suekane T, Kamata N, Sogawa M, Watanabe K, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, Tamori A, Oshitani N, Arakawa T. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104: 1609-1610.
  12. 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: 608-614.
  13. 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 Virology* 2009; 81: 1009-1014
  14. Hepatocellular carcinoma (HCC) recurring 10 years after clearance of hepatitis B surface antigen and 20 years after resection of hepatitis B virus-related HCC. Shinkawa H, Nakai T, Tamori A, Tanaka H, Takemura S, Ohba K, Uenishi T, Ogawa M, Yamamoto S, Hai S, Ichikawa T, Kodai S, Hirohashi K, Wakasa K, Kubo S. *Int J Clin Oncol*. 2008; 13:562-566.
  15. Sildenafil-induced severe cholestatic hepatotoxicity. Enomoto M, Sakaguchi H, Ominami M, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *Am J Gastroenterol*. 2009;104:254-255.
  16. Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis. Enomoto M, Nakamishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N. *Ann Intern Med*. 2008;149:912-913.
  17. 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;28:1314-1315.
  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; 38:860-868.
  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; 38:954-959.
  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; 29:126-132.
  21. Serial changes in expression of functionally clustered genes in progression of liver fibrosis in hepatitis C patients. Takahara Y, Takahashi M, Zhang QW, Wagatsuma H, Mori M, Tamori A, Shiomi S, Nishiguchi S. *World J Gastroenterol*. 2008; 14:2010-2022.
  22. PTPRC (CD45) variation and disease association

studied using single nucleotide polymorphism tagging. Hennig BJ, Fry AE, Hirai K, Tahara H, Tamori A, Moller M, Hopkin J, Hill AV, Bodmer W, Beverley P, Tchilian E. Tissue Antigens. 2008; 71:458-463.

23. 大阪市におけるC型肝炎ウイルス検診と肝炎フォローアップ事業の検討. 松本健二、高橋峰子、田守昭博、西口修平. 日本公衆衛生学会 2008; 7: 35-39.

24. 遡及調査にて判明した輸血後B型肝炎ウイルス感染の1例. 田守昭博、藤野恵三、尾島成子、武田和弘、河田則文、日野雅之、西口修平. 日本輸血細胞治療学会誌. 2008; 54: 393-397

## 2. 学会発表

1. コンセンサスマーケティング2 C型肝炎 ペグインターフェロンあるいはインターフェロン単独療法の位置づけ. 田守昭博、河田則文. 肝臓 2009;50:Supp.1 Page A42

2. 難治性C型肝炎利枝に対するペグインターフェロン(Peg-IFN)・リバビリン再治療による抗ウイルス効果. 田守昭博、小林佐和子、岩井秀司、森川浩安、榎本大、坂口浩樹、木岡清英、岡 博子、河田則文. 日消誌 2009;106:Supp. Page A214

3. C型慢性肝炎に対するペグIFN・リバビリン治療の投与期間と抗ウイルス効果. 田守昭博、榎本大、遠山まどか、安田隆弘、藤井英樹、小林佐和子、岩井秀司、森川浩安、坂口浩樹、羽生大記、河田則文. 肝臓 2008;49:Suppl.1 Page A328

4. C型慢性肝炎に対するペグIFN・リバビリン療法のHCV遺伝子多型と抗ウイルス効果. 田守昭博、榎本大、森川浩安、岩井秀司、小林佐和子、藤井英樹、安田隆弘、坂口浩樹、羽生大記、塩見進、河田則文. 肝臓 2008;49:Suppl.1 Page A213.

セロタイプ2型に対するペグインターフェロン・リバビリン療法の治療期間とSVR率. 山口康徳、田守昭博、藤井英樹、小林佐和子、岩井秀司、森川浩安、榎本大、坂口浩樹、木岡清英、倉井修、岡博子、

河田則文. 肝臓 2010;51:Supp.1 Page A251

5. ペグインターフェロン・リバビリン療法無効・再燃例に対する治療の現状. 田守昭博、林健博、藤井英樹、黒岡浩子、小林佐和子、岩井秀司、森川浩安、榎本大、坂口浩樹、河田則文. 日消誌 2010;107:Supp. Page A272

6. 非B非C型肝炎の特徴とSVR肝癌との類似点に関する解析. 田守昭博、河田則文. 肝臓 2010;51:Supp.2 Page A523

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

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

分担研究報告書

## C型慢性肝炎において肝線維化・治療抵抗性に関係するmicroRNAの網羅的解析

研究分担者 榎本大 大阪市立大学准教授

研究要旨：ペグインターフェロン(PEG-IFN)とリバビリン併用療法前のC型慢性肝炎患者の肝組織においてmicroRNA発現の網羅的解析を行なったところ、肝線維化進行例(F3/F4)では7種のmicroRNA発現が有意に低下(fold change,  $-1.69 \sim -1.20$ )し、17種の発現が有意に亢進(fold change,  $1.21 \sim 2.59$ )していた。有意に亢進したもののうち、miR-222は定量的PCRでも肝線維化の進行とともに増加した(F1~F4,  $1.0 < 1.8 < 2.2 < 2.7$ ;  $p < 0.01$ )。ウイルス学的著効例では11種の発現が有意に低下(fold change,  $-1.45 \sim -1.11$ )し、2種の発現が有意に亢進(fold change,  $1.03 \sim 1.80$ )していた。線維化を来たすTAAマウスの肝臓におけるmiR-222発現は対照に比べ、8週目に1.4倍に増加した( $p < 0.01$ )。マウス肝臓より分離・培養した活性化星細胞のmiR-222発現は、培養1日目に比べ7日目では13.9倍に増加した( $p < 0.01$ )。ヒト不死化星細胞LX-2におけるmiR-222発現は肝癌細胞HepG2に比べ6.0倍と高値であった。

### A. 研究目的

本邦における肝癌による死亡は年間約35,000人と推定され、悪性新生物による死亡の第4位となっている。その約75%はC型肝炎ウイルス(HCV)感染によると考えられ、その対策は急務である。C型肝炎では10~20年以上の経過で肝線維化が進展し、肝硬変を母地として肝癌が発生することが知られている。肝線維化は星細胞と筋線維芽細胞が関与するI型コラーゲンの蓄積症候であるが、その分子機構には不明な点が多く残されている。

C型肝炎に対してはペグインターフェロン(PEG-IFN)とリバビリン併用療法が標準治療となっているが、本邦のC型肝炎のおよそ7割を占める遺伝子型1bの患者においてウイルス学的著効(SVR)が得られるのは約半数にとどまっている。また遺伝子型に関わらず肝線維化進行例でのSVR率は低く、治療抵抗性の機序はウイルス側因子のみでは説明できない。そこでmicroRNAなど肝組織中における遺伝子発現を制御する宿主側の因子を解析することにより肝線維化や治療効果を規定する要因が明らかになれば、新しい抗ウイルス療法・抗線維化

療法の端緒となる可能性がある。

本研究では、(1)マイクロアレイ、リアルタイムPCRを用いて遺伝子型1bのC型肝炎患者の肝組織microRNAの発現を解析し、肝線維化進行例またはPEG-IFN・リバビリン治療抵抗例に特有な肝内microRNA発現を同定するとともに、(2)有意であったmicroRNAについては、マウス肝線維化モデルにおいてもリアルタイムPCRでその発現を定量し、(3)初代培養マウス星細胞とヒト不死化星細胞LX-2においても、定量的microRNA発現解析を行った。

### B. 研究方法

C型肝炎35例(女性20例、 $59 \pm 9$ 歳、遺伝子型1b)のうち、22例の肝生検組織においてマイクロアレイによるmicroRNA発現の網羅的解析を行なった。すなわち研究に関する説明と同意を取得した上で、病理学検査に必要な肝組織が十二分に採取された場合の余剰の肝組織の一部よりmirVana miRNA isolation kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いてmicroRNAを抽出し3D-Gene Human miRNA Oligo chip v10.1 (東レ)を用

いた網羅的解析を行なった。

まず肝線維化軽度群 (F1/F2) と肝線維化進行群 (F3/F4) との比較を行い肝線維化の進展に伴って特異的に変動するmicroRNAの同定を試みた。

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が得られた患者と得られなかった患者の比較により、治療効果を規定するmicroRNAの同定を試みた。

有意に変動したmicroRNAについては、全35例においてTaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Assay (Applied Biosystems) と Applied Biosystems 7500 リアルタイムPCRシステムを用いて定量的解析を行った。

チオアセトアミド (TAA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を体重20 gあたり4 mg、週3回投与したマウス (C57BL/6、雄) 肝線維化モデルにおけるmicroRNA発現をリアルタイムPCRにより定量した。

マウス (C57BL/6、雄) の肝臓から分離した初代培養星細胞におけるmicroRNA発現をリアルタイムPCRにより定量した。またヒト不死化星細胞LX-2 (Gut 2005; 54: 142-51. Dr. Scott Friedmanより提供)、マウス線維芽細胞NIH3T3、ヒト肝癌細胞Huh7、ヒト肝癌細胞HepG2におけるmicroRNA発現をリアルタイムPCRにより定量した。

## 研究結果

肝線維化軽度群 (F1/F2) と肝線維化進行群 (F3/F4) の間で肝内microRNA発現を網羅的に解析した結果、肝線維化進行例では7種のmicroRNA発現が有意に低下 (fold change,  $-1.69 \sim -1.20$ ) し、17種の発現が有意に亢進 (fold change,  $1.21 \sim 2.59$ ) していた。有意に低下したもののうち、miR-422aについては、 $p < 0.01$ であった。有意に亢進したもののうち、miR-222、miR-214、miR-199a-3p (miR-199b-3p)、miR-199a-5pについては、 $p < 0.01$ であった (図1)。

全35例について、microRNAの発現をリアルタイムPCRにより定量的に測定した結果、miR-222の発現は肝臓の線

維化の進行とともに正の相関関係にあることが判明した (F1~F4,  $1.0 < 1.8 < 2.2 < 2.7$ ;  $p < 0.01$ )。また、miR-21、miR-29b、miR-199a-5p、miR-199a-3p、miR-214、miR-221も正の相関関係にあり、miR-122は負の相関関係にあった (図2)。

SVRが得られた症例と得られなかった症例の間で肝内microRNA発現を網羅的に解析した結果、SVR症例において11種の発現が有意に低下 (fold change,  $-1.45 \sim -1.11$ ) し、2種の発現が有意に亢進 (fold change,  $1.03 \sim 1.80$ ) していた。有意に低下したもののうち、miR-660、miR-324-5p、miR-532-5pについては、 $p < 0.01$ であった (図3)。

TAAを投与したマウスの肝臓では、miR-222の発現がコントロールに比べ、投与8週目に1.4倍にまで有意に増加した ( $p < 0.01$ ) (図4)。

マウス肝臓より分離・培養した活性化星細胞のmiR-222発現は、培養1日目に比べて、培養4日目には4.1倍、培養7日目には13.9倍にまで有意に増加した ( $p < 0.01$ )。また、miR-222とクラスターを形成するmiR-221の発現は、培養4日目には6.1倍、培養7日目には26.8倍にまで有意に増加した ( $p < 0.01$ ) (図5)。

ヒト不死化星細胞LX-2におけるmiR-222の発現はヒト肝癌細胞HepG2に比べて6.0倍、miR-221の発現は9.5倍と高値であった ( $p < 0.01$ ) (図6)。

## D. 考察

近年、特定の遺伝子の発現を調節する因子としてmicroRNAの働きが注目されている。肝癌細胞株Huh7やヒト初代培養肝細胞においてマイクロアレイを用いた *in vitro* の検討では、IFN処理により約30個のmicroRNAが変動することが示されている (Pederson et al. *Nature* 2007; 449:919-22)。そこで *in vivo* のC型慢性肝炎に対するPEG-IFN・リバビリン療法においても、microRNAが特定の遺伝子の発現を調節することによって、治療効果に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

本研究により、ある種のmicroRNAが肝線維化診断マーカーとしての使用できる可能性が示唆された。特にmiR-2

22と、それとクラスターを形成するmiR-221については、動物モデルにおいても、培養細胞においても有意な結果が得られた。miR-222とmiR-221はHuh7やHepG2などの肝癌細胞でも発現していると報告されているが、それらの細胞に比べヒト不死化星細胞では更に高発現していることが判明した。miR-222の標的遺伝子のひとつとしてcyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27<sup>Kip1</sup>)が挙げられ、miR-222の増減は細胞周期を調節することによって星細胞の増殖に影響を与える可能性が考えられる。肝線維化の進展や治療抵抗性に関係するmicroRNAが同定出来れば、microRNAに作用し得る低分子物質のスクリーニングを行ない、究極的には新たな治療薬の開発に繋がる可能性がある。近年、患者の高齢化が進む中、副作用の問題からIFNなどの抗ウイルス治療が使用出来ない症例が増えている。安全で長期間服用可能な肝線維症予防薬の開発は、このような社会的なニーズにも貢献出来ることが期待される。

MicroRNAはPEG-IFN・リバビリン療法の治療効果を予測出来るマーカーとなり得る可能性も考えられる。C型慢性肝炎に対する抗ウイルス剤としては、今秋にプロテアーゼ阻害剤が承認される予定である。ところがプロテアーゼ阻害剤の単剤使用では早期に薬剤耐性が出現することが判明しており、当面これらの薬剤はIFN・リバビリンと併用で使用される予定である。IFNの効果を予測することは、無効例において副作用を伴う治療を避けるためにも、医療経済的な見地からも非常に重要である。

## E. 結論

遺伝子型1bのC型慢性肝炎において肝線維化やPEG-IFN・リバビリン治療効果を規定するmicroRNAの候補を同定した。特にmiR-222については肝線維化診断マーカーとしての有用性が示唆された。microRNAという分子生物学の新領域を利用しつつ肝線維化の進展や治療抵抗性の機序を解明することにより、新たな治療薬の開発など治療成績の向上や、検査薬開発とそれらの商品化へと続く可能性が期待される。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. 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;38:954-9.
2. 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;28:1314-5.
3. Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis. Enomoto M, Nakamishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N. *Ann Intern Med.* 2008;149:912-3.
4. Sildenafil-induced severe cholestatic hepatotoxicity. Enomoto M, Sakaguchi H, Ominami M, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Kawada N. *Am J Gastroenterol.* 2009;104:254-5.
5. 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, Ohfujii S, Mori M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Ikura Y, Ueda M, Kawada N. *J Gastroenterol.* 2009;44:608-14.
6. Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD. Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N. *Gut.* 2009;58:1566-7.
7. Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus. Enomoto M, Tamori A, Kawada N. *Rev Recent Clin Trials.* 2009;4:179-84.
8. Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B: re

gression of liver stiffness during entecavir therapy. Enomoto M, Mori M, Ogawa T, Fujii H, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Sawada A, Takeda S, Habu D, Shiomi S, Kawada N. *Hepatol Res*. 2010;40:853-61.

9. HBV関連クリオグロブリン血症における抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体の意義(原著論文). 榎本大, 根来伸夫, 藤井英樹, 小林佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 田守昭博, 坂口浩樹, 羽生大記, 塩見進, 河田則文. 肝臓51巻8号 Page454-456(2010.08)

10. 核酸アナログ/IFN sequential治療の有用性とその限界(解説/特集). 榎本大, 田守昭博, 西口修平, 河田則文. 日本消化器病学会雑誌52巻1号 Page 115-119(2011.01)

#### 学会発表

1. 第12回日本肝臓学会大会シンポジウム10「胆管&肝の自己免疫性あるいは薬物性病態形成:基礎と臨床の最新展開」薬物性肝障害から進展したと考えられる自己免疫性肝炎症例の検討(会議録). 小林佐和子, 榎本大, 河田則文. 肝臓49巻Suppl. 2 PageA434 (2008.09)

2. 第12回日本肝臓学会大会シンポジウム19「B型肝炎の今日的標準治療と理想的近未来治療への挑戦」B型慢性肝炎における核酸誘導体の中止について(会議録). 榎本大, 田守昭博, 河田則文. 肝臓49巻Suppl. 2 PageA443 (2008.09)

3. 第95回日本消化器病学会総会パネルディスカッション5「B型肝炎治療の最前線」B型慢性肝疾患に対するエンテカビルの治療効果～特に肝線維化改善効果について(会議録). 榎本大, 森真美, 河田則文. 日本消化器病学会雑誌106巻臨増総会 PageA76 (2009.03)

4. 第13回日本肝臓学会大会シンポジウム10「B型慢性肝炎難治例への対策」エンテカビル効果不良のB型慢性肝疾患の特徴とその対策(会議録). 榎本大, 田守昭博, 河田則文. 肝臓50巻Suppl. 2 PageA440 (2009.09)

5. 第96回日本消化器病学会総会シンポジウム3「B型肝炎治療の最新戦略」HBeAg陽性B型慢性肝炎に対する核酸誘

導体/IFN sequential療法の有用性とその限界(会議録).

榎本大, 西口修平, 河田則文. 日本消化器病学会雑誌107巻臨増総会 PageA86 (2010.03)

6. 18<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week (UEGW). Sequential therapy with nucleoside analogues and interferon for Japanese patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. Enomoto M, Tamori A, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Sakaguchi H, Shiomi S, Kim SR, Enomoto H, Imanishi H, Nishiguchi S, Kawada N. *Gut* 59 (Suppl III); A43: 2010.



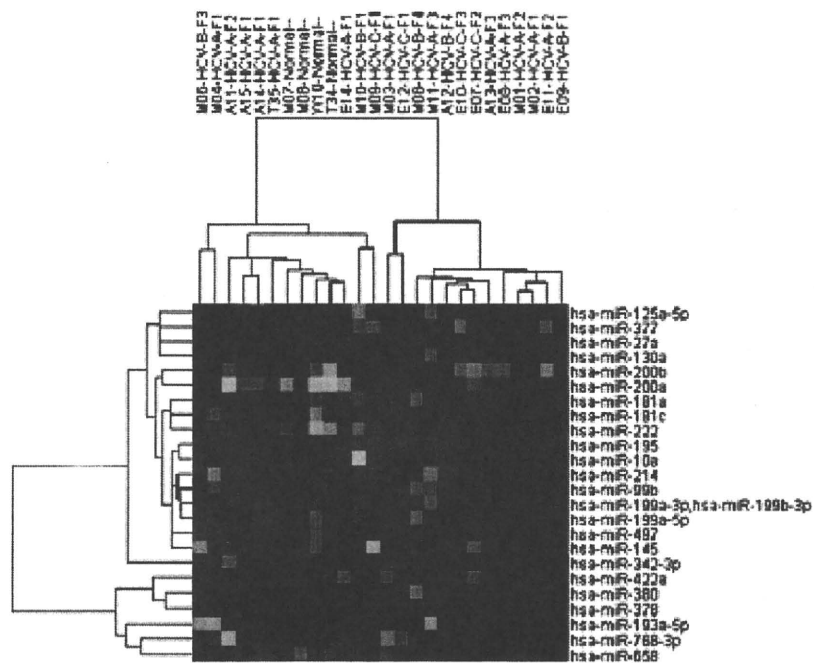


図1. 肝線維化軽度群 (F1/F2) と肝線維化進行群 (F3/F4) における肝内 microRNA 発現の比較

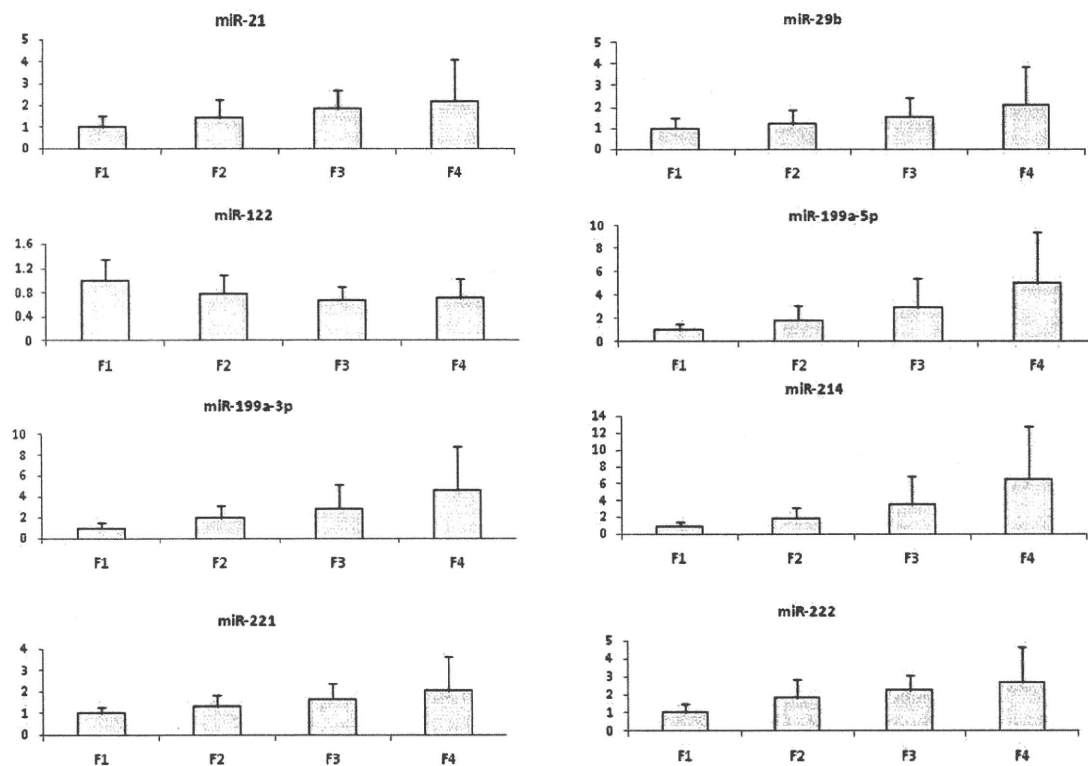


図2. 肝線維化ステージごとの肝内microRNA発現の比較

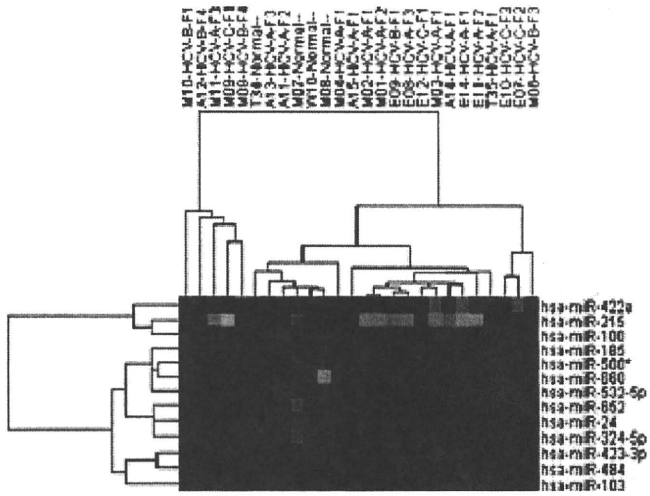


図3. SVR が得られた症例と得られなかった症例における肝内 microRNA 発現の比較

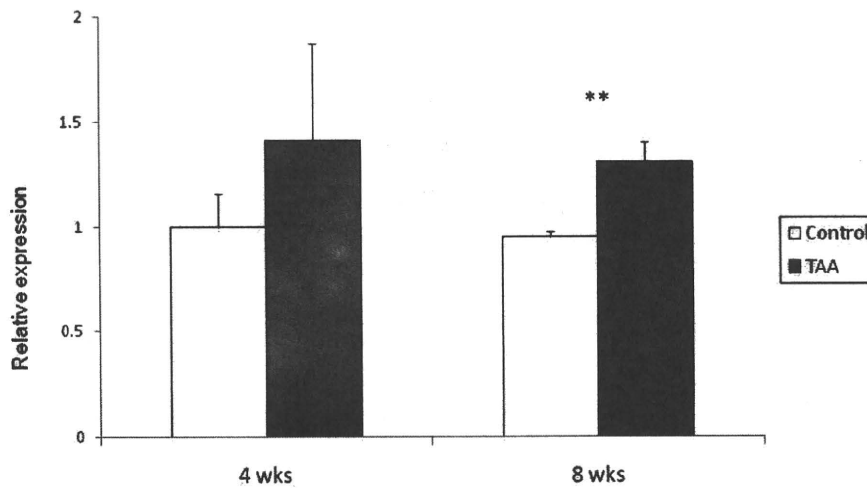


図4. TAAマウス肝臓におけるmiR-222発現の変化

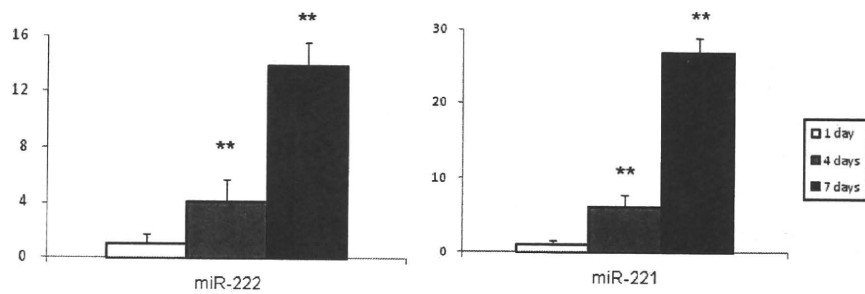


図5. 初代培養マウス星細胞におけるmiR-222、miR-221発現の変化

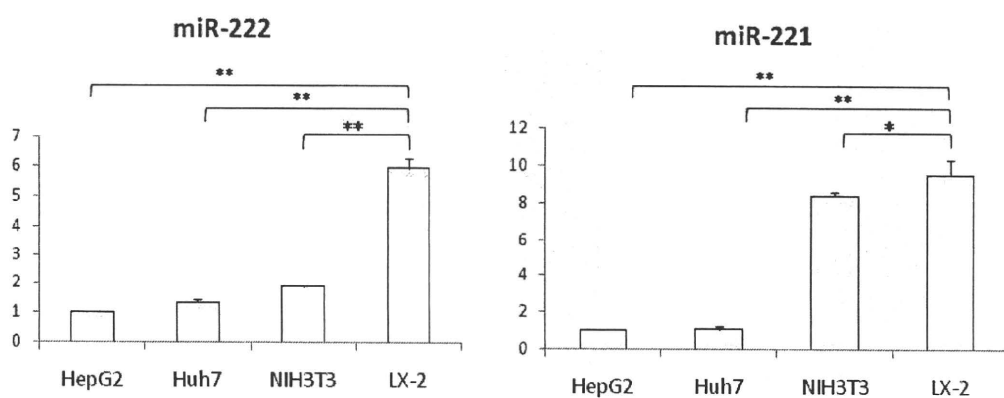


図6. ヒト星細胞 LX-2、ヒト肝癌細胞 Huh7、HepG2、マウス線維芽細胞 NIH3T3 における miR-222、miR-221 の発現

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

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

分担研究報告書

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に関する研究

分担研究者 鈴木知比古 東レ株式会社医薬研究所 主任研究員

研究要旨：C型慢性肝炎やC型代償性肝硬変に対するインターフェロン（interferon, IFN）治療において、ウイルス駆除に至らなくても、肝線維化の進展や肝癌の発症が抑えられることが示されているが、その詳細な分子機構は不明である。肝線維化に重要な役割を果たしている星細胞（HSC）に着目し、I型IFNの直接的作用について *in vitro* 培養ヒトHSCを用いて網羅的遺伝子発現解析法にて検討した。その結果、miRNAに関しては、今回行った条件では顕著な変化が認められなかった。一方、mRNAについては、肝細胞癌株との比較において、HSCに対して、より特異的にIFN- $\beta$ がIFN- $\alpha$ よりもダイナミックにmRNAの発現変動を引き起こした。その発現変動遺伝子群には細胞周期関連およびアポトーシス関連遺伝子群が含まれた。これらの結果は、以前示したIFN- $\beta$ がIFN- $\alpha$ よりも細胞増殖・細胞周期抑制作用の効力が高いことと関連づけられる。更に抗線維化作用に共通の機序が存在するか、肺線維症治療薬であるPirfenidoneによるヒトHSCにおけるmRNA発現変動を同様に解析したが、顕著な変化はなかった。一方、*in vivo* レベルでチオアセタミド（TAA）誘発マウス肝炎モデルにおいて、IFN- $\beta$ が線維化マーカーのCol1A2遺伝子や肝星細胞活性化マーカーの遺伝子の発現を抑制するだけでなく、線維性コラゲナーゼであるマトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）-13の発現を増加させること、その他のMMP群の発現を変化させることが確認された。今後、IFNや他の抗線維化作用を有する薬物の標的細胞とその作用機序を更に明確にすることで、新たな治療・予防方法の開発が期待される。

#### A. 研究目的

インターフェロン（IFN）-  $\alpha$ 、IFN- $\beta$ に代表されるI型IFNは、その抗ウイルス作用とは独立して、慢性肝炎患者における肝線維化の進展を抑制することが示されているが、その詳細な作用メカニズムは未だ明らかになっていない。本研究は、肝線維化に重要な役割を果たしている、活性化した肝星細胞（HSC）に対するI型IFNの作用および*in vivo*肝線維化病態モデルを用いてI型IFNの作用を検討し、その抗肝線維化作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。IFNの抗線維化分子機構を解明することは、その分子基盤をもとに新たな肝線維化治療・予防薬や手法の開発を促進することにつながると期待される。

#### B. 研究方法

ヒト培養HSC株であるLI-90（理研細胞バンク）またはTWNT-4細胞（岡山大・小林より譲受）をヒトI型IFNであるIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ で処理し、細胞増殖に対する作用、細胞周期に対する作用、細胞周期関連たん白発現に対する作用を、それぞれMTS法、フローサイトメトリー法、ウェスタンブロット法により解析した。更に検討でより強力な作用を示したIFN- $\beta$ についてヒトHSC処置後の各種MMP遺伝子の変動を定量PCR法にて確認した。その後有意な変動が認められたMMP-1に注目し、線維化促進因子としての機能が知られているTGF- $\beta$ 共存下におけるIFN- $\beta$ の作用を解析した。

続いてTWNT-4細胞をIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ あるいはPirfenidoneで処理して、細胞から抽出したtotal RNAを材料としmicroRNA（miRNA）またはmRNAの発現変動をそれぞれ3D-gene™ Human miRNA oligo chipまたはHuman Oligo c

hip 25k (東レ)を用いて、網羅的にスクリーニング・解析した。IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ のmRNA発現への影響に関しては、同時に対照として、ヒト肝細胞癌由来細胞株のHuh-7を同様に処理し、網羅的解析を行った。

TAA誘発肝炎モデルは常法に準じて作製し、マウスIFN- $\beta$  (3000, 30000 U/匹)を皮下投与し、対照溶媒投与群との比較で肝臓における種々遺伝子の発現を定量PCR法または3D-gene™ Mouse Oligo chip 24k (東レ)を用いて解析した。

なお動物実験は、東レ株式会社研究本部動物実験指針を遵守し実施した。

### C. 研究結果

#### 1. HSCに対するI型IFNの細胞増殖または細胞周期への作用

IFN- $\alpha$ またはIFN- $\beta$ は、HSCに対し細胞増殖抑制作用を示し(図1)、細胞周期のG0/G1期からS期への移行を遅らせることで、細胞分裂を抑制することが明らかとなった(図2)。細胞周期が、G0/G1期で停滞していることからCDK阻害因子、特にp21遺伝子に着目して定量PCRを行ったところ、IFN- $\beta$ はp21遺伝子の発現を2倍上昇させ、更に蛋白レベルでもp21の発現を増加させることを確認した(図3)。一方で他のCDK阻害因子であるp15やp27には影響しないことが示された(図3)。これらの作用は、同じ生物活性濃度で処置した場合、IFN- $\alpha$ よりもIFN- $\beta$ で顕著であった。

#### 2. HSCに対するIFN- $\beta$ のMMP産生への影響作用

1.の検討で作用がより顕著であったIFN- $\beta$ 処置による各種MMP遺伝子の変動を定量PCR法で経時的に評価した。その結果IFN- $\beta$ はMMP-1遺伝子の発現を有意に増加させることが明らかとなった(表1)。またIFN- $\beta$ はHSC培養上清中のMMP-1蛋白を濃度依存的に増加させることをEIA法にて確認した(図4a)。またTGF- $\beta$ 処置によりMMP-1蛋白の産生量は低下するが、IFN- $\beta$ は、その産生量を正常レベルにまで回復させることが明らかとなった(図4b)。

#### 3. HSCにおけるTGF- $\beta$ シグナルに対するIFN- $\beta$ の作用

2.でTGF- $\beta$ 刺激時のヒトHSCに対し、IFN- $\beta$ が抑制的

に働くことが示唆されたため、TGF- $\beta$ シグナル伝達分子について解析を進めた。その結果Smad2のリン酸化が濃度依存的に抑制されること(図5a)、およびTGF- $\beta$ シグナルの抑制因子であるSmad7遺伝子の発現が約1.6倍上昇すること(図5b)が明らかとなった。

#### 4. I型IFN処置ヒトHSC細胞株におけるmiRNA発現の網羅的解析

IFN- $\alpha$ またはIFN- $\beta$ 処置ヒトHSC細胞株TWNT-4における網羅的miRNAおよびmRNAアレイ解析を行った。その結果、定常状態で発現の高いmiRNAに関しては、IFN処理によって顕著な発現量変化は検出されず、IFN- $\alpha$ とIFN- $\beta$ との差も認められなかった(図6)。定常状態で低発現のmiRNAに関しては、IFN処理によって発現量が2倍以上あるいは1/2以下に変動しているものが見られたが、定量PCRによる確認実験で再現性が認められなかった。

#### 5. I型IFN処置ヒトHSC細胞株におけるmRNA発現の網羅的解析

mRNA解析では、Global Normalization値を散布図としてプロットしたところ、肝癌由来Huh-7の散布図はIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ ともに発現誘導遺伝子が多数確認される、同じようなプロット形状を示したのに対し、HSC細胞株TWNT-4では、IFN- $\alpha$ と比較してIFN- $\beta$ 処置による遺伝子発現変動がダイナミックであることが明らかとなった(図7)。同様の作用はペグ化されたIFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 処置でも観察された(data not shown)。

続いてGene Set Enrichment Analysis (GSEA: Broad Institute)により、機能遺伝子解析を行った結果、TWNT-4に対するIFN- $\beta$ 処置でIFN- $\alpha$ よりも有意に変動する遺伝子群として、アポトーシス関連遺伝子群を同定した。先にI型IFN処置により遺伝子およびたんぱく質レベルでの発現増強を認めたp21を含む、細胞周期関連遺伝子に注目して解析を行ったところ、IFN- $\beta$ 処置でIFN- $\alpha$ 処置よりも変動が顕著な遺伝子として、p21, p19, IRF-1, Cyclin E1の4遺伝子が同定された(図8)。

#### 6. 線維化抑制薬Pirfenidone処置ヒトHSC細胞株におけるmRNA発現解析

線維化抑制作用が既に知られ、肺線維症治療薬として

承認・販売されているPirfenidoneを処置したヒトHSC細胞株の網羅的mRNAアレイ解析を行ったが、

今回検討した条件では顕著な発現変動は認められなかった。

#### 7. TAA誘発肝炎モデルにおけるIFN- $\beta$ 処置肝臓のmRNA発現の解析

TAA誘発マウス肝炎モデルの肝臓組織におけるマウスIFN- $\beta$  投与によるmRNA発現変動解析を行った。肝臓中のCOL1a2遺伝子、 $\alpha$ -SMA遺伝子およびマウスにおけるI型コラーゲン分解酵素であるMMP-13の遺伝子発現を定量PCRにより測定した結果、IFN- $\beta$  投与群は、対照群に比較して、COL1a2および $\alpha$ -SMA遺伝子が用量に依存して発現が減少する傾向を示し、MMP-13遺伝子は有意な発現増加が認められた(図9)。網羅的解析では、先にヒトHSC株のIFN- $\beta$  処置によって、遺伝子とたん白質レベルで発現増強を認めた、コラーゲン分解酵素のMatrix metalloproteinase (MMP)-1関連遺伝子にフォーカスして解析を行ったところ、IFN- $\beta$  投与によりMMP-13に加え、MMP-3遺伝子の発現増加が確認された。また、MMP-2, MMP-12, MMP-14, TIMP-2, Prtn3については、TAA誘発で遺伝子発現が増加するが、IFN- $\beta$  投与によりその発現増加が抑制されていることが明らかとなった(図10)。

#### D. 考察

肝線維化において重要な役割を果たしているHSCに対して、I型IFNが直接的に作用し遺伝子発現変化を引き起こすことが確認され、しかもI型IFNの中でIFN- $\beta$  がIFN- $\alpha$ よりもHSCへの反応性が高く、アポトーシス関連遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現を変動させることにより、その細胞の増殖や生存維持に関与している可能性が示された。

線維化抑制作用をもつPirfenidoneもIFNと同じく作用機序は明確になっていないが、炎症性サイトカインの産生抑制等の複合的な作用によるものと現時点では考えられている。今回の遺伝子発現に関する検討では、残念ながらIFNと共通の作用機序を見出すには至らなかった。今後メインの標的細胞が異なる可能性も含めて継続

して検討を行っていく予定である。

これまでにin vivo肝線維化病態モデルにおけるI型IFNの線維化抑制作用は幾つかの種類の動物モデルで明らかにされている。今回用いたTAAモデルは線維化が進行していない、炎症誘発の初期線維化モデルとして考えられるが、既知の報告同様にIFN投与によって、肝線維化マーカー遺伝子の発現抑制が確認された。また、ヒトHSCに直接IFNを作用させたときの結果と比べ、変動するMMP関連遺伝子は多く、また増減も大きいように見えることから、動物個体レベルではIFNがHSC以外の細胞に作用している可能性が考えられた。今回得られたIFN投与によるMMP関連遺伝子の発現変化が実際にどのような生理学的意義をもつのか非常に興味深い。これまで一方向性と考えられてきた線維化の進行がリバースする、すなわち、線維が分解・融解される可能性が近年示唆されており、経時的な変化を含む、これら蛋白分解酵素群に関する詳細な解析を今後行う必要がある。

#### E. 結論

以上、I型IFNであるIFN- $\beta$  がIFN- $\alpha$ と比較し、HSCにおける遺伝子発現変化をダイナミックに引き起こし、多種多様な細胞生物学的変化をもたらすことが明らかになった。したがって今回、I型IFNの抗線維化作用における標的の一つはHSCであり、IFNの抗線維化作用の分子機構の一端を明らかにした。一方、マウス肝臓においてもIFN- $\beta$  が抗線維化作用を示唆する遺伝子発現の変化を引き起こすことが明らかとなったが、HSCではない標的の存在も示唆された。IFNの抗線維化メカニズムの分子基盤を他の抗線維化薬と共に更に検討を続けることで新たな肝線維化治療薬や予防薬、手法の開発の手がかりを得ることが期待される。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

木綿しのぶ, 鈴木知比古. IL-1 $\beta$  とその内在性アンタゴニストIL-1Ra のバランスから考える I 型インターフェロンの作用の違い(The difference between Type I

Interferons in the balance of IL-1 $\beta$  and IL-1Ra).  
細胞 2010;42: 349-52.

## 2. 学会発表

木綿しのぶ, 倉橋香菜, 鈴木知比古. IL-1 $\beta$ とIL-1Raレベルにおけるインターフェロン $\beta$ およびインターフェロン $\alpha$ の比較-インターフェロン(IFN)によるうつ発症頻度への考察-. 第19回日本臨床精神神経薬理学会・第39回日本神経精神薬理学会 合同年会; 2009年11月; 京都. 同合同学会プログラム・抄録集 p249 (2009年)

鈴木知比古, 西村和美, 下菌利恵子. 肝星細胞におけるI型インターフェロンの抗線維化メカニズム解析. 第23回肝類洞壁細胞研究会学術集会; 2009年12月; 大阪. 同学術集会プログラム・抄録集 p52 (2009年)

なし

## 3. その他

なし

下菌利恵子, 西村和美, 鈴木知比古. 肝星細胞に対するIFN- $\beta$ 抗線維化メカニズム解析. 第46回日本肝臓学会総会; 2010年5月; 山形. 肝臓 51巻 suppl(1) A127 (2010年)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

「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」(特許公開番号2010-227030 発明者: 鳥居裕一, 鈴木知比古, 下菌利恵子)。

「インターフェロン感受性又は応答性の予測方法」(特許出願番号 2010-083724 発明者: 鈴木知比古, 倉橋香菜, 木綿しのぶ)。

### 2. 実用新案登録

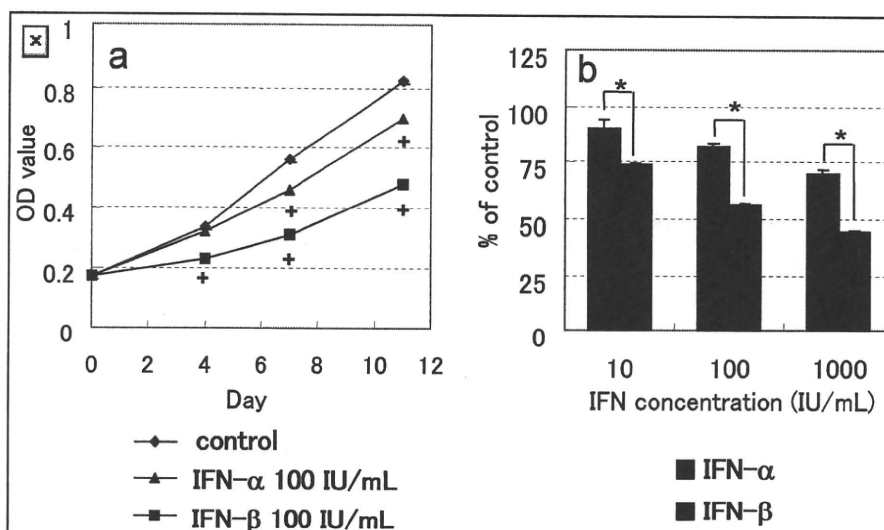


図1 培養ヒトHSCの増殖に対するI型IFNの作用: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ 共に濃度依存的に増殖を抑制した。その抑制効果はIFN- $\alpha$ よりIFN- $\beta$ の方が強かった。

a) Human hepatic stellate cells (hHSCs) were cultured with or without IFN 100 IU/mL for 4-11 days. Medium were changed every for 4 days. b) hHSCs were cultured with or without IFN 10-1000 IU/mL for 7 days. Medium were changed every for 4 days. Data represent the mean  $\pm$ SEM (n=5). +p < 0.05 vs control (t-test) . \*p < 0.05 (t-test).

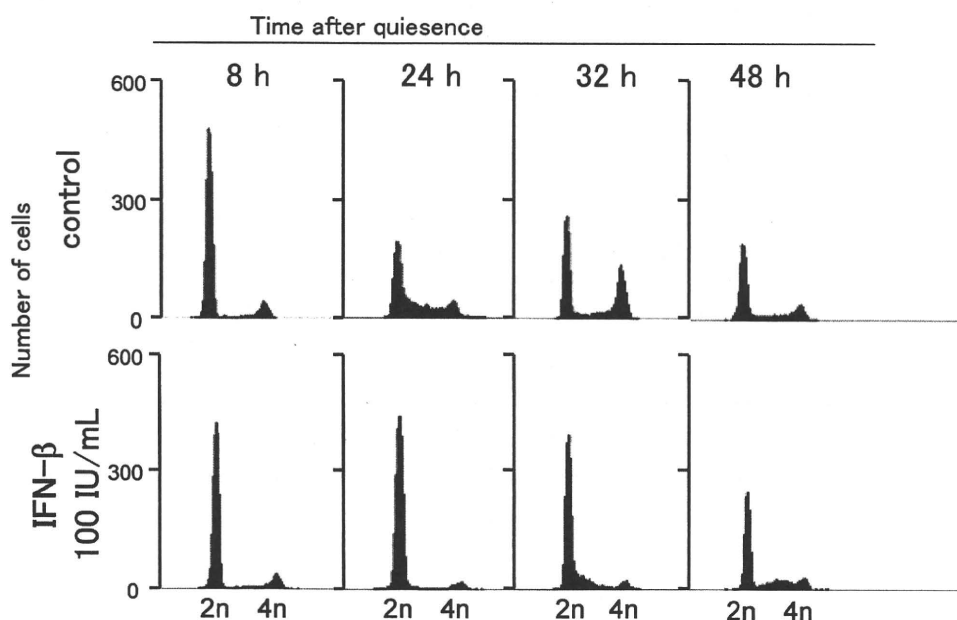


図2 培養ヒトHSCの細胞周期に対するI型IFNの作用: IFN- $\beta$ が細胞周期のG0/G1期からS期への移行を遅らせることが確認された。

Cell cycle progression of hHSCs grown in absence (control) or presence of IFN- $\beta$  100 IU/mL at indicated periods after quiescence. Cellular DNA content was analyzed by flow cytometry.



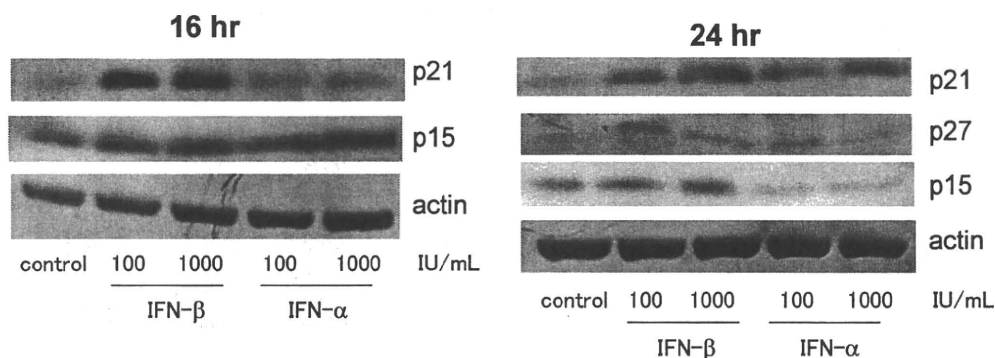


図3 培養ヒトHSCにおける細胞周期関連蛋白CDK阻害因子に対するI型IFNの作用: I型IFNはp21蛋白の発現を増加させたが、他のCDK阻害因子p15やp27蛋白に影響しなかった。

The hHSCs were cultured with IFN 100, 1000 IU/mL for 16, 24 h. Expression of indicated cyclin-dependent kinase inhibitor was analyzed by Western blot.

表1 培養ヒトHSCにおける各種MMP遺伝子発現に対するIFN-betaの作用: I型IFNはMMP-1遺伝子の発現を上昇させたが、他のMMPには影響しなかった。

Gene Name	proteinase	Time		
		8 h	24 h	72 h
MMP-1	Collagenase-1	→	↗ 1.3 folds	↑ 2 folds
MMP-2	Gelatinase A	→	→	→
MMP-3	Stromelysin-1	→	→	→
MMP-9	Gelatinase B	→	→	→
MMP-14	MT1-MMP	→	→	→
TIMP-1	MMPs inhibitor	↗ 1.2 folds	↗ 1.2 folds	↗ 1.3 folds
TIMP-2	MMPs inhibitor	→	→	→

Time course analysis of the MMP-1, -2, -3, -9, -14 and TIMP-1, -2 mRNAs expression levels in IFN-beta-treated hHSCs were carried out. The cells were cultured for 8, 24, 72 hrs with or without IFN-beta 100 IU/mL. The levels of mRNAs in the cells were determined by real-time PCR assay.

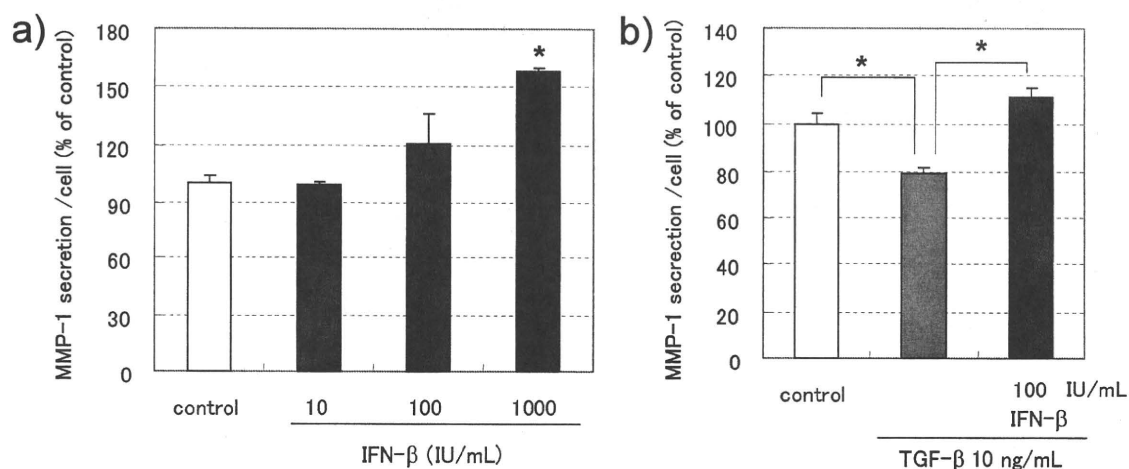


図4 培養ヒトHSCにおけるMMP-1蛋白発現に対するIFN-βの作用： IFN-βはTGF-β非存在下および存在下ともにMMP-1蛋白の発現を上昇させた。

a) The hHSCs were cultured for 96 h with IFN-β 10-1000 IU/mL. \*p < 0.01 vs control (Shirley-Williams test). b) The hHSCs were stimulated by TGF-β in the presence or absence of IFN-β for 96h. \*p < 0.05 (t-test). MMP-1 contents in the culture supernatants were measured by ELISA. The cell numbers were measured by MTS Cell Proliferation Assay. Data represent MMP-1 secretion per cell. MMP-1 secretion in non-treated cells was used as a control (100%). Data represent the mean ± SEM (n=3).

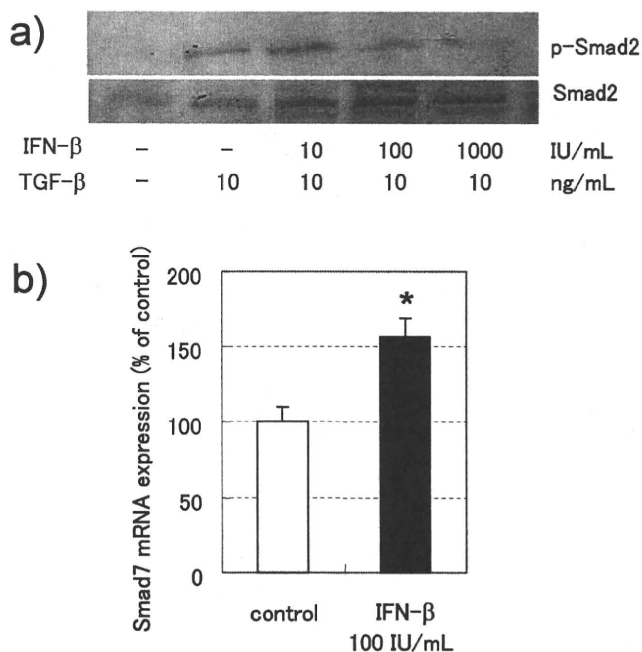


図5 培養ヒトHSCにおけるTGF-βシグナルに対するIFN-βの作用： IFN-βはSmad2リン酸化の抑制および*Smad7*遺伝子の発現亢進によりTGF-βシグナルの一部を抑制することが明らかとなった。

a) Western blot analysis of phosphorylated (p-Smad2) and nonphosphorylated Smad2 were carried out. The hHSCs were stimulated by TGF-β in the presence or absence of IFN-β for 24 h. b) The expression levels of Smad7 mRNA were analyzed by real-time PCR. The hHSCs were cultured for 24 h with or without IFN-β 100 IU/mL. Data were normalized on GAPDH mRNA expression levels. Data represent the mean ± SEM (n=3). \*p < 0.05 vs control (t-test).

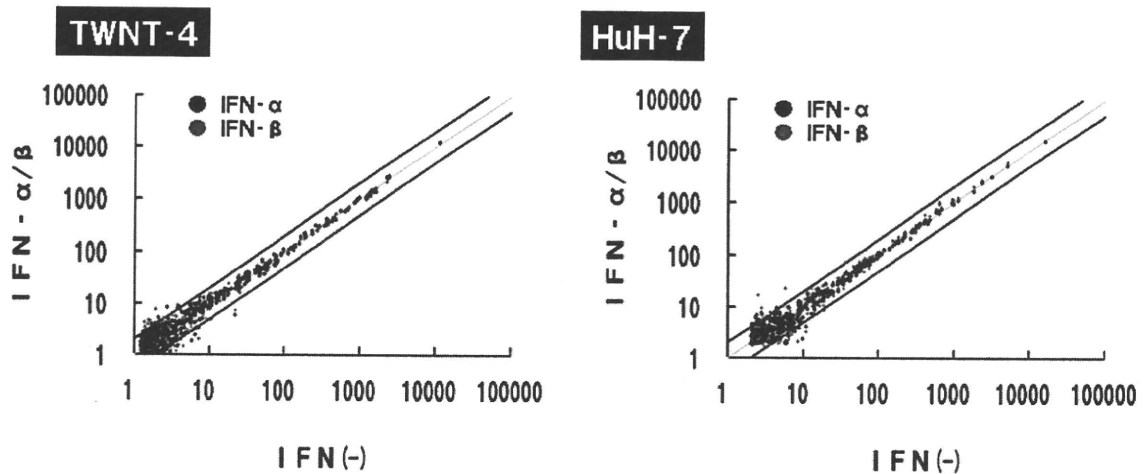


図6 I型IFN処置ヒトHSC細胞株TWNT-4 (左図) およびヒト肝細胞癌株Huh-7 (右図) におけるmiRNA発現の網羅的解析の散布図: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  (100 U/mL, 4時間処置)とも、いずれの細胞においても、IFN未処置 (横軸) に対するIFN処置 (縦軸) 変化は小さく、IFN- $\alpha$ とIFN- $\beta$ との差は認められなかった。

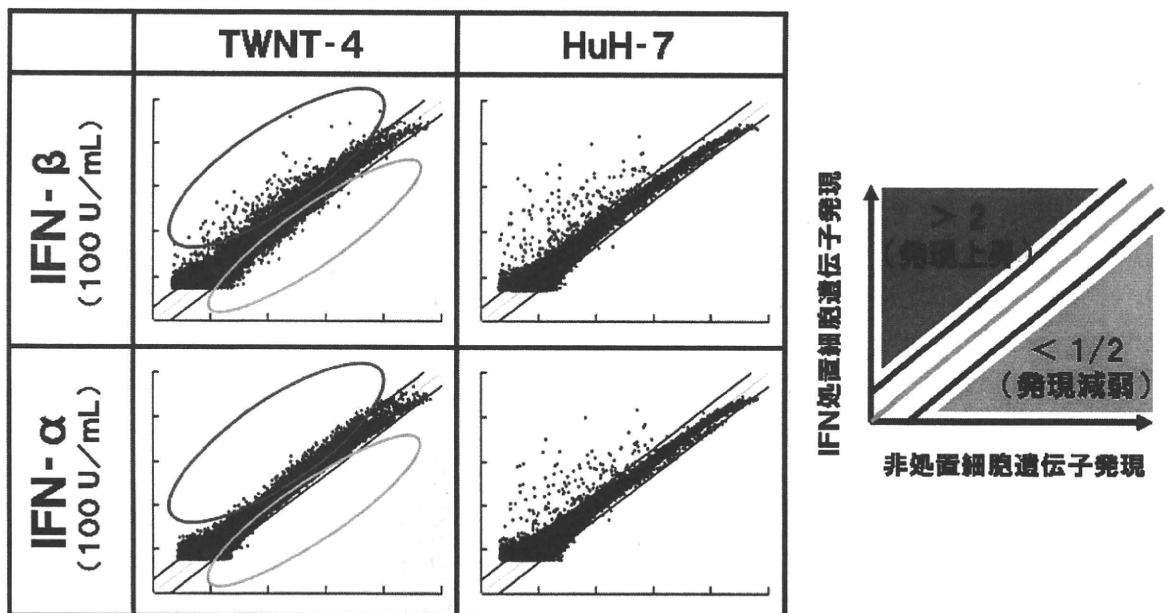


図7 I型IFN処置ヒトHSC細胞株TWNT-4 (左上下段) およびヒト肝細胞癌株Huh-7 (右上下段) におけるmRNA発現の網羅的解析の散布図: TWNT-4においてIFN- $\alpha$  (下段) とIFN- $\beta$  (上段) (100 U/mL, 4時間処置)で、楕円で囲んだ領域に発現変動の大きな差異が認められた。一方Huh-7の散布図ではそのような違いは認められず同じようなプロット形状であった。

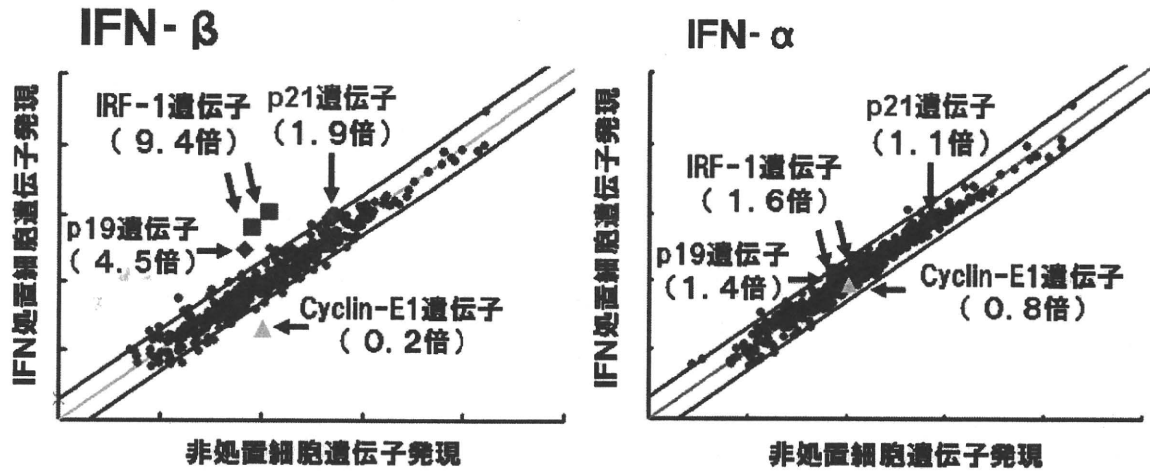


図8 I型IFN処置ヒトHSC細胞株TWNT-4における細胞周期関連遺伝子 (mRNA) 発現の網羅的解析の散布図: TWNT-4においてIFN- $\beta$  (左図) とIFN- $\alpha$  (右図) (100 U/mL, 4時間処置)で、発現変動に顕著な違いが認められた4つの遺伝子と非処置との変動比 (括弧内数値) を示した。

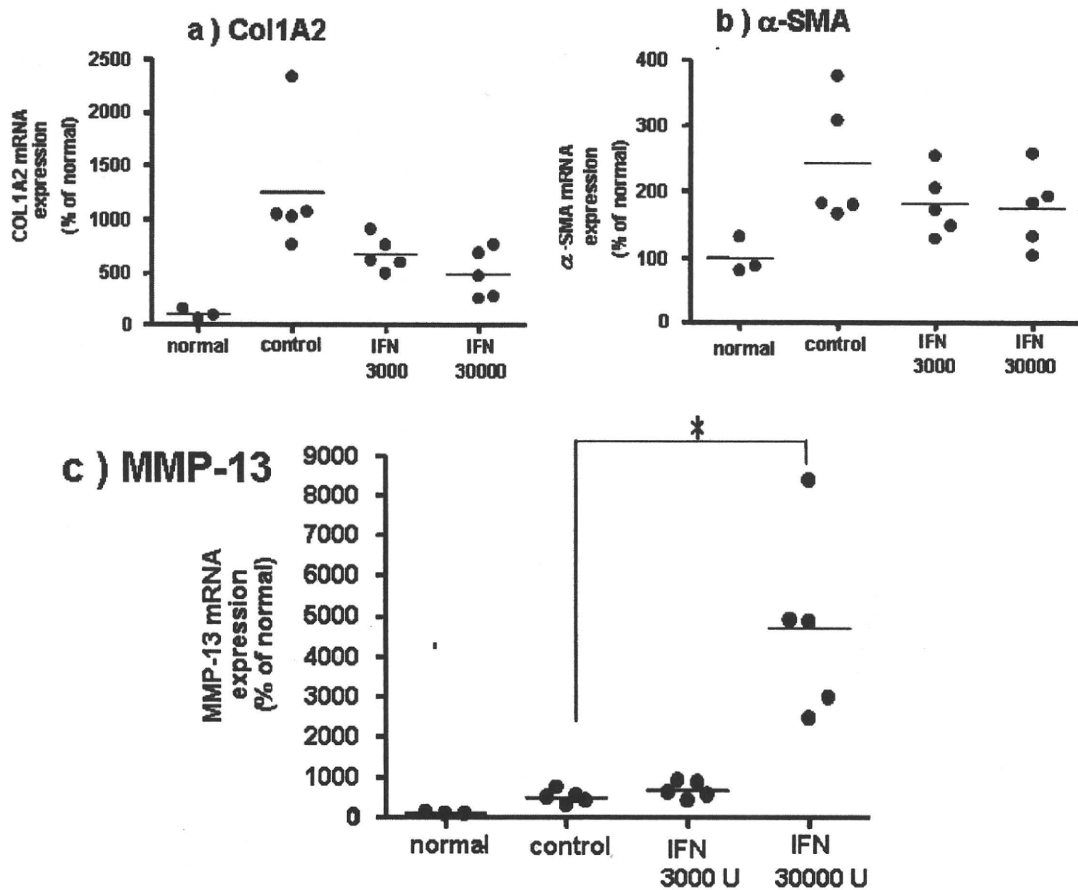


図9 TAA誘発マウス肝炎モデルにおける線維化関連遺伝子発現に対するマウスIFN- $\beta$ の作用検討: マウスにTAA 100 mg/kgを2回(48時間間隔)腹腔内投与し、2回目の投与48時間後の肝臓中のa)COL1a2、b) $\alpha$ -SMA、c)MMP-13 mRNAの発現に対するmIFN- $\beta$ の作用をリアルタイムPCR法により解析した。normal: 無処置群; Control: 対照溶媒投与群; IFN3000: mIFN- $\beta$  3000 U/body投与群; IFN30000: mIFN- $\beta$  30000 U/body投与群 \*p < 0.05 (t-test) vs control.