

201030004A

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

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

平成22年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 佐田 通夫

平成23(2011)年 3月

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

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

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐田 通夫

平成23（2011）年 3月

## 目 次

### I. 総括研究報告

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	1
佐田 通夫	

### II. 分担研究報告

○血管内皮前駆細胞を用いた肝再生療法	11
研究協力者 中村 徹	
○グレリンはラット肝切除後の肝再生を促進する	15
研究協力者 細田洋司	
○ペプチドワクチンによる標準治療抵抗性・不適格HCV感染症例における 発がんの抑制	18
研究分担者 伊東恭悟	
○宇宙医学“ハイブリッド訓練”の非アルコール性脂肪性肝障害に 対する改善効果	22
研究分担者 川口 巧	
○九州地域における肝癌発生状況に関する検討	29
研究分担者 八橋 弘	
○C型肝炎例の最終転帰とIFN治療介入の効果	33
研究協力者 山崎一美	
○C型肝炎とOral Medicineの重要性 (①肝炎と口腔カンジダ症、②BCAA・亜鉛含有食品と味覚、③肝炎と歯牙疾患)	37
○九州X町住民のアルブミン値と予後 -12年間の疫学調査から	
研究分担者 長尾由実子	

○HCVの乾癬発症への関与に関する免疫学的研究 研究分担者 今福信一	-----	43
○C型肝炎からの発癌過程におけるDNA修復酵素の関与 研究分担者 加藤淳二	-----	46
○肝内鉄沈着の定量化:拡散強調画像をベースとした エコープラナーイメージングの有用性 研究協力者 東南辰幸	-----	49
○非B非C慢性肝炎・肝硬変における肝発癌要因解明のための病理形態学的研究; 非B非C肝癌の背景肝組織における Large Cell Change に関する 病理学的検討と潜在性 HBV 感染に関する分子生物学的検討 研究分担者 矢野博久	-----	52
○非B非C型肝細胞癌におけるHBV DNAの関与 研究分担者 横須賀收	-----	55
○自己免疫性肝炎における肝硬変進展に関する病態解析 研究分担者 大平弘正	-----	59
○自己免疫性肝炎における発癌の検討 研究分担者 井出達也	-----	61
○過栄養性脂肪肝から脂肪肝炎への進展過程における脾臓の関与 研究分担者 清家正隆	-----	65
○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における 生物統計学的解析 研究分担者 角間辰之	-----	68
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	71
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	77

# I . 総括研究報告

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)  
総括研究報告書(平成22年度)

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究代表者: 佐田 通夫 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門 教授

**研究要旨:** 肝疾患の終末像である肝硬変、肝癌への進展や発症の阻止および予防を視野に入れた抗ウイルス剤以外の治療法の開発に関する研究を実施した。研究内容は大きく2つの領域からなり、一つは新規治療法の開発、他の一つは治療法開発のために基礎及び臨床研究によって慢性肝疾患や肝癌に関わる種々の病態を解明することである。新規治療法の確立では、私共が開発したBCAA含有食品のC型慢性肝疾患患者に対しての糖・脂質・蛋白代謝異常に対する改善効果を明らかにするための多施設二重盲検比較試験を開始した。また、肝硬変に対する新たな肝再生療法の実用化をめざして、患者末梢血から得られる血管内皮前駆細胞を用いた肝動注投与による肝再生療法を開始し、その効果を確認した。NAFLDに対する新規運動療法としてハイブリッド訓練法を確立、その効果を検証した。病態の解析では大規模疫学研究によってC型肝炎患者の長期予後と、予後改善効果に寄与するインターフェロン療法の有用性を明らかにした。地域住民のコホート研究からはアルブミン値と生存率には有意な関連性があることを明らかにした。九州地区における肝癌患者の動向と、発癌要因についての解析をおこなって特徴を明らかにした。また糖尿病治療薬と肝初癌、HBVの潜在感染と肝癌との関連、自己免疫性肝炎の進展や発癌状況、乾癬とHCVとの関連、肝疾患患者におけるOral Medicineの重要性、MRIによる肝内鉄濃度評価法の開発、酸化DNA損傷の修復系酵素活性の個体差と発癌との関連、脾機能と脂肪肝との関連、グレリンと肝再生との関連などが今年度の班研究によって明らかにされた。

研究分担者(所属研究機関名・職名)

横須賀 收	千葉大学大学院医学研究院 腫瘍内科学講座	教授
大平 弘正	福島県立医科大学 消化器・リウマチ膠原病内科学講座	教授
角間 辰之	久留米大学 バイオ統計センター	教授
伊東 恭悟	久留米大学医学部 免疫・免疫治療学講座	教授
矢野 博久	久留米大学医学部 病理学講座	教授
八橋 弘	国立病院機構長崎医療センター 臨床研究センター	治療研究部長
加藤 淳二	札幌医科大学医学部 内科学第四講座	教授
清家 正隆	大分大学医学部 肝疾患相談センター	講師
今福 信一	福岡大学医学部 皮膚科学講座	准教授
長尾 由実子	久留米大学医学部 消化器疾患情報講座	准教授
川口 巧	久留米大学医学部 消化器疾患情報講座	講師
井出 達也	久留米大学医学部 内科学講座消化器内科部門	講師

研究協力者（所属研究機関名・職名）

山崎 一美	長崎県奈良尾病院 内科	院長
細田 洋司	国立循環器病研究センター 再生医療部	室長
東南 辰幸	久留米大学医学部 放射線医学講座	助教

## A. 研究目的

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法を確立することが本研究班の目的である。C型及びB型肝炎に対する抗ウイルス剤の開発にはめざましい進歩がみられる。しかし、抗ウイルス剤不応例が存在すること、肝硬変進展例や、わが国の特徴である高齢のウイルス肝炎患者では抗ウイルス剤の導入が困難なことも多く、治療効果も低いことなどが指摘されている。このような現状において、肝硬変の進展阻止や肝発癌の予防を視野に入れた新たな治療法の開発・確立は極めて重要であると言える。そこで種々の領域の、そして多方面からの肝疾患に対する病態解析と基礎並びに臨床研究を実施した。

## B. 研究方法

多施設共同研究、班員、班友による個々の研究、さらに二重盲検比較試験、大規模疫学研究、アンケートによる大規模調査、医療機関を受診した患者を対象とする後方視的観察研究、動物モデルを用いた基礎研究等によって検討を行った。

### （倫理面への配慮）

それぞれの研究は久留米大学倫理委員会をはじめとして、各班員・班友の所属する施設の倫理委員会の承認を得、患者の同意が必要な場合にはインフォームドコンセントを行った後、患者本人の書面による同意を得て研究を実施した。

## C. 研究結果

### (1) 新規治療法の開発

非代償性肝硬変患者の自己末梢血から、G-CSF製剤を5日間投与した後に採取した血管内皮前駆細胞(EPC;CD34陽性細胞)を、経肝動脈的に8例の患者に投与した。現在も進行中であるが、Child-Pugh スコア・MELD スコアの改善、アルブミン値の上昇、PT-INR 値の低下、門脈血流の増加、腹水量の減少、内服利尿剤の減量・中止、QOL 評価等の改善効果が認められた。一方、細田らはグレリンと肝再生との関連に関する基礎研究を実施中であり興味ある結果が得られつつある。

私共が開発したBCAA・亜鉛含有食品に対するプラセボ対照二重盲検試験は多施設共同研究として検討が開始され、目標症例数70例に対して現在44例の登録が行われている。症例集積期間は平成26年12月で、結果がまたれる。

HCV感染に伴う肝発癌に対するペプチドワクチンの基礎及び臨床研究を実施した。基礎研究ではHCV感染者に対する単一ペプチドワクチン開発の可能性を示唆する結果が得られている。またHCVペプチドへの抗体値の増強が確認され、ワクチン中止後の肝発癌と抗体値の低下には相関する結果が得られている。臨床研究ではインターフェロン治療抵抗性のC型慢性肝疾患患者35例において肝発癌予防を目的にワクチン投与され、47ヶ月の観察期間中での発癌は観察されていない。ワクチン中止後に4例に発癌が確認されている。これらの結果は、開発されたペプチドワクチンには、肝発癌に対する予防効果があることを示唆している。

NAFLD 患者を対象にして新規運動療法—ハイブリッド訓練法—によるインスリン抵抗性改善効果を検討した。患者136名のうち、生活指導を3ヶ月間行ったにも関わらず肝障害の改善を認めなかった35名を対象に検討を行った。実施した訓練法は両大腿部の筋肉に対し、主動筋の自発的収縮に対し、拮抗筋を電氣的に収縮させることで抵抗を作り出す新規運動療法であり、週1—2回を3ヶ月間行った。その結果、空腹時のインスリン値、HOMA-IR 値がコントロール群に比し有意に低下し、新規運動療法としての効果を検証することが出来た。

## (2) 病態の解明

山崎らは人口2.4万人の離島住民に対して肝炎ウイルス検診を行って、HCV 抗体の測定がなされた17712名の長期予後を検討した。HCV RNA が陽性であった812名の中で初診時80歳以上と49歳以下を除いた744名の長期予後を、HCV 抗体陰性で性、年齢を一致させた、無作為に抽出した対照住民1488名の予後と比較した。その結果、C 型慢性肝炎例ではインターフェロン療法の介入がなければ HCV 非感染者に比し生命予後が半分になること、インターフェロン療法を受ければウイルス駆除に関連することなく生命予後が、非感染者と同じになること、そしてこのような結果はインターフェロン療法を60歳までに受けているとき、その影響が明らかに現れることを大規模疫学調査によって明らかにした。

一方、私共は人口7400名の九州 X 町における12年間の疫学研究から住民の死亡に関わる因子としてアルブミン値が独立した有意な因子であり、4.0g/dL 未満の群は以上の群に比し寿命が短いことを明らかにした。

九州における肝癌患者の実態調査が行われた。

1996年から2009年における、九州地区の16施設で初発の肝癌と診断された9888例が集積された。その結果、九州地区の肝癌患者の特徴は、発症要因として HCV 関連肝癌の占める割合が最も多いが、近年その割合は低下傾向にあり、2009年度は61%であった。HBV 関連肝癌の割合はこの10年間変化がなく14—16%を推移している。nonBnonC 肝癌の占める割合が確実に増加しており、最近では20%を超えていることが明らかになった。肝癌患者の実態には経年変化や地域差があることを知って撲滅対策をたてる必要がある。

一方、最近の我が国における肝癌の動向を示した報告では、九州でもそうであるように nonBnonC 肝癌の増加が示されている。その要因として NASH,アルコール、糖尿病などの関与する病態が示唆されている。横須賀ならびに中島らは潜在性 HBV 感染の関与する病態と nonBnonC 肝癌との関連を検討した。血清、癌部並びに非癌部の肝組織を用いて TaqMan PCR 法で HBVDNA の surface,X,core ならびに cccDNA を測定すると、血中の HBV マーカーの有無とは必ずしも関連なく高い頻度で HBVDNA が検出されることが示された。今後さらなる検討が必要であるが、興味深い結果である。また、九州地区の nonBnonC 肝癌の発症要因や発見された肝癌のミラノ基準に関わる因子を解析し報告した。

一方、清家らは脂肪性肝疾患の進展過程における脾機能の役割について、脾摘高脂肪食誘導性肥満ラットを用いて検討をおこなった。その結果過栄養性脂肪肝から脂肪性肝炎へ進展する過程に脾機能低下が病態進展に関わる負の因子であることを示した。

糖尿病治療薬が肝発癌に影響を及ぼすことについての検討を行った。HCV 抗体陽性あるいは HCV RNA 陽性の40歳以上の肝細胞癌230例と

非肝細胞癌219例について、患者登録時に収集した血液生化学検査と糖尿病治療薬に関するデータをもとに、肝細胞癌と関連する因子を多変量解析にて検討した。肝細胞癌と関連する独立危険因子を検討した結果、年齢(60歳以上)、男性、肝硬変といった既知の肝発癌危険因子に加えて、インスリン製剤や第二世代スルホニル尿素剤の使用も、肝細胞癌と関連する独立した危険因子であることが明らかになった。

自己免疫性肝炎(AIH)では肝硬変への進展に関する病態解析を多施設共同研究として実施した。AIH300例のうち20.6%、62例が肝硬変進展例であり、その中の54例、87.1%は初診時すでに肝硬変進展例であった。再燃するAIH症例は肝硬変への進展の可能性が高く、また血中IgG4を測定できた例で肝硬変進展例と非進展例の割合を検討すると、高値例に進展例が多いことが明らかになった。また、AIH例での発癌を検討したが、肝癌は3.2%に、肝癌以外の発癌例が7.0%に認められた。AIH患者では肝癌以外の発癌率も高い可能性があることを念頭に経過を観察する必要性が示された。

我が国のウイルス性の肝炎患者、特にC型肝炎患者は高齢化していることが特徴である。そのため種々の合併症、肝炎ウイルスと関連した肝外合併症の出現頻度も高くなる。このような視点から口腔ケア、Oral Medicineの重要性をこれまで示してきた。そこで私共は患者の高齢化に伴う唾液分泌量の低下、歯周病の進行、咀嚼不全などの病態とC型肝炎との関連についての検討を行ってきた。インターフェロン療法時には唾液量が減少し、口腔内のカンジダ菌が増える傾向にあること、口腔カンジダ症発症者はアルブミン値が低い、粘膜病変の合併が口腔カンジダ菌を増加させることから、粘膜疾患の治療が必要であることを明らかにし

た。肝疾患患者では自覚症状がなくても味覚感度が低下している。歯牙疾患はインターフェロン療法の導入を妨げる要因になるため、導入前に口内感染源の治療が必要であることなどを明らかにした。

今福らによって乾癬とHCVとの関連についての検討が行われた。全国皮膚科医597医療機関を対象に調査がおこなわれ、乾癬患者のHCV感染率は6%であることが明らかにされた。福岡大学での調査では乾癬患者451例中24例、5.2%にHCV感染がみられた。また乾癬に先行してHCV感染が認められた。約3割の例は糖尿病を合併していた。インターフェロン療法が導入された6例中の4例は既存乾癬の悪化、2例は新規の発症であったことが明らかにされた。

加藤らはこれまでに、C型慢性肝炎及び肝癌の肝組織中に8-OH-dGが著明に蓄積していることを報告している。これらの結果を背景にして、長期の除鉄療法が肝発癌を抑制すること、8-OH-dGが発癌に関わる遺伝子群に存在すること、酸化的DNA損傷の修復系酵素活性の個体差が発癌危険因子となる可能性を指摘した。一方、東南らは肝内の鉄濃度をMRIによって客観的に、高感度に評価する方法を開発した。今後この方法を用いることが瀉血療法の指標や肝発癌のリスク評価に有用か否かを検討する必要がある。

#### D. 考察と結論

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多方面からの研究を行った。研究成果は多くの研究論文として報告されると共に、新たな治療法が実際の患者に導入され効果や有用性が検証された。また、一般住民や患者を対象にした啓発活動も積極的に行われた。



## E. 健康危険情報

特記すべきことはない。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Komatsu N, Yutani S, Yamada A, Shichijo S, Yoshida K, Itou M, Kuromatsu R, Ide T, Tanaka M, Sata M, Itoh K. Prophylactic effect of peptide vaccination against hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2010; 1(4): 619-626
2. Kawaguchi T, Kakuma T, Yatsushashi H, Watabe H, Saitsu H, Nakao K, Taketomi A, Ohta S, Tabaru A, Takenaka K, Mizuta T, Nagata K, Komorizono Y, Fukuizumi K, Seike M, Matsumoto S, Maeshiro T, Tsubouchi H, Muro T, Inoue O, Akahoshi M, Sata M. Data Mining Revealed Complex Interactions of Risk Factors and Clinical Feature Profiling Associated with Staging of non-HBV non-HCV-Hepatocellular Carcinoma. (Submitted for publication).
3. Taura N, Fukushima N, Yatsushashi H, Takami Y, Seike M, Watanabe H, Mizuta T, Sasaki Y, Nagata K, Tabara A, Komorizono Y, Taketomi A, Matsumoto S, Tamai T, Muro T, Nakao K, Fukuizumi K, Maeshiro T, Inoue O, Sata M. The incidence of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C infection decreased in Kyushu area. *Med Sci Monit*. 17(2): PH7-11.2011.
4. Nagao Y, Matsuoka H, Kawaguchi T, Sata M. Aminofeel<sup>®</sup> improves the sensitivity to taste in patients with HCV-infected liver disease. *Med Sci Monit* 2010; 16: 7-12.
5. Nagao Y, Sata M. Dental problems delaying the initiation of interferon therapy for HCV-infected patients. *Virology* 2010; 7: 192.
6. Nagao Y, Sata M. Serum albumin and mortality risk in a hyperendemic area of HCV infection in Japan. *Virology* 2010; 7: 375.
7. 佐田通夫, 長尾由実子, 大坪維範, 岡村孝. C型肝炎. HCV感染とB cell clonality, 口腔癌, インスリン抵抗性についての検討. 犬山シンポジウム記録刊行会 2010; 27: 137-142.
8. 長尾由実子, 佐田通夫. C型肝炎の臨床最前線. IFN治療普及のための戦略. 肝胆膵 2010; 61: 28-35.
9. 長尾由実子, 佐田通夫. 肝炎ウイルスによる肝外病変. 今日の消化器疾患治療指針 第3版. 医学書院 東京. 2010: 592-595.
10. 長尾由実子, 佐田通夫. 九州X町の疫学研究～肝疾患並びに肝外病変の病態と治療の方策～. HCV感染の natural course を探る: わが国におけるコホート研究. 山形大学出版会 山形. 2010: 23-32.
11. Kawaguchi T, Nagao Y, Sata M. Taste alteration in palliative care. *Handbook of Nutrition and Diet in Palliative Care*. 2011 in press.
12. Ide T, Hino T, Ogata K, Miyajima I, Kuwahara R, Kuhara K, Sata M. Peginterferon-alpha-2b plus ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C as assessed by a multi-institutional questionnaire in Japan. *Hepatology Research* 2010; 40: 557-565.
13. Kawaguchi T, Shiba N, Takano Y, Maeda T,

- Sata M. Hybrid-Training of Voluntary and Electrical Muscle Contractions Decreased Fasting Blood Glucose and Serum Interleukin-6 Levels in Elderly People: A Pilot Study. *Appl Physiol Nutr Metab* 2011 In Press.
14. Fujimoto K, Kawaguchi T, Nakashima O, Ono J, Ohta J, Kawaguchi A, Tonan T, Ohshima K, Yano H, Hayabuchi N, Izuhara K, Sata M. Periostin, a matrix protein, has potential as a novel serodiagnostic marker for cholangiocarcinoma. *Oncology Report* 2011 In Press.
  15. Sakata M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Nakayama A, Ishizaki S, Sonaka I, Nakamura T, Itou M, Oriishi T, Abe M, Yanagimoto C, Koga H, Sata M. Oxidized albumin is associated with water retention and severity of disease in patients with chronic liver diseases. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 2010; 5: e247-e292.
  16. Sakata M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Nakayama A, Ishizaki S, Sonaka I, Maganuma M, Nakamura T, Itou M, Oriishi T, Abe M, Yanagimoto C, Koga H, Harada M, Sakamoto T, Oda, S, Sata M. Redox state of albumin is not associated with colloid osmotic pressure. *Mol Med Rep* 2010; 3: 685-687.
  17. Kawaguchi T, Sata M. Importance of hepatitis C virus-associated insulin resistance-therapeutic strategies for insulin sensitization. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1943-1952.
  18. Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Sumie S, Yamagishi S, Sata M. The pathogenesis, complications and therapeutic strategy for hepatitis C virus-associated insulin resistance in the era of anti-viral treatment. *Rev Recent Clin Trials* 2010; 5: 147-157.
  19. Kawaguchi T, Taniguchi E, Morita Y, Shirachi M, Tateishi I, Nagata E, Sata M. Association of exogenous insulin or sulphonylurea treatment with an increased incidence of hepatoma in patients with hepatitis C virus infection. *Liver Int* 2010; 30: 479-486.
  20. Kawaguchi T, Yamagishi S, Itou M, Okuda K, Sumie S, Kuromatsu R, Sakata M, Abe M, Taniguchi E, Koga H, Harada M, Ueno T, Sata M. Pigment epithelium-derived factor inhibits lysosomal degradation of Bcl-xL and apoptosis in HepG2 cells. *Am J Pathol* 2010; 176: 168-176.
  21. Kawaguchi T, Yamagishi SI, Sata M. Structure-function relationships of PEDF. *Curr Mol Med* 2010; 10: 302-311.

## 2. 学会発表

1. 中村徹, 鳥村拓司, 岩本英希, 黒木淳一, 住江修治, 福嶋伸良, 熊本政史, 岡村孝, 奥田誠也, 上野隆登, 佐田通夫. 第 18 回 浜名湖シンポジウム. 静岡, 2010.
2. 長尾由実子, 佐田通夫. HCV あるいは HBV 感染者における歯科治療時の自己申告調査. 第 55 回 (社)日本口腔外科学会総会・学術大会、千葉市、2010.10.16-18.
3. 長尾由実子, 佐田通夫. 歯科医療従事者における B 型並びに C 型肝炎ウイルス感染の実態調査. 第 55 回 (社)日本口腔外科学会総会・学術大会、千葉市、2010.10.16-18.
4. Ide T, Arinaga T, Ogata K, Miyajima I,

- Kuhara K, Kuwahara R, Sata M. Type IV collagen as predictive factor of relapsers in elderly women with chronic hepatitis C, genotype 1b, treated with peginterferon and ribavirin The 7th APASL Single Topic Conference "Hepatitis C Virus" Chiba, Japan, 2010.
5. Ogata K, Ide T, Arinaga T, Miyajima I, Kumashiro R, Kuwahara R, Sata M. Comparative study of mutations of HCV IRES is useful for the prediction of the effectiveness of the pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston, USA, 2010.
  6. Goto T, Yoshida H, Miyase S, Fujimaya S, Imazeki F, Yokosuka O, Matsumura H, Moriyama M, Yamamoto Y, Nishiguchi S, Kondo Y, Ueno Y, Sindo M, Yasutake A, Yamada G, Genda T, Ichida T, Ide T, Sata M, Shibuya A, Omata M, Koike K. Prospective randomized controlled "Head to Head" trial of peginterferon alpha-2a versus peginterferon alpha-2b in combination with ribavirin (IHIT-II) study: the second report 20th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL), Beijing, China 2010.
  7. Ogata K, Kashiwagi T, Ide T, Hamada N, Watanabe H, Sata M. Strong correlation between mutations in internal ribosome entry site(IRES)domain III region of hepatitis C virus and sensitivity to anti-viral therapy for chronic hepatitis C BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)神戸 2010.
  8. Miyajima I, Ide T, Arinaga T, Ogata K, Kuwahara R, Kuhara K, Sata M. Management for younger patients with chronic hepatitis B in Japan The 8th JSH Single Topic Conference, Tokyo, Japan, 2009.
  9. 井出達也、有永照子、宮島一郎、緒方啓、久原孝一郎、桑原礼一郎、佐田通夫. 高齢女性におけるC型慢性肝疾患のインターフェロン治療効果の検討. 第 46 回日本肝臓学会総会 山形 2010.
  10. 井出達也、有永照子、宮島一郎、緒方啓、桑原礼一郎、佐田通夫. C 型慢性肝炎難治例に対する IFN $\beta$  1 日 2 回投与および二重濾過血漿交換療法の応用と HCV アミノ酸変異. 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 2010.
  11. 有永照子、井出達也、宮島一郎、緒方啓、久原孝一郎、桑原礼一郎、古賀郁利子、鳥村拓司、神代龍吉、佐田通夫. 自己免疫性肝炎における診断基準としての IAHG 改訂版と simplified criteria の評価検討. 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 2010.
  12. 阿部和道、菅野有紀子、芥藤広信、高橋敦史、横川純子、有永照子、井出達也、西村順子、井上 恵、清家正隆、佐田通夫、入澤篤志、大平弘正. 自己免疫性肝炎の肝硬変進展における IgG4 の関与についての検討. 第 46 回日本肝臓学会総会 山形 2010.
  13. 宮島一郎、井出達也、桑原礼一郎、久原孝一郎、緒方 啓、有永照子、佐田通夫. B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤投与中止例の検討. 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 2010.

14. Tonan T, Funimoto K, Qayyum A, Kawaguchi T, Kawaguchi A, Okuda K, Nagata S, Hayabuchi N, and Sata M. Quantification of Hepatic Iron Overload: Usefulness of Echo-plannar Imaging Based Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging, in: Proceedings Eighteenth Annual Meeting ISMRM, Stockholm, P523, May 2010.
15. Kawaguchi T, Shiba N, Maeda T, Matsugaki T, Takano Y, Itou M, Sakata M, Taniguchi E, Nagata K, Sata M. Hybrid-training of voluntary and electrical muscle contractions improves nonalcoholic fatty liver disease and reduces insulin resistance and interleukin-6 levels. The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston, USA, 2010.
16. Kawaguchi T, Fujimoto K, Nakashima O, Ono J, Ohta S, Kawaguchi A, Tonan T, Oshima K, Yano H, Hayabuchi N, Izuhara K, Sata M. Periostin, a matrix protein, is a novel serodiagnostic marker for cholangiocarcinoma. The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston, USA, 2010.
17. Kawaguchi T, Yamagishi S, Matsui T, Taniguchi E, Itou M, Sakata M, Abe M, Hanada S, Oriishi T, Sata M. Branched-chain amino acid (BCAA) treatment may improve insulin resistance by elevating circulating levels of pigment epithelium derived factor (PEDF) in cirrhotic patients with HCV infection. The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston, USA, 2010.
18. Kawaguchi T, Yatsushashi H, Watabebe H, Saitsu H, Nakao K, Taketomi A, Ohta S, Tabaru A, Takenaka K, Mizuta T, Nagata K, Komorizono Y, Fukuizumi K, Seike M, Matsumoto S, Maeshiro T, Tsubouchi H, Muro T, Inoue O, Akahoshi M, Sata M. Data mining revealed clinical feature profiling associated with staging of non HBV- and Non HCV-related hepatocellular carcinoma. The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), Boston, USA, 2010.
19. Taniguchi E, Kawaguchi T, Itou M, Oriishi T, Sata M. Assessment of anti-obese effect in obese patients with metabolic disorders. 11th International Congress on Obesity (ICO), Stockholm, Sweden, 2010.
20. 後藤恵美子、小川由美、友永愛美、川口巧、谷口英太郎、伊藤 実、居石哲治、石橋紀子、上田真理子、佐田通夫、平川道子。消化器疾患患者における肥満の実態調査。第 26 回日本静脈経腸栄養学会，愛知，2011。
21. 今永美波、荻原ゆかり、末継拓郎、武藤芳哲子、大津山樹里、谷口英太郎、伊藤 実、川口 巧、居石哲治、内田夕希、大塚百香、田中稔子、小野 緑、佐田通夫。肝硬変患者に対する疾患・栄養療法・生活習慣認知からみた患者教室の有効性。第 26 回日本静脈経腸栄養学会，愛知，2011。
22. 谷口英太郎、川口 巧、伊藤 実、居石哲治、今永美波、荻原ゆかり、末継拓郎、武藤芳哲子、大津山樹里、内田夕希、大塚百香、田中稔子、小野 緑、佐田通夫。主観的包括的評価による栄養障害を示す消

- 化器疾患患者のスクリーニング. 第 14 回  
日本病態栄養学会, 神奈川, 2011.
23. 川口 巧、谷口英太郎、森田恭代、白地美紀、佐田通夫. 糖尿病治療薬とHCV陽性肝細胞癌の関連. 第 95 回日本消化器病学会九州支部例会, 福岡, 2010.
  24. 川口 巧、谷口英太郎、佐田通夫. 糖尿病治療薬とHCV 関連肝細胞癌. 第 46 回日本肝臓学会総会, 山形, 2010.
  25. 大津山樹理、伊藤 実、武藤美智子、末継拓郎、荻原ゆかり、川口 巧、谷口英太郎、居石哲治、内田夕希、大塚百香、永松あゆ、田中粹子、佐田通夫、秋山良子、小野 緑. 肝癌・食道医静脈瘤治療の栄養状態におよぼす影響. 第 2 回日本静脈経腸栄養学会九州支部学術集会, 福岡, 2010.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### (予定を含む)

1. 国際出願PCT/JP2009/56586, 肝疾患に伴う浮腫の判定方法, 出願人 学校法人久留米大学、味の素株式会社 共同出願, 発明者 佐田通夫、川口 巧、坂田雅浩、惣中一郎.
2. 国内出願特許 2009-274873, 胆管細胞癌の検出方法および予防・治療剤のスクリーニング方法, 出願人 学校法人久留米大学、国立大学法人佐賀大学 共同出願, 発明者 藤本公則、川口 巧、佐田通夫、中島 収.

## Ⅱ . 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)  
分担研究報告書(平成 22 年度)

肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究

研究代表者:佐田通夫 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門講座 教授

研究協力者:中村 徹 久留米大学医学部内科学講座消化器内科部門講座 助教

研究課題: 血管内皮前駆細胞を用いた肝再生療法

**研究要旨:**我々は、これまでの基礎研究において、血管内皮前駆細胞(EPC;CD34陽性細胞を意味する)を投与することで、肝内の血管形成の促進と血管内皮前駆細胞の持つ各種増殖因子により肝再生の促進、予後の改善、線維化の抑制、門脈血行動態の改善が認められることを明らかにした。このような背景を踏まえ、ヒトへの臨床応用を目的とし、非代償性肝硬変症患者を対象として、自己末梢血から採取したCD34陽性細胞(EPC)を投与することで肝線維化の改善、肝臓再生が促進され、肝機能の改善がみられるか否かを明らかにするとともに、有効性と安全性について検討した。2008年11月より「末梢血CD34陽性細胞を用いた非代償性肝硬変症に対する細胞移植療法の試み」と題し、久留米大学倫理委員会にて審査・承認のもと、現在までに8症例(HBV:1例、HCV:6例、アルコール:1例)の患者に対し治療を行った。現在も進行中の臨床研究であるが、肝予備能を示すChild-Pughスコア・MELDスコアの改善、血清アルブミン値の上昇、PT-INR値の低下、門脈血流量の増加、腹水量の低下、内服利尿剤の減量・中止、SF-36v2を用いたQOL(生活の質)評価の改善等を得た。それ以前は単核球細胞を用いて細胞移植を行っていたが純化されていない状態であったこと、全身投与されていたことより、以前よりも増した治療効果が期待されつつある。

#### A. 研究目的

骨髄由来の血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell, EPC)は1997年、浅原らにより成人ヒト末梢血中の単核球成分の一部(CD34陽性細胞分画)として存在することが証明された。この細胞は炎症、虚血、障害部位へ特異的に取り込まれるという特徴を有している。また一方で、近年、末梢血CD34陽性細胞はヘテロな細胞分画のため、その場の環境に応じてほかのlineageへの多分化能を示すことがわかりつつある。我々は、急性肝不全モデルマウスに対し健常ヒト末梢血由来*ex vivo*増幅EPCを経脾的に投与すると、死亡率が著明に低下することを明らかにし、さらに肝硬変症モデルラットに対しラット骨髄由来*ex vivo*増幅EPCを経静脈的に投与すると、肝内の血管形成

の促進とEPCより産生される各種増殖因子の周囲組織への供給により、肝線維化の抑制、肝再生の促進、予後の改善が認められることを明らかにした。しかし、我々がこれまでに報告してきた*ex vivo*増幅EPCでは動物血清を使用していたため、臨床応用に際しては人畜感染症のリスクを有する。臨床応用を考慮するに、今後は無血清培地を用いた培養法の確立が必要になる。EPCは広義ではCD34陽性細胞と定義されていることより、早期に臨床応用可能なEPCとしてのcell sourceはCD34陽性細胞と考える。そこで、最近、我々は末梢血より採取したヒトCD34陽性細胞を用いた肝硬変症モデルラットに対する治療効果を検証した。ヌードラット肝硬変症モデルにおいて、移植したヒトCD34陽性細胞は、肝内で血管内皮細胞、肝類

洞内皮細胞、血管平滑筋細胞へ分化し、移植細胞数依存性に肝線維化の抑制のみならず、肝再生の促進、予後の改善が認められることを明らかにした。この基礎研究をもとに、2009年1月から非代償性肝硬変症患者に対する自家 CD34 陽性移植による肝臓再生治療を開始した。

## B. 研究方法

本研究の治療プロトコルを示す。

[治療適応基準]

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

1) 上記治療適応基準を満たしこの治療法についての承諾を得られた患者に対し治療前検査(採血検査、腹部・心臓超音波検査、全身CT検査、腹部MRI検査、上部消化管内視鏡検査、骨髄検査、肺機能検査等)をおこなう。

2) 入院後、5日間連続してG-CSF製剤(10 $\mu$ g/kg/day)を皮下投与する。

3) G-CSF投与開始4、5日目に、末梢血単核球細胞を採取する。採取は2日間連続して行う。

4) G-CSF投与開始5日目に採取した末梢血単核球(2日分)すべてから磁気細胞分離システムを用いてCD34陽性細胞を分離し、経肝動脈的に投与(移植)する。

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

6) 治療後は1ヶ月ごとに6ヶ月まで肝機能の評価(採血等)、門脈血行動態の評価(血管造影検査、腹部超音波検査、腹部CT検査等)を行い、治療

前の患者の肝機能、門脈血行動態と比較する。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

2011年1月までに8症例(HBV:1例、HCV:6例、アルコール:1例)を経験した。治療群は、採取された細胞数により、低用量群(Low, 5 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/kg)、中用量群(Mid, 1 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/kg)、高用量群(High, 2 $\times$ 10<sup>6</sup>cells/kg)の3群に分けた。対照群は、治療適応基準を満たしたものの、同意取得できなかった症例あるいは同意取得後の治療前検査にて適応外と判断された症例、合計7症例とした。なお、対照群に対しての治療制限はなく(特にアルブミン投与制限はない)、標準的な治療を継続した。

1) 現時点では統計学的な有意差はないものの、血清アルブミン値の変化率は、中・高用量治療群において対照群と比較し、治療後12週および24週において上昇した(12週後; Low, -7.5 $\pm$ 5.2%; Mid, 5.2 $\pm$ 6.6%; High, 9.8%; 24週後; Low, -9.2 $\pm$ 12.5%; Mid, 7.3 $\pm$ 9.7%; High, 10.5%)。

2) 現時点では統計学的な有意差はないものの、血清PT-INR値の変化率は、中・高用量治療群において対照群と比較し、治療後12週および24週において低下した(12週後; Low, -0.2 $\pm$ 12.1%; Mid, -5.7 $\pm$ 6.7%; High, -7.8%; 24週後; Low, 3.3 $\pm$ 7.7%; Mid, -4.0 $\pm$ 9.3%; High, 0.7%)。

3) 現時点では統計学的な有意差はないものの、肝予備能の指標とされるChild-Pughスコア、



MELD スコアは、増悪傾向を示す対照群と比較し、全治療群において増悪傾向を抑制した。

- 4) 現時点では統計学的な有意差はないものの、血清学的な肝線維化マーカーである血清ヒアルロン酸、血清 7S コラーゲン、血清IV型コラーゲン値の変化率は、中・高用量治療群において治療後 24 週において低下した。
- 5) 現時点では統計学的な有意差はないものの、門脈血流量は、全治療群において治療後 4 週(早期)より増加し、24 週後においても持続していた。
- 6) 腹水を認めていた患者に対しては、腹水量の低下、内服利尿剤の減量・中止を可能にした。
- 7) SF-36v2 を用いた QOL(生活の質)評価は、全治療群において改善した。
- 8) 現時点まで、治療後に合併症が生じた症例はない。特に、G-CSF 製剤投与による脾破裂、肝発癌も認めていない。

#### D. 考察

今後考えられる新たな課題として、十分な数の CD34 陽性細胞(EPC)をいかに確保するかである。末梢血より採取可能なため低侵襲ではあるが、採取可能な細胞数は限られており、肝硬変など広範な臓器障害に対する治療をするには十分な細胞数が必要不可欠である。細胞数の問題の解決策として、全身投与ではなく局所投与することは言うまでもないが、それは平成 21 年度より実行済みである。このほか、サイトカインや増殖因子を添加し、セル・プロセッシング・センター(CPC)などで効率よく培養・増幅させることが考えられる。得られる細胞数もさることながら、その細胞の質にも着目する必要がある。それは、実際に治療を受ける患者は

高齢(細胞の老化)であったり様々な基礎疾患(高血圧、糖尿病等)、喫煙などの嗜好が存在することが多い。そのような場合、血管内皮細胞の機能が低下していることが知られているからである。最適なサイトカインや増殖因子、抗酸化剤を添加し培養することにより、低下した機能まで回復するのではないかと期待している。

#### E. 結論

現時点では統計学的な有意差はないものの、肝予備能の指標とされる Child-Pugh スコア・MELD スコアの改善(増悪抑制)効果や、肝での合成能を示す血清アルブミン値の上昇、PT-INR 値の低下を確認した。また、腹水を認めた患者に対しては、腹水量の減少、内服利尿剤の減量・中止を可能にし、有効性が示されつつあると考えた。前癌病変と言われる肝硬変を母体とした再生において懸念される肝発癌の発生は現時点まで認めていないことより、安全面においても結果が得られつつあると考えている。

肝硬変等重篤な肝障害の根本的治療として肝(臓器)移植しかない現状のなか、脳死・生体部分肝移植は確立した治療法ではあるが、医療経済的問題やドナー不足は深刻化しており、ドナー不足の解決策としても、本研究のような幹細胞を用いた細胞移植治療は、肝移植治療の問題を解消できる治療法としても大変注目される位置づけにある研究と考えられ、社会的貢献度も大いに期待できるものと推測する。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

## 2. 学会発表

1. 中村徹. 血管内皮前駆細胞(末梢血 CD34 陽性細胞)を用いた肝臓再生療法 -基礎研究から臨床研究へ-. 第 8 回 九州 BMT 研究会. 福岡, 2010.
2. 中村徹, 鳥村拓司, 岩本英希, 黒木淳一, 住江修治, 福嶋伸良, 熊本政史, 岡村孝, 奥田誠也, 上野隆登, 佐田通夫. 第 18 回 浜名湖シンポジウム. 静岡, 2010.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

なし。

『肝炎・肝硬変に対する抗ウイルス剤以外の治療法に関する研究』

研究協力者：細田洋司

国立循環器病研究センター 再生医療部 室長

研究課題： グレリンはラット肝切除後の肝再生を促進する

研究要旨：末梢性グレリンは、迷走神経求心路を介して視床下部に作用して成長ホルモン分泌や摂食を促進し、さらに自律神経遠心路を介して全身のエネルギー代謝の調節、肝機能および消化管機能調節などに関与する。今回、研究協力者は、70%肝部分切除ラットに対してグレリン投与を行い、肝再生能に対するその効果を自由摂食及び摂食量制限下に検討した。その結果、グレリンは肝切除後の肝組織再生能の促進効果を示し、特に摂食量を抑制したエネルギー欠乏状態では有意な肝再生促進作用を認めた。グレリン投与によって、肝細胞増殖に関わる各種成長因子の遺伝子発現には有意な変化が認められなかったものの、核内増殖抗原（PCNA）の遺伝子発現が有意に増加した。グレリンによるエネルギー代謝調節作用が肝再生促進効果の一つと思われる。グレリンは肝切除後の肝組織再生を促進する効果を有し、これまでにないアプローチによる肝再生の改善薬として応用可能と思われる。

A. 研究目的

研究協力者らは、1999年にラットおよびヒトの胃組織から新規ペプチドホルモンであるグレリン(ghrelin)を発見した。グレリンは、主に胃から産生分泌され、求心性迷走神経路を経て中枢神経にそのシグナルを伝達し、強力な成長ホルモン(GH)分泌促進活性や摂食亢進作用、遠心性自律神経系を介した全身のエネルギー代謝調節作用、消化管機能調節作用等をもつ。我々はこれまでの研究から、グレリンが肝細胞増殖作用や肝血流量増加作用、薬剤性肝障害の軽減作用等を明らかにしている（論文投稿中）。

正常な肝臓は、他の臓器ではみられない強い再生能力をもつ。肝切除後の肝容量の回復は、ラットやマウスではほぼ1週間で回復するの

に対し、ヒトでは正常肝では1-2ヶ月、病的肝で3-5ヶ月ほど要する。肝容量回復のスピードは切除肝容量に比例して早くなり、肝切除後の肝再生は肝重量/体重比が一定になるまで続く。ヒトの病的肝臓では肝再生能は低下しており、各種治療に伴う肝臓への負担によって肝不全に陥ることもある。

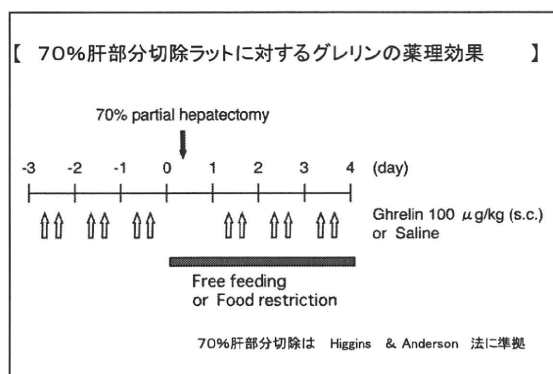
今回、我々は、70%肝部分切除ラットを作製し、グレリンによる肝組織再生能に対する改善効果を検討した。

B. 研究方法

Higgins GMとAnderson RMの肝切除法に準拠し、Wistar rat（オス、11週齢）に70%肝部分切除を行い、術前後3日間グレリン（100 µg/kg）

または生食を1日2回皮下投与を行った(図1)。肝切除後4日目に残存肝を摘出し肝組織重量の測定を行い、肝切除直前の体重と比較した。定量PCR法を用いて肝細胞増殖に関連する因子について遺伝子発現量を検討した。また、肝切除後に摂食制限(術前摂食量の40%)を行い、エネルギー欠乏が肝再生能に与える影響とグレリンによるその改善効果を検討した。

図1



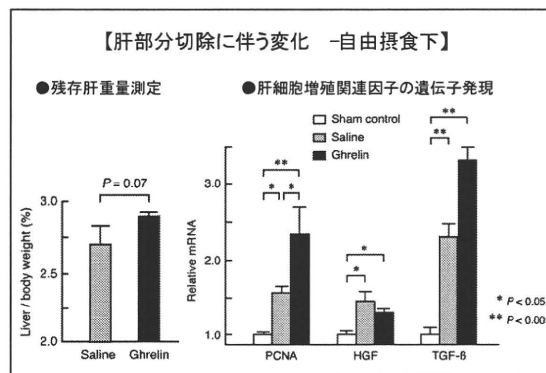
(倫理面への配慮)

本研究は国立循環器病研究センターが定める動物実験規定に沿って行われた。

### C. 研究結果

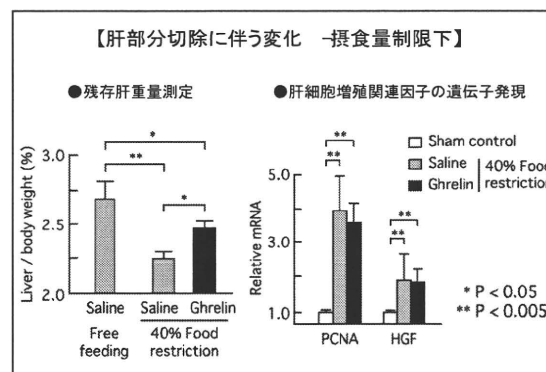
自由摂食下において、グレリン投与により残存肝重量は増加傾向を認めた(図2)。残存肝にて肝細胞増殖関連因子の遺伝子発現変化を検索したところ、グレリン投与群において核内増殖抗原(proliferative cell nuclear antigen、PCNA)の有意な増加が認められた。PCNAはDNAの複製部位に強く結合するDNAポリメラーゼ $\delta$ の補助タンパクとして同定され、PCNA合成レベルは細胞周期中の細胞増殖及びDNA合成の程度に相関する。強力なmitogenであるHGF遺伝子発現は、肝切除により有意に増加するが、グレリン投与による修飾効果は認められなかった。その

図2



他TNF- $\alpha$ やIL-6、TGF- $\alpha$ 、EGF等に生食群と比較して有意な変化は認められなかった。一方、肝再生停止に関わるTGF- $\beta$ の遺伝子発現はグレリン投与により有意な増加が認められた。

図3



摂食量制限によって、肝再生は約80%程度に抑制される(図3)。この抑制はグレリン投与によって有意に改善される。PCNAやHGF等の肝細胞増殖関連因子の遺伝子発現に、グレリン投与による有意な変化は認められなかった。

### D. 考察

本研究班において、薬剤性肝硬変モデルラットを用いたグレリンによる薬剤性肝硬変の進展抑制効果を、これまでに報告している。グレリンは、①迷走神経を介した肝機能調整作用、②GH—IGF-1—HGF系を介した作用、③摂食促進やエネルギー代謝調節によるサポートによって、肝細胞増殖作用や肝保護作用、全身性及び肝細胞のエネルギー代謝改善効果を発揮すると考えられる(図4)。