

**図1 幹細胞の自己複製と多分化能**  
 幹細胞は多分化能を有しつつ自己複製をおこなっている。造血幹細胞を例にとり示すと、血液系は多様な形態と機能を有する成熟血液細胞から構成される。造血幹細胞はこれらの成熟細胞を産出するシステムの頂点において、自分自身の自己複製をおこなうと同時に、より分化した造血前駆細胞を産み出す「非対称性分裂」をおこなっている。産出された造血前駆細胞は、強力かつ短期間に増殖するとともに、細胞が成熟化していく。増殖能と分化度は反比例し、分化とともに増殖能も減弱していく。終末分化した細胞は寿命をおえた後に除去されていく。  
 (柿沼 晴ほか, 2006<sup>15)</sup>より改変引用)

ムの頂点にいる細胞である。すなわち、造血幹細胞は自分自身の自己複製をおこなうと同時に、より分化した造血前駆細胞を産み出す「非対称性分裂」をおこなっていると考えられている。産出された造血前駆細胞は、強力かつ短期間に増殖するとともに、細胞が成熟化していく。通常、増殖能と分化度は反比例し、分化とともに増殖能も減弱していく。そして終末分化した細胞は寿命をおえた後に除去されていく(図1)。

最近、造血幹細胞にはいくつかの興味深い特徴があることが示された。造血幹細胞は、成体マウスの骨髄中ではCD34陰性、c-Kit陽性、Sca-1陽性、Lineage陰性という細胞表面抗原によって分離が可能であり、この画分から得た細胞1個をマウスに移植しても、骨髄再構築が可能である<sup>2)</sup>。一方で、通常は骨髄ニッチェとよばれる、特定のサイトカインシグナルと細胞外マトリックスが提

供される細胞外環境のなかにおり、高い増殖能をもつ細胞であるにもかかわらず、そこで分裂を抑制するシグナルを受けて、細胞周期としてはほとんどが静止期のまま存在している<sup>3)</sup>。マウスでは、造血幹細胞は約3週間に1回だけ細胞周期に入り、分裂することも明らかになった<sup>4)</sup>。このような「遅い分裂」は、体内のほとんどすべての造血幹細胞が「順番に」おこなっており、ある特定の細胞だけが分裂し、血液供給に貢献しているわけではない。一方で、幹細胞から産み出された造血前駆細胞は急速に分裂・増殖し、それが分化して膨大な数の成熟細胞を供給する。このような幹細胞システムは、階層性(ヒエラルキー)をつくることで幹細胞という重要な細胞を生体内で保護しつつ、同時に細胞の大量産生をおこなううえでも目的である。そして、これが破綻すると正常な造血能が失われてしまう。

## がん幹細胞

もともと、癌といっても、すべての細胞がクローナルに同じ形質で増殖しつづけているのではないことは、種々の臨床的ならびに実験的知見から明らかであった。そこでたとえば、幹細胞がわずかな遺伝子変異を起こしてしまった場合、通常は体細胞とくらべて高い自己複製能を有するがゆえに、より癌としての形質を獲得しやすいのではないかと、ということが考え得る。この仮説を裏づけるように、急性骨髄性白血病の患者から得られた白血病細胞をマウスに移植した実験では、白血病細胞全体のわずか0.2%にすぎないCD34陽性かつCD38陰性という細胞集団によってのみ移植が成立した。一方で、それ以外の細胞には、腫瘍を形成できる細胞がごく低頻度しか存在しなかった。このことは、白血病細胞の腫瘍性増殖に中心的な役割を果たすのは、ごく一部の細胞であることを示している<sup>5)</sup>。さらに、この細胞表面抗原のパターンはヒトの造血幹細胞とほぼ一致していた。これらのことから、白血病細胞の増殖に中心的な役割を果たすこの細胞は「白血病幹細胞」とよばれるようになった。この概念はほかの上皮系細胞にも拡大されており、近年は、大腸癌や乳癌でも「癌幹細胞(cancer-initiating cell)」として、1個の細胞から実験動物の体内に腫瘍を形成で

き  
瘍  
こ  
導

「  
細  
の  
い  
わ  
る  
の  
る  
と  
わ  
か  
て  
大  
告  
胞  
形  
い  
構  
を  
W  
の  
の  
能  
ウ  
た  
れ  
作  
ま  
が  
ま  
は  
c

細  
ナ  
ま  
に  
っ  
て  
の  
な  
急  
胞  
ヒ  
を  
う  
E

きる細胞が同定されはじめた。白血病と同様に、固形腫瘍でも同じ考え方が適用できると考えられたことから、このような細胞を包括的に「がん幹細胞」とよぶ概念が導入された。

少し視点を変えてみると、従来から定説になっている「体細胞に少しずつ変異が蓄積されていき、最終的に癌細胞の形質を獲得する」という考え方（多段階発癌説）のモデルと比較して、腫瘍のなかに幹細胞が存在するという考え方は、かなり異なった考え方である。すなわち、わずかな遺伝子変異だけでも、もともと自分もっている幹細胞の特性（高い自己複製能とそれを支持するための分子機構）を生かして、癌細胞はより簡単に出現する。しかも、それは腫瘍形成に中心的な役割を果たす、ということである<sup>6)</sup>。一方で、幹細胞の自己複製にかかわる分子機構の多くが、発癌にも関与していることもわかってきた。たとえば、種々の幹細胞の自己複製において重要なシグナル分子である Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は、大腸癌や肝癌など多種類の癌で発癌に関与することが報告されている。このことは「もともと寿命の長い正常細胞に幹細胞維持にかかわる遺伝子変異が徐々に集積して形成された」という多段階発癌説の可能性も否定してはいない。このように、幹細胞の形質解析は、通常の組織構築のあり方に加えて、癌の発生に関しても重要な知見を有しているといえる。次項からは、ここで例にあげた Wnt シグナルについて解説していきたい。

### Wnt シグナルと古典的経路

Wnt は細胞間のシグナルを伝えるリガンドとして機能する分泌性糖蛋白質類の総称であり、この名称はショウジョウバエの Wingless とマウスの乳癌からみつかった Int-1 という 2 つの遺伝子の名前に由来して名づけられた。そして、パラクライン的なさまざまな細胞間相互作用にかかわるリガンド分子として機能している。現在までに、マウス・ヒトの双方で 19 種類のファミリー分子が同定され、ノックアウトマウスの解析などによってさまざまな機能が明らかにされている。Wnt の下流経路は大きく分けて、古典的経路である  $\beta$ -catenin 経路と  $\beta$ -catenin を介さない非古典的経路とよばれる経路があ

る。 $\beta$ -catenin 経路に関しては、臓器発生過程でさまざまな役割を果たすとする報告が数多くなされており、幹細胞の活躍によっておこなわれる臓器形成に大きな役割を担っている。

では古典的経路である  $\beta$ -catenin 経路とは、どのようなになっているのだろうか？  $\beta$ -catenin は Wnt 非存在下では glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )、adenomatous polyposis coli (APC)、Axin などからなる蛋白質複合体と結合し、これらによってユビキチン化を受け、絶えず分解されている。この状態では  $\beta$ -catenin を介したシグナルは伝わらない。一方で、リガンドである Wnt が受容体の Frizzled/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 複合体に結合すると、そのシグナルが下流の Dishevelled を介して伝わることで  $\beta$ -catenin はこの分解複合体から解放されて安定化する。安定化した  $\beta$ -catenin は核内に移行し、転写因子である T-cell factor/lymphoid enhancer binding factor (TCF/LEF) と結合してこれを活性化する。活性化した TCF/LEF は標的遺伝子の転写を促進し、その結果として増殖や分化に関する細胞形質に大きな影響を与えていく。代表的な標的分子としては、細胞周期を正に制御する Cyclin D1 や c-Myc があげられる。この経路の簡単な模式図は図 2 のようになる。

Wnt 古典的経路を刺激するリガンドとしては、19 種類の Wnt ファミリーのうち、Wnt-1 や Wnt-3a が代表的なものと考えられている。Wnt-1 を欠損するマウスでは中脳と小脳が欠損し、出生後すぐに死亡することから、Wnt-1 は中枢神経系の発生にきわめて重要な役割を果たすことが明らかになっている<sup>7)</sup>。同様に、Wnt-3a 欠損マウスでは発生初期の段階から尾側の体節形成不全が起こり、胎生中期になると臍よりも尾側が欠損してしまうような、大きな発生異常が起きる<sup>8)</sup>。さらに、 $\beta$ -catenin 欠損マウスは、「原腸陥入」という発生のきわめて初期に異常が生じることも報告されている<sup>9)</sup>。これらのことから、Wnt 古典的経路は、体軸形成などの受精卵から個体を形成する初期の段階に大きな役割を果たしていることがわかる。一方で、これら個別の Wnt リガンドと消化器系幹細胞の関係はあまり詳しくわかっていない。

理由の第一は、この 19 種類の遺伝子を 1 個ずつ欠損

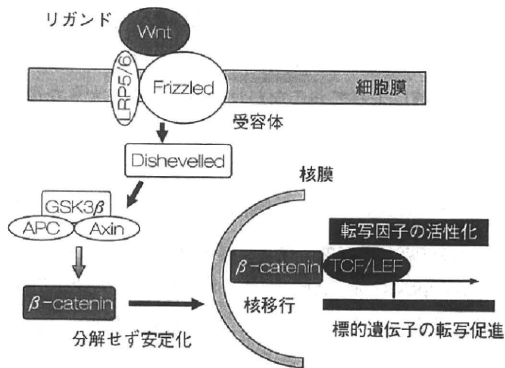


図2 Wnt 古典的経路のシグナル伝達

$\beta$ -catenin は Wnt 非存在下では GSK3 $\beta$ , APC, Axin などからなる蛋白質複合体と結合し、これらによって絶えず分解されている。この状態では  $\beta$ -catenin を介したシグナルは伝わらない。一方で、リガンドである Wnt が受容体の Frizzled/LRP 複合体に結合すると、そのシグナルが下流の Dishevelled を介して伝わることで  $\beta$ -catenin はこの分解複合体から解放されて安定化する。安定化した  $\beta$ -catenin は核内に移行し、転写因子である TCF/LEF と結合して TCF/LEF を活性化する。活性化した TCF/LEF は標的遺伝子の転写を促進する。この経路はさまざまな組織における幹細胞の機能に影響を与えている。

させたマウスをつくっても、「肝臓や腸を欠損したマウスが生まれた」という現象がみられなかったからである。受容体の Frizzled は 11 種類、catenin には  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の 3 種類、最も下流の転写因子 TCF/LEF でも Tcf-1, Lef-1, Tcf-3, Tcf-4 の 4 種類のファミリー分子が同定されている。このように多数の分子がファミリーを形成しているということは、この経路で 1 つの遺伝子を欠損しても、ほかのファミリー分子がその機能を補うことでレスキューされるような現象がはたらきうる。これを functional redundancy とよんでいる。したがって、消化器系幹細胞における Wnt 古典的経路の機能を解析するには、臓器特異的に複数の遺伝子を欠損させるなど、少なからず工夫が必要になってくる。理由の第二としては、前述の  $\beta$ -catenin のように、単に欠損させると発生が進まず、肝臓や腸が形成される以前にマウスが致死となってしまう解析ができない、ということもある。

工夫した研究の結果、いくつかの事実が明らかになっている。下流分子の 1 つである Tcf-4 を全身で欠損さ

せたマウスでは、腸管上皮の幹・前駆細胞が消失するために、腸上皮の形成不全が認められる<sup>10)</sup>。すなわち、Tcf-4 およびこれを用いて伝わる Wnt 古典的経路のシグナルは腸管上皮幹細胞を維持するために必須であるといえる。また、肝臓特異的に  $\beta$ -catenin を欠損させたマウスでは、胎生中期に欠損させた場合に限り、胎生期の肝幹・前駆細胞といえる肝芽細胞に細胞死 (アポトーシス) が生じるために、肝臓の形成不全が起きる<sup>11)</sup>。しかしながら、産まれた後に  $\beta$ -catenin を肝臓で欠損させたマウスでは、少し再生遅延が起きる程度で、大きな形質の変化はみられなかった<sup>12)</sup>。このことは、 $\beta$ -catenin を介した Wnt 古典的経路というものが、臓器別に、かつ、発生時系列的に重要度が異なっていることをも示している。

一方で、 $\beta$ -catenin は細胞周期を正に制御する Cyclin D1 や c-Myc の転写を亢進させるため、癌細胞における遺伝子変異とも密接なつながりがある。有名な大腸癌・肝細胞癌のほか、胃癌、肺癌、卵巣腫瘍、腎臓ウィルムス (Wilms) 腫瘍、悪性黒色腫、前立腺癌、甲状腺癌などほぼ全身の癌で遺伝子変異の報告がなされている ("The Wnt homepage" <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html> 参照)。幹細胞維持に必要なシグナルは、癌の発生とも密接な関係があるものと考えられ、この面からの研究も近年進んでいる。たとえば、胎生期の肝幹・前駆細胞に変異型の  $\beta$ -catenin を発現させると、自己複製能を有する癌細胞となり、癌幹細胞としての形質に酷似してくることが報告された<sup>13)</sup>。Wnt 古典的経路は、増殖を直接制御しうる分子の発現をおもに亢進させるので、今後、癌幹細胞とのさまざまなつながりが研究されていくと考えられ、分子標的治療のターゲットにもなっていくと推測される。

## Wnt シグナルと非古典的経路

Wnt 非古典的経路というと 1 つの経路に聞こえてしまいが、実際には数種類の異なった経路を指しており、「 $\beta$ -catenin を介さない経路全体」を包括している呼称である。その経路の一部を図示したのが図 3 である。まずは、planar cell polarity (PCP) 経路として包括されるいくつかの経路がある。LRP と会合していない Frizzled

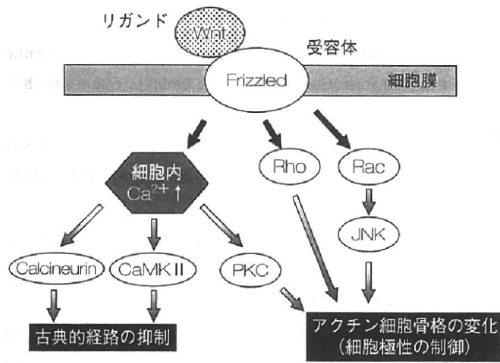


図4 Wnt 非古典的経路のシグナル伝達

Wnt 非古典的経路は  $\beta$ -catenin を介さない経路全体を包括している。LRP と会合していない Frizzled 分子を受容体として、リガンドの Wnt が結合すると、いくつかのシグナル経路が動き出す。Rho あるいは Rac といった中間分子を介して、アクチンなどの細胞内骨格の再構成が開始される。Rac は同時に JNK などの別のキナーゼを活性化することによって、遺伝子発現の調節にも関与する。この結果、細胞は運動状態あるいは細胞極性を変化させる。一方で、細胞内小器官からカルシウムイオンを大量に放出させることによって活性化される  $Ca^{2+}$  経路がある。活性化される分子の1つである PKC は、同様に細胞内骨格の再構成に関与する。CaMK II や Calcineurin が活性化されると、古典的経路の下流分子である  $\beta$ -catenin や TCF の転写活性を負に抑制する。

分子を受容体として、リガンドの Wnt が結合すると、いくつかのシグナル経路が動き出す。第一に、Rho あるいは Rac といった中間分子を介して、アクチンなどの細胞内骨格の再構成が開始される。この結果、細胞は運動状態あるいは細胞極性を変化させるため、上皮細胞にとっては、機能的な変化を惹起する重要なシグナルとなる。Rac は同時に c-Jun N-terminal kinase (JNK) などの別のキナーゼを活性化させることによって、遺伝子発現の調節にも関与する。

第二に、Wnt の結合によって Frizzled を介して伝わったシグナルが、細胞内小器官からカルシウムイオンを大量に放出させることによって活性化される  $Ca^{2+}$  経路として包括される経路がある。活性化される分子の1つであるプロテインキナーゼ C (PKC) は、さきほどの PCP 経路と同様に細胞内骨格の再構成に関与する。一方で、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK

II) やカルシニューリン (Calcineurin) なども活性化され、これらは古典的経路の下流分子である  $\beta$ -catenin や TCF の活性化を負に制御している<sup>14)</sup>。このように、非古典的経路は、古典的経路にくらべて増殖よりも細胞の運動や機能にかかわる分子に影響を強く与えている。

このほかにも数種類の分子の動きが報告されているが、少し話を複雑にしているのは、特定の Wnt 分子と古典的経路・非古典的経路の対応が、1対1対応にはなっていないことである。Wnt 非古典的経路を刺激するリガンドとしては、Wnt ファミリーのうち、Wnt-5a や Wnt-11 が代表的なものと考えられている。ところが Wnt-5a は、ある特定の細胞においては、古典的経路を活性化する分子の転写を促進させたり、場合によっては、古典的経路を直接活性化していることもある。すなわち、1つの細胞に数種類の Wnt と数種類の受容体の組み合わせができた場合、古典的経路も非古典的経路も同時に動いてしまう可能性がある。したがって、個々の Wnt がどのような機能を有するかは細胞系譜ごとに、あるいは同じ細胞によっても、どのような細胞外環境でリガンドを受け取るかによって変化する可能性があると考えられる。この点は、今後更なる解析が必要になると考えられる。

## おわりに

幹細胞の自己複製能と多分化能は、周囲のさまざまなシグナルによって制御されている。本稿では Wnt シグナルという1つのファミリーを取り上げたが、このファミリー内でもさまざまな分子が動いており、さらにはほかのシグナルファミリーの影響も加わるため、生体内での実際の幹細胞維持は非常に複雑なメカニズム(細胞外環境)のもとになされている、とする意見が多い。そして複雑であるがゆえに、哺乳類細胞で、1個の幹細胞からの自己複製を試験管内で完全に再現することは非常にむずかしい。一方で、あまりに複雑なメカニズムは故障も起こしやすいので、じつは意外に、われわれの知らない何らかの機構を利用して、アクセルとブレーキ程度の「簡単な」メカニズムで維持されているのかもしれない。幹細胞維持機構の更なる解明が期待されている。



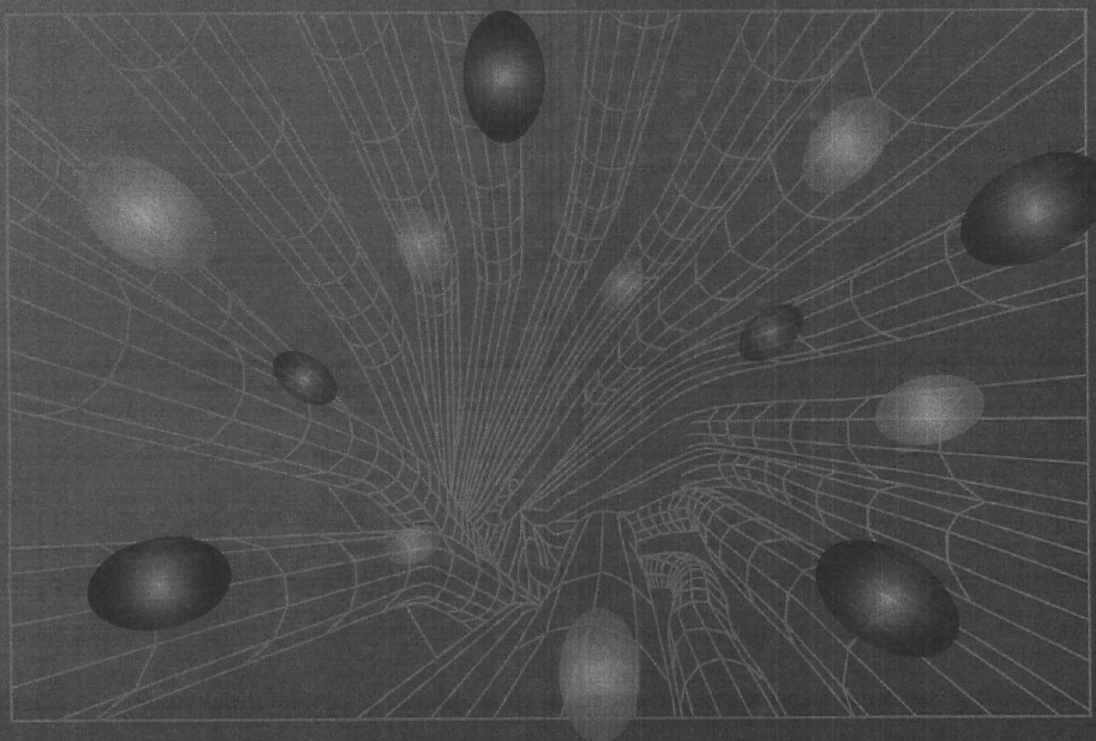
## 文献

- 1) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M *et al* : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131** : 861-872, 2007
- 2) Osawa M, Hanada K, Hamada H *et al* : Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273** : 242-245, 1996
- 3) Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S *et al* : Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J* **25** : 3515-3523, 2006
- 4) Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X *et al* : *In vivo* proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** : 3120-3125, 1999
- 5) Bonnet D, Dick JE : Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3** : 730-737, 1997
- 6) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF *et al* : Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414** : 105-111, 2001
- 7) McMahon AP, Bradley A : The *Wnt-1* (*int-1*) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* **62** : 1073-1085, 1990
- 8) Takada S, Stark KL, Shea MJ *et al* : Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev* **8** : 174-189, 1994
- 9) Haegel H, Larue L, Ohsugi M *et al* : Lack of  $\beta$ -catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* **121** : 3529-3537, 1995
- 10) Korinek V, Barker N, Moerer P *et al* : Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19** : 379-383, 1998
- 11) Tan X, Yuan Y, Zeng G *et al* :  $\beta$ -catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. *Hepatology* **47** : 1667-1679, 2008
- 12) Sekine S, Gutiérrez PJ, Lan BY *et al* : Liver-specific loss of  $\beta$ -catenin results in delayed hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. *Hepatology* **45** : 361-368, 2007
- 13) Chiba T, Zheng YW, Kita K *et al* : Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* **133** : 937-950, 2007
- 14) McDonald SL, Silver A : The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *Br J Cancer* **101** : 209-214, 2009
- 15) 柿沼 晴, 中内啓光 : がん幹細胞—新規治療開発への展望. 別冊「医学のあゆみ」消化器疾患 state of arts I. 消化管(食道・胃・腸) ver. 3 : 125-128, 2006

# 分子標的薬 その作用機序と効果予測

山梨県立病院機構理事長

小俣政男



アークメディア

## 肝細胞および肝幹・前駆細胞移植における donor 由来 Matrix Metalloproteinase (MMP) の関与

柿沼 晴<sup>\*,\*\*</sup> 紙谷 聡英<sup>\*\*\*</sup> 坂本 直哉<sup>\*,\*\*</sup>  
佐藤 千史<sup>\*\*\*\*</sup> 中内 啓光<sup>\*\*</sup> 渡辺 守<sup>\*</sup>

### 1 背景

ヒト iPS 細胞樹立の成功<sup>1)</sup>により、自己由来細胞から誘導した肝細胞を治療に使える可能性が広がっている。しかしながら誘導が可能になったとして、得られた肝細胞をどのような方法で利用するのか、さまざまな検討がなされつつも最適な手段は決まっていない。肝細胞移植に関しては、種々の基礎研究・臨床研究の結果から、recipient に何の前処理もなく単に細胞を移入するのみで高い donor chimerism 形成と治療効果を得ることは困難であると考えられている。加えて近年、初代肝細胞に比べて、より未分化な肝前駆細胞は移植した際に donor 細胞による肝臓置換率が悪いこと、さらに興味深いことに ES 細胞から誘導した肝細胞に至っては移植そのものが非常に困難で、生着細胞がほとんど検出できないことが報告された<sup>2)</sup>。詳細な原因は明らかにされていないが、移植効率が悪ければ利用が難しいことは明らかであり、今後、donor 細胞が生着・増殖して肝臓を再構築する条件、すなわち細胞移植のメカニズムを解明し、その知見をもとに移植効率の向上を図る必要があるものと考えられる。

これまでに、ラット肝細胞移植に於いて類洞内皮細胞を傷害する cyclophosphamide や monocrotaline を投与すると donor 細胞の生着効率が高くなる<sup>3,4)</sup>こと、移植前にコラーゲンやフィブロン

クチンのポリマーを門脈内に投与すると肝細胞生着効率が高くなる<sup>5)</sup>ことが報告されてきた。しかし、移植系にラットを用いていることもあり、詳細なメカニズム解析がなされていない。しかもこの移植系では同系ラットの DPPIV の有無によって donor と recipient を区別しているが、動物を犠牲せしめないと donor による置換率がわからない。1 個体あたりの置換率を正確に、かつ客観的に把握するためには、組織標本を少なくとも 20 枚、置換率が低い場合は 100 枚以上染色して評価する必要がある。これでは多大な労力がかかり、また評価が難しくなるのが問題点といえる。マウスにおいては、肝細胞を移植して成体肝臓を再構成させる実験モデルとして、肝障害をおこす遺伝子改変マウス (FAH 欠損マウス<sup>6)</sup>、または ALB-uPA-Tg マウス<sup>7)</sup>などを recipient に使う系が主流であり、再構成の機構は recipient の遺伝子改変に基づく肝障害レベルに強く依存している。

このような背景から、われわれは細胞移植による肝臓再構築メカニズム解析をするためには、遺伝子改変動物が利用できるマウス由来の細胞をドナーとして移植できる、マウスを recipient とする移植系で、生きたままある程度定量的に置換率がモニタリングできること、そして生着のみならず肝細胞として機能していることがわかる移植系である必要があると考えた。肝細胞として機能していることを示すという点については、疾患モデルマウスを recipient に用いて治療効果があることをもって機能を示せれば、さらに望ましいと考えられた。そこでわれわれは、成熟肝細胞および肝幹・前駆細胞を安定して移植することができ、

\*東京医科歯科大学消化器内科

\*\*東京医科歯科大学大学院分子肝炎制御学

\*\*\*東京大学医科学研究所幹細胞治療部門

\*\*\*\*東京医科歯科大学大学院健康情報分析学

血中コレステロール値  
(mg/dl)

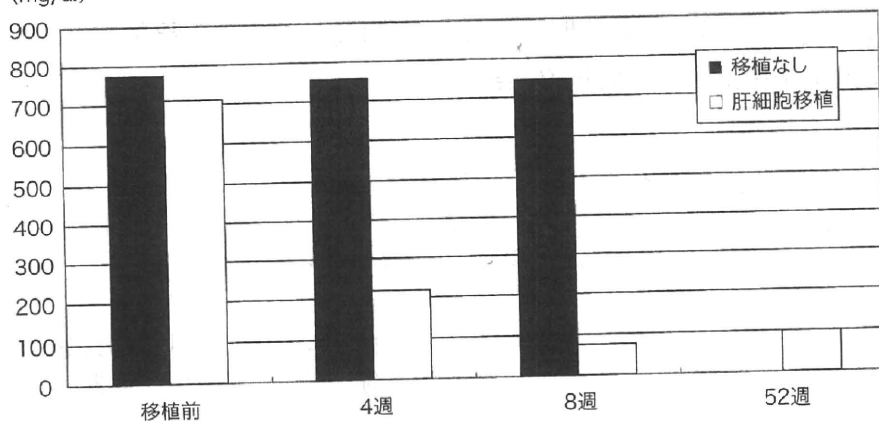


図1 移植後のApoE欠損recipientマウスの血中コレステロール値  
黒は移植無し(Sham群), 白は肝細胞移植群の平均値を示している. 移植後52週ではSham群の生存マウスが少数のため移植群のみを示している

その効果を生きのままモニタリングできるマウス移植系を構築したうえで, 移植したdonor細胞が, 肝臓を再構築してゆく際に重要な因子が何かを解析することを目的に本研究を開始した.

## 2 方法

これらの背景に基づき, われわれはApolipoprotein E (ApoE) 欠損マウス<sup>8)</sup>をrecipientとして選択した. 前処理としてrecipientにレトロウイルスの反復投与と70%部分肝切除を行った<sup>9)</sup>. マーカーとなるGFPもしくはLacZのトランスジェニックマウスから初代肝細胞をコラゲナーゼ還流と比重遠心法によって調整し,  $1 \times 10^6$ 個のdonor細胞を脾臓から移植した. 移植後の血清コレステロール値をモニタリングしつつ, さまざまな時点で犠死せしめ, donor細胞による肝細胞置換率を顕微鏡下で評価した. また, 組織構築に関しては免疫染色によって評価した.

次に, GFPトランスジェニックマウスの胎生中期肝臓から分離したDlk-1陽性肝幹・前駆細胞<sup>10)</sup>をdonorとして同様の移植系で移植し, 血清コレステロール値を評価した. 移植後24週に一部を犠死せしめ, donor細胞による肝細胞置換率を実体顕微鏡下, およびGFPに対する免疫染色で評価した. また, 組織構築についても免疫染色によ

って評価した.

さらに, 肝臓の再構築に際してMatrix Metalloproteinase (MMP)がいかなる影響を有するかをMMP2欠損マウス<sup>11)</sup>もしくはMMP14欠損マウス<sup>12)</sup>に由来する細胞をdonorとして用いて評価した. 最後に, Tet-inducible lentiviral vectorによってMMP2およびMMP14を強制発現した肝幹・前駆細胞を, レトロウイルスの反復投与と70%部分肝切除を行ったヌードマウスに移植した. Doxycyclineを含有する蔗糖溶液をrecipientに飲水させて移植2週目に犠死せしめ, GFPに対する免疫染色によって, recipient肝臓中のdonor細胞陽性率を検討した.

## 3 結果

### 1. ApoE欠損マウスに対する肝細胞移植

通常マウスの生体内で, ApoE蛋白は90%を肝細胞が, 残り10%はマクロファージが産生している. ApoE欠損マウスでは, 肝臓におけるLDL-receptorを介した脂質取り込みに異常をきたし, その結果, 著明な高コレステロール血症(通常の食餌で血中総コレステロール値は600~900 mg/dlまで上昇する)を呈し, 動脈硬化性病変を発症する. このマウスは骨髄移植によって野生型マクロファージを生着させ, ApoE蛋白を産生させる

と、高コレステロール血症を治療できることが既に報告されている<sup>13)</sup>。したがって、ApoE欠損マウスをrecipientに、野生型肝細胞をdonorにして移植することで、donor由来血中ApoE蛋白が増え、コレステロール値が改善することでdonor chimerism形成率を推定でき、その治療効果から肝細胞の機能があることが示せる。さらにdonor細胞にマーカーがなくても、コレステロールの治療効果によって置換率が推定でき、機能からみたdonor chimerism形成能もわかると考えた。

そこでまず、移植効率の安定している成熟肝細胞を用いて移植系の有効性を検討した。野生型初代肝細胞を移植後、4週毎に採血して血清コレステロールの経過を観察した。移植群では、移植後4週からコレステロールが200 mg/dl程度まで低下し、移植後8週には正常値まで低下した。その後は正常値を維持し、移植後52週までコレステロールは上昇しないことを確認した。一方で、レトロールシン投与のみ、またはsham移植のみ(レトロールシン投与および肝切除をして細胞移植をしなかった)の双方の群では血中コレステロール値の低下は全く見られなかった(図1)。

コレステロール値の観察と並行して、recipient肝臓の状態を蛍光顕微鏡下で確認した。移植後1週では、コレステロール値は下がっていないが、残肝全体にdonor細胞が散布されていた。移植後4週になるとGFP陽性のdonor体積は1週目に比べて相対的に増えていた。移植後8週になると、donor細胞のコロニーは1つ1つが拡大し、sham移植マウスに比べて、肝臓全体の体積も回復していた。移植後24週には、置換率はさらに上がり50%以上になっていた。組織像を確認すると、GFP陽性donor細胞によって肝細胞は大規模に置換され、免疫染色でみたアルブミン発現レベルもrecipientの残存肝細胞と比較して差は認めなかった。また、小葉構築も正常肝臓と比較して特に差を認めなかった。移植後52週では、24週目と大差ないものもあったが、マウスによっては95%以上のdonor chimerism形成がみられたものもあった。

移植後2週目以降の肝臓の顕微鏡像から顕微鏡

的なdonor chimerismを算出し、犠死時のコレステロールの低下率すなわち機能的なdonor chimerismを算出して、相関関係を検討した。顕微鏡的donor chimerismが15%程度までは、コレステロールの低下率と顕微鏡的donor chimerismの間に直線的な相関(相関係数 $R^2=0.95$ )が認められた。顕微鏡的donor chimerismが30%程度まであがると、治療効果がプラトー(正常値)となっており、置換率30%以上では相関性がないことがわかった。

以上の結果から、初代肝細胞の移植によって、ApoE欠損マウスの高脂血症を治療できることが示された。また、治療効果はdonor chimerism形成効果と正に相関していることが示された。

## 2. ApoE欠損マウスに対する初代肝幹・前駆細胞移植

次に、肝幹・前駆細胞を用いた移植を検討した。GFPトランスジェニックマウスの胎生中期肝臓から分離したDlk-1陽性肝幹・前駆細胞をdonorとして、同様の移植系でApoE欠損マウスに移植し、血清コレステロール値を評価した。

移植後4週の血清コレステロール値は、マウス間の個体差が大きく、200 mg/dl程度から600 mg/dl以上とさまざまであった。移植後8週では、コレステロール正常化効果が安定し、80 mg/dlから250 mg/dl程度となった。移植後20週までに、コレステロール値の正常化が得られたが、成熟肝細胞移植と比較して正常化が遅延する傾向を認めた。一旦正常値に達した後は、初代肝細胞と同様に移植後52週まで正常値で持続した。

移植後24週で一部のマウスを犠死せしめ、肝臓の状態を評価した。肝細胞はdonor細胞によって50%程度を置換されていた。肝臓の小葉構造は、初代肝細胞と同様に正常であり、アルブミン発現レベルもrecipient由来成熟肝細胞との間に差はみられなかった。またわれわれの検討した範囲では、GFP陽性細胞は肝臓内で肝細胞としてのみ検出され、GFP陽性胆管は検出されなかった。

以上の結果から、初代肝幹・前駆細胞の移植によっても、ApoE欠損マウスの高脂血症を治療で

きることが示された。

### 3. 細胞移植メカニズムにおけるMMPの関与

Azumaらは、FAH欠損マウスに対するヒト肝細胞移植系を構築した研究の中で<sup>14)</sup>、FAHという酵素欠損による肝障害と同時に、recipient肝細胞にurokinase type plasminogen activator (uPA)を過剰発現させる手法をとっている。しかし通常、肝細胞におけるFAH欠損のみでも十分に細胞移植が成立する<sup>15)</sup>。つまり、この研究においてはFAHのみでは不十分で、uPA過剰発現をも使用せねば移植が困難だった。肝細胞移植にuPA過剰発現が有利に働く機構を考えたとき、uPAの様々な生理活性の1つとしてMMPの活性化が関係するのではないかという仮説を立て、これを検証することにした。

MMPは22種類のファミリー分子が知られているが、肝臓に発現する代表的なMMPの中から、MMP2とMMP14を選択した。MMP14は膜型MMPとして分泌型のMMP2活性化に関与することが既に報告されている<sup>16)</sup>。そしてこれらのMMPは、胎生期の肝幹・前駆細胞、成体肝細胞の双方に発現しているが、RT-PCRで確認すると、移植効率の高い成体肝細胞に比較して、移植効率の悪い肝幹・前駆細胞では発現レベルは低く止まっていた。

まず、MMP2の関与を明らかにするため、MMP2欠損マウスをdonorに用いて、前述の移植系で比較検討することにした。MMP2欠損マウスは定常状態では軽度の骨形成異常がある<sup>17)</sup>ものの、肝臓発生あるいは肝代謝機能に異常があるという報告はない。MMP2欠損マウス、および同腹のMMP2野生型マウスより初代肝細胞を採取してdonorとし、ApoE欠損マウスをrecipientとして移植し、移植後にコレステロールの低下率を検討した。

移植後4週のコレステロール低下率は、MMP2欠損donor群では、MMP2野生型donor群に比較して悪く、移植によってコレステロールが下がらないことが統計学的有意差をもって示された( $p=0.012$ )。すなわち、MMP2欠損マウス由来肝細胞は機能的なdonor chimerism形成能が低いこ

とが示された。

次にMMP14の関与を明らかにするため、MMP14欠損マウスをdonorに用いた。MMP14欠損マウスは骨・軟骨の形成不全によって生後1~2週間で死亡してしまう<sup>12)</sup>ため、胎生中期MMP14欠損マウス胎仔由来、および同腹のMMP14野生型マウス胎仔由来の肝臓からDlk-1肝幹・前駆細胞を分取してdonorとし、ApoE欠損マウスをrecipientとして移植し、評価した。

前述の通り、Dlk-1陽性肝幹・前駆細胞の移植では移植後4週の治療効果が不安定であるため、移植後8週のコレステロールの低下率を検討した。その結果、MMP14欠損donor群では、MMP14野生型donor群に比較して、移植によってコレステロールが下がらないことが統計学的有意差をもって示された( $p=0.016$ )。この結果から、MMP2同様に、MMP14欠損マウス由来の肝細胞は機能的なdonor chimerism形成能が低いことが示された。

これらの結果を逆側から検証するために、Tet-inducible lentiviral vectorによってMMP2とMMP14の双方を強制発現した胎生中期の肝幹・前駆細胞を、ヌードマウスをrecipientとして移植し、その効果をみた。胎生14.5日目の野生型C57Bl6マウスからDlk-1陽性肝幹・前駆細胞を分離し、培養皿上で3日間培養しながら遺伝子導入を行った。移植細胞に対する遺伝子の導入効率はMMP2+MMP14強制発現群、mock vector群双方ともに80%以上であることをFACSで確認した。さらに、コロニーアッセイによる検討により、これらの遺伝子導入によって*in vitro*での増殖性はMMP2+MMP14強制発現群とmock vector群との間に有意差がないことを確認した。

移植後2週でマウスを犠牲せしめ、その肝臓を解析した。免疫組織染色標本によって、マウス個体毎にランダムに撮影した写真から20,000個以上の肝細胞を数え、GFP陽性肝細胞数を計数したところ、MMP過剰発現群の方が統計学的有意にdonor chimerism形成能が高いことが示された。

これらの結果から、肝臓への細胞移植において、donor細胞でのMMP発現はdonor chimerism形

成能を正に調節していることが示された。

#### 4 考察

本研究で、肝細胞および肝幹・前駆細胞を用いた細胞移植において、donor細胞自身がMMPを発現することが、移植後のdonor chimerism形成を上昇させることが示された。

われわれは、野生型マウスの初代肝細胞を野生型マウスに移植しても十分なdonor chimerismが得られる条件を以前に確立していた<sup>9)</sup>。ApoE欠損マウスは著明な高脂血症を呈するヒトⅢ型高リポ蛋白血症の疾患モデルマウスである<sup>8)</sup>。これに野生型肝細胞を移植し、肝内で生着・増殖することで、donor由来ApoE蛋白によって高脂血症が治療され、機能的なdonor chimerismをモニタリングしつつその効果を検定できる新規移植系を構築しえた。さらに、donor細胞を肝幹・前駆細胞として移植を検討したところ、成熟肝細胞と同様に、移植細胞によるdonor chimerism形成によって、治療効果が得られることがわかった。今までにApoE欠損マウスを肝細胞移植によって治療した報告はない。さらに、FAHやuPAのような肝障害を惹起する遺伝子改変を伴わない細胞移植系で、肝幹・前駆細胞の移植によって遺伝子欠損マウスの疾患を治療しえたのは本研究が初めてである。

さらに本研究ではdonor細胞に特定の遺伝子を欠損・あるいは強制発現した細胞を用いて検証することで、donor chimerism形成のメカニズムに迫った。その結果、MMPが重要な因子であることが判明したが、このようなdonorからの視点での研究はいままでになく、肝細胞の再構成機構に関わる特定分子の機能を直接的に検定しえたといえる。

MMPについては過去にMMP9、MMP13について骨髓細胞移植でdonor chimerism形成に関与していることが報告されている<sup>17~19)</sup>が、初代肝細胞もしくは初代肝幹・前駆細胞といった、生体肝臓に由来する比較的均一な細胞集団で、生着後の多能性や非実質細胞の影響などの条件に依存しないものを用いての研究はなかった。本研究はこ

のような中で、肝細胞または肝幹・前駆細胞の移植においてMMP2とMMP14がdonor chimerism形成を正に制御していることを明らかにした。今後、MMPがどのようなメカニズムでdonor chimerism形成に働くのかを解明してゆきたい。

#### 文献

- 1) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 : 861-872, 2007
- 2) Haridass D, Yuan Q, Becker PD et al : Repopulation efficiencies of adult hepatocytes, fetal liver progenitor cells, and embryonic stem cell-derived hepatic cells in albumin-promoter-enhancer urokinase-type plasminogen activator mice. *Am J Pathol* 175 : 1483-1492, 2009
- 3) Malhi H, Annamaneni P, Slehria S et al : Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver. *Hepatology* 36 : 112-121, 2002
- 4) Joseph B, Kumaran V, Berishvili E et al : Monocrotaline promotes transplanted cell engraftment and advances liver repopulation in rats via liver conditioning. *Hepatology* 44 : 1411-1420, 2006
- 5) Kumaran V, Joseph B, Benten D et al : Integrin and extracellular matrix interactions regulate engraftment of transplanted hepatocytes in the rat liver. *Gastroenterology* 129 : 1643-1653, 2005
- 6) Grompe M, al-Dhalimy M, Finegold M et al : Loss of fumarylacetoacetate hydrolase is responsible for the neonatal hepatic dysfunction phenotype of lethal albino mice. *Genes Dev* 7 : 2298-2307, 1993
- 7) Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL et al : Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell* 62 : 447-456, 1990
- 8) Plump AS, Smith JD, Hayek T et al : Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71 : 343-353, 1992
- 9) Kakinuma S, Ohta H, Kamiya A et al : Analyses of cell surface molecules on hepatic stem/progenitor cells in mouse fetal liver. *J Hepatol* 51 : 127-138, 2009
- 10) Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H et al : Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 116 : 1775-1786, 2003
- 11) Itoh T, Ikeda T, Gomi H et al : Unaltered secretion

- of beta-amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) -deficient mice. *J Biol Chem* 272 : 22389–22392, 1997
- 12) Holmbeck K, Bianco P, Caterina J et al : MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99 : 81–92, 1999
  - 13) Boisvert WA, Spangenberg J, Curtiss LK : Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 96 : 1118–1124, 1995
  - 14) Azuma H, Paulk N, Ranade A et al : Robust expansion of human hepatocytes in *Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup>* mice. *Nat Biotechnol* 25 : 903–910, 2007
  - 15) Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R et al : Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 12 : 266–273, 1996
  - 16) Sato H, Takino T, Okada Y et al : A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370 : 61–65, 1994
  - 17) Kollet O, Shvrtiel S, Chen YQ et al : HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34<sup>+</sup> stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 112 : 160–169, 2003
  - 18) Sakaida I, Terai S, Yamamoto N et al : Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 40 : 1304–1311, 2004
  - 19) Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY et al : Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 45 : 213–222, 2007

\* \* \*

## 討論

【正木（座長）】詳細なデータありがとうございます。ご質問どうぞ。

【汐田（鳥取大学・遺伝子医療学部門）】機能的キメリズムをみる方法を開発されて非常に興味深く拝聴させていただきました。二つ質問したいのですが、第一は肝臓の幹細胞のマーカーは何が使われていますか。

【演者】今回はDLKを使っています。

【汐田】DLK陽性細胞ですね。今回はMMP2と、MMP14ですね。MMP9が細胞遊走とかに関係している。いろいろなサイトカインの作用機序にMMP9が下流にあるということが報告されています。MMP9での検討はされていますか。

【演者】今回はMMP2と、MMP14の二つに限定して調べておりますが、先生方のご報告にもありますように他の細胞種では少なくとも遊走能ですとか、ケモカインのクリベージといったところにMMP9が有意に働いているということが知られていますので、今後検討したいとは考えております。今回の中ではMMP9は検討していません。

【大西（秋田大学・消化器内科）】非常にクリアカットなデータありがとうございます。先生はわざわざMT1-MMPと、MMP2を選ばれたわけですが、MT1-MMPが膜上であって、MMP2をクリベージしてactivateするという過程はいいと思います。この系においてはTIMPはどうなっていますか。これだけの変化を与えられてApoEがなくて、いろいろなドナー、MMP2がないドナー、MT1-MMPがないドナーからとられた細胞ですね。そのときにTIMPの1、2はどうなっているか調べましたか。

【演者】ApoE欠損マウスにおけるTIMPの活性については調べたことはないですし、そういう報告もおそらくないと思います。それは検討してみる必要があると思いますが、基本的にはApoE欠損ということに関していえば、それをツールとして用いるというところに今回は主眼をおいています。

【大西】MMP2と、MT1-MMPの細胞におけるTIMPはどうでしたか。そこがクリティカルかと思いましたが。

【演者】そこは正確な記憶がないのですが、MMP2

ノックアウトマウスに関してはredundancyが効いているようでほとんど表現型もでませんので、TIMPは正常である可能性が高いと思います。あまり詳しい解析はなかったと思います。

【大西】発現量も調べていませんか。

【演者】調べていません。

【大西】MT1-MMPもですか。

【演者】MT1-MMPについてはノックアウトマウスで報告があったかもしれませんが。

【大西】一度そこを調べて頂いて、わかりましたらまた教えてください。

【演者】はい。ありがとうございます。

【大塚（東京大学・消化器内科）】先生が使われたMMP2と14のoverexpressionと、論文で先ほど紹介されたuPAとどちらが効率がいいか。同じくらいなのか教えてください。

【演者】それは条件が違うので比較が難しいと思います。今回はドナー細胞の方で欠損させたということです。過去の論文ではレシビエント側にuPAを過剰発現させたことで移植の効率が変わる、変わらないということを検討しています。基本的にはuPAはレシビエント側にtransgeneとして入れるとhepatocyteが死んでいく作用があることが知られています。ですがhepatocyteを殺すという作用に、プラスアルファがあるのではないか。プラスアルファの部分にMMPが効いているのではないかという考え方で、今回はレシビエント側ではなく、ドナーの面から解析しています。

【稲垣（東海大学・公衆衛生学）】1年ぐらい経ってLacZで置きかわっているのがありましたけど、どうしてそういうグロースアドバンテージがあるのですか。

【演者】そこについてはレトロシンという薬剤の効果自体がよくわかっていないところがあります。詳細なメカニズムはわかりません。

【稲垣】再生が起こる1~2週間の話ならわかりますが、その後もずっとexpansionしていくというのが理解できなかったのですが。

【演者】みていますとレトロシンを投与して、その後肝切除を行ったマウスでは移植をせずに放置しておくで8~12週ぐらいで死んでくるマウスが非常に多いです。先ほどのコレステロールのグラフも途中で途切れていましたが、内在性のhepatocyteの増殖を阻

害することは間違いないです。もしかしたら、ある一定の条件が揃えば、タネとなるべきstem cell、あるいはprogenitor cellの増殖まで阻害されているために内在性の細胞が尽きてしまうのではないかと考えています。

【稲垣】その作用が1年も続くわけですか。

【演者】われわれがみている系では1年以上にわたって続いていると思っています。

【稲垣】入れたほうの細胞はmatureなhepatocyteになっても影響は受けないということですね。

【演者】そうですね。レシピエント側はよくわからなくなっていますが、自然に脱落していなくなっている状態です。

【稲垣】ドナー側はどうですか。

【演者】ドナー側は全くその影響は受けていません。

【稲垣】先程来ていますが、なぜMMP2とMMP14なのかということと、最後に先生が示されたメカニズムのところ面白いと思います。コメントですが、代謝疾患であれば別ですが実際の肝硬変のモデルになると相方はTypeIV collagenとかではなく、I型とか線維性のcollagenになるので、MMP2と

MMP14というのはそういう意味で使いづらいと思います。

【演者】また検討してみたいと思います。

【山下（金沢大学・消化器内科）】DLK1陽性のstem progenitor cellと、陰性のhepatocyteを移植した場合、hepatocyteの方がより生着しやすいということですか。

【演者】DLK1陽性のprogenitor cellは、adultからはとれないので、fetusのstem/progenitor cellとadultのhepatocyteとの比較です。

【山下】MMP2とMMP14というのはadultのhepatocyteで高くでているということですか。

【演者】おそらく他の細胞でもたくさん発現していると思います。しかしadultのhepatocyteと、DLK1 positiveの胎児肝細胞だけを比較すると、adultのhepatocyteの方が発現レベルが高いという結果でした。

【正木】これはMMP2と、MMP14で同時強発現させた系はやられていますか。

【演者】今回の系はMMP2と、MMP4を同時に発現させています。

【正木】先生、ありがとうございました。

\* \* \*

分子消化器病学研究会  
第17回 浜名湖シンポジウム記録集

分子標的薬 その作用機序と効果予測

定価:4,935円(本体4,700円+税)

---

2010年 10月8日発行(初版1刷)

小 俣 政 男

発行所 株式会社 アークメディア

〒102-0075東京都千代田区三番町7-1

電 話 (03)5210-0821(代表)

ファクシミリ (03)5210-0824

振 替 00160-5-129545

〈検印省略〉

---

Printed in Japan

ISBN 978-4-87583-141-9 C3047

本書内容を無断で複写・複製・転載すると著作権・出版権の侵害となります。  
あらかじめ小社あて許諾をもちめてください。  
落丁・乱丁などの不良品の場合は、お取り替えいたします。

#### IV 坂本 穰

山梨大学医学部附属病院 肝疾患センター（第1内科）

ウイルス変異と宿主因子から見たC型慢性肝炎に対するPEG-IFN+RBV療法の  
治療効果予測と個別化医療の検討

研究分担者 坂本 穰 山梨大学医学部附属病院肝疾患センター センター長・准教授

研究要旨：C型慢性肝炎に対するPEG-IFN+Ribavirin（RBV）併用療法の治療効果は、ウイルス因子である genotype と、宿主因子である肝線維化と IL28B SNP が規定しており最も強い因子は genotype であった。また、最も難治の1b型に限ると、治療効果規定因子は、宿主因子である年齢と IL28B SNP と、ウイルス因子である IRRDR 変異数であり、これらが独立に関与していることが明らかになった。すなわちウイルス側因子が同一でも宿主因子によって治療効果は異なり、これら両者を考慮することが重要であることが示唆された。したがって肝臓専門医は、宿主とウイルスの遺伝子情報を含めた因子を解析し、これらの検査成績を、データマイニング手法を用いた個別化治療アルゴリズムに投入することにより、高精度の治療効果予測を可能としうると考えられた。

共同研究者

山梨大学大学院医学工学総合研究部  
肝疾患地域先端医療システム学 前川伸哉  
内科学講座第1教室 榎本信幸

積することを目的に、近年明らかになった宿主IL28BのSNPs（rs8099917）とウイルス側の遺伝子変異から治療効果との関連を検討し、個別化医療の可能性を検討した。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の治療効果は、C型肝炎ウイルス

（HCV）の遺伝子変異と宿主側の因子に密接に関連している。とくに難治の1b型かつ高ウイルス量症例においては、標準かつ最強のPEG-IFN+Ribavirin（RBV）併用療法の48週間の治療成績は50%に満たず、治療効果予測は、効率的かつ安全な治療の推進に必要な不可欠である。そこで、データマイニング手法を用いた個別化に資する情報を集

B. 研究方法

2004年12月から山梨大学第1内科と関連施設で組織するY-PERS（Yamanashi PEG-interferon+Ribavirin Study）で集積された1b高ウイルス量症例のうちPEG-IFN $\alpha$ 2b（ペグイントロン）+Ribavirin（レベトール：RBV）併用療法を行った946例のうち、治療効果が判明している612例を検討対象とした。これらにつき、年齢、性別、BMI、肝組織（F・A因子）および投与前のAlb、 $\gamma$ GTP、AST、ALT、T.Chol、血糖、HbA1c、白血球

数、好中球数、Hb、血小板数、AFPの臨床検査値およびHCVRNA量（Amplificorハイレンジ法およびreal-time PCR法）、ISDR

（Interferon sensitivity determining region）変異数、IRRDR（Interferon-ribavirin resistance determining region）変異数、コア70番および91番アミノ酸変異を検討した。また、一部の症例については宿主因子であるIL28BのSNPs（rs8099917）と、リバビリンに関する貧血に関与する遺伝子ITPA（rs1127354）のSNPについても検討した。

（倫理面の配慮）

臨床試験の目的・方法・副作用、患者に関する個人情報守秘義務、患者の権利・保護等に関し、十分に説明し、文書で同意を取得し研究をおこなった。なお、これらの研究の実施計画については、山梨大学医学部倫理委員会の承認を得た。とくに、

### C. 研究結果

1) 症例の内訳は、平均年齢 $55.2 \pm 10.3$ 歳、男/女=527（56%）/419、HCV genotypeは1b/2a/2b/その他=637（67%）/166/116/27であった。IL28B SNPの分布はTT/TG+GG=229（78%）/63であった。

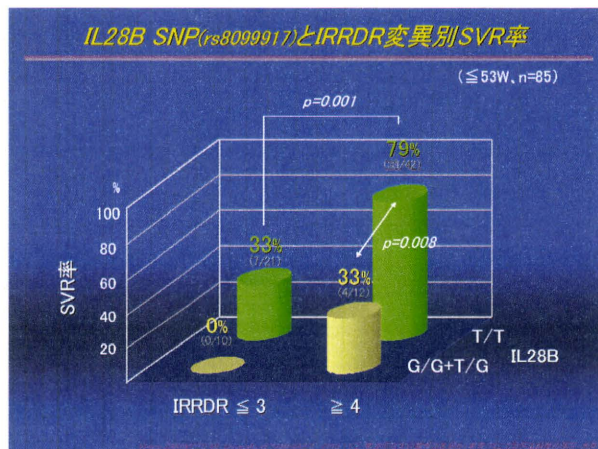
2) PEG-IFN  $\alpha$  2b+RBV療法の治療成績

（Sustained viral response: SVR率）は、ITT解析で1b型50%（212/423）、2a型88%（102/116）、2b型80%（61/76）であった。そこでSVRに関与する因子につき単変量解析を行い、5%以下の危険率で有意と認められた項目について、多変量ロジスティック回帰分析を行うと、有意な因子は、F因子（ $F < 1$ ）（odds比3.89、 $p < 0.0001$ ）、IL28B TT、（odds比3.15、 $p = 0.0008$ ）、HCV geotype

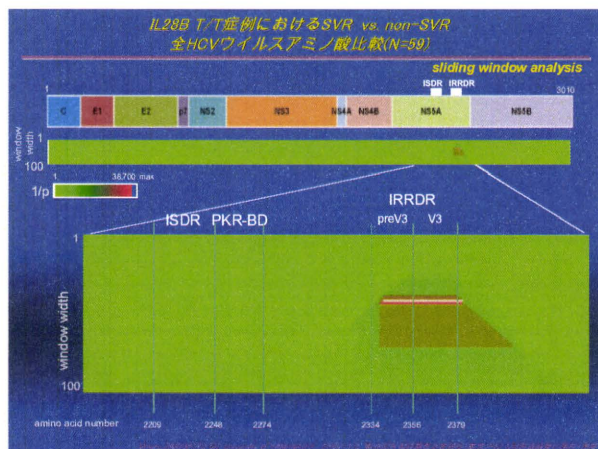
2a+2b（odds比7.242、 $p = 0.0001$ ）であり、全症例の解析では治療効果を決定する最も強力な因子はウイルス因子であるgenotypeであった。そこでgenotype別に、IL28B、肝線維化を検討したところ、1b型では、IL28Bは有意な因子（ $p = 0.01$ ）であったが2a/2bでは有意ではなく、肝線維化は線維化の進行とともにSVR率が低下する傾向があったがいずれのgenotypeでも有意な因子ではなかった。

3) 最も難治である1b型症例に限り、このgenotypeで、治療効果と関係する因子として知られているISDR、IRRDR、コア70番および91番のアミノ酸変異につき検討した。この結果は、ISDR変異数2個以上では1個以下に比較して有意にSVR率が高く（82%対41%、 $p = 3.5 \times 10^{-8}$ ）、IRRDR変異数4個以上では3個以下に比較して有意にSVR率が高かった（70%対24%、 $p = 6.0 \times 10^{-6}$ ）。この情報をもとに多変量解析を行うと、有意な因子は60歳未満（odds比11.2、 $p = 0.002$ ）、IRRDR変異数4個以上（odds比20.0、 $p = 0.0005$ ）、IL28B TT（odds比14.0、 $p = 0.0014$ ）であり、1b型に限ると宿主因子とウイルス因子がそれぞれ独立して治療効果を規定していることが明らかになった。そこで、それぞれIL28B、IRRDR変異数別に治療効果を検討すると、IL28B TT（major type）の場合、IRRDR変異数4個以上では79%のSVR率であったが、IRRDR変異数3個以下では33%であり（ $p = 0.001$ ）、IL28B TGまたはGGかつIRRDR変異数4個以上では33%のSVR率であったが、3個以下の症例では1例もSVRにはならなかった。また、IRRDR変異数4個以上と比較すると、IL28B TTとTGまたはGGではSR

率に統計学的に有意な差が見られ  
( $p=0.008$ ) (図1)、宿主因子・ウイルス  
因子により大きくSVR率が異なっていた。



さらに、他のウイルス変異が治療効果と関連するか検討するためにsliding window analysisによる検討をおこなった。すなわちIL28B TTの症例に限り、SVRと非SVR例でのアミノ酸の相違を検討したところ、両者の相違はIRRDR領域に集積していることが明らかになった (図2)。



#### D. 考察

1) C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の治療効果はHCVのウイルス遺伝子変異と宿主因子がそれぞれ独立に規定していることが明らかになった。とくに宿主IL28BのSNPs (rs8099917) は重要でIFN反応性

を先天的に規定しているがHCV genotypeに勝る因子ではなかった。したがってC型慢性肝炎の治療方針を決定する上ではgenotypeを測定する必要がある。

2) ただし、1b型に限るとISDRやIRRDRなどのウイルス因子とIL28BのSNPがそれぞれ独立に治療効果を規定しており、治療開始前にこれらを測定することが重要と考えられた。とくにIRRDRの変異数が3個以下であり、IL28BがTGもしくはGGであれば現行のPEG-IFN+RBVの48週治療では根治は見込めず、近々使用可能となるHCV NS3 protease阻害剤を含めた新規治療法を検討する必要があることが示された。このように、ウイルス要因と宿主要因の検討により、現行治療法で治癒可能な症例と難治例とを選別することが可能となり、治療法の工夫など個別化医療への道が開けると考えられた。

3) さらに、薬剤の中止・減量や、Adherenceなどの治療因子と、ウイルス消失時期、ウイルス減少速度などを考慮することでさらに詳細な治療効果予測が可能になり、肝臓専門医は、高度な遺伝子情報を含めた解析により、個別化治療を可能としようと考えられた。

#### E. 結論

C型慢性肝炎に対するPEG-IFN+Ribavirin併用療法において、治療効果予測因子として重要なものはISDRやIRRDRなどのウイルス遺伝子変異とインターフェロン感受性のSNPを含めた宿主因子であることが明らかになった。これらの検査成績を、データマイニング手法を用いた個別化治療アルゴ

リズムに投入することにより、高精度の治療予測と個別化医療が可能になる考えられる。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表

### 1.論文発表

- 1) Kurisaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Izumi N. Sequences in the Interferin Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis. J Med Virol 2010; in press
- 2) Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the Complete Open Reading Frame of Hepatitis C Virus Genotype 2a Infection Reveals Critical Site Influencing the Response to Peginterferon and Ribavirin Therapy. Hepatol Int; in press
- 3) Kurisaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsunami H, Izumi M. Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using data

mining analysis. J Gastroenterol 2010 Sep (On line first)

- 4) 前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. HCV 全アミノ酸解析を用いた PEG-IFN/RBV 併用療法の治療反応性の検討、消化器内科 51(6): 642-651, 2010
- 5) 坂本穰、榎本信幸. 山梨県における肝炎対策、肝胆膵 61(5)、763-771, 2010
- 6) 坂本穰、榎本信幸. HCV ゲノム解析からみた治療方針、最新医学 65(9)、1892-1900, 2010
- 7) 坂本穰、榎本信幸. 肝臓領域における検査法の進歩と臨床応用、日本内科学会雑誌 99: 1959-1964、2010
- 8) 坂本穰、榎本信幸. 遺伝子変異と Adherence からみた peg-IFN+RBV 療法無効例の対策、消化器内科 50(6): 575-580, 2010
- 9) 坂本穰、榎本信幸. 慢性肝炎の治療(C型)、今日の消化器疾患治療指針第3版(幕内雅敏、菅野健太郎、工藤正俊編)、医学書院、東京 585-588, 2010
- 10) 坂本穰、榎本信幸. ウイルス遺伝子から見たC型肝炎治療、Vita 27(2). 32-38, 2010
- 11) 三浦美香、坂本穰、榎本信幸. 最新の検査と臨床 肝炎ウイルスの遺伝子解析ー病態・治療効果との関連ー C型肝炎ウイルス(HCV). Medical Practice 27(1) 65-68. 2010

### 2.学会発表

- 1) 坂本穰、前川伸哉、榎本信幸. ウイルス変異(とくに IRRDR)と宿主ゲノム解析からみたC型慢性肝炎に対する治