

Honda T, Katano Y, Shimizu J, Ishizu Y, Doizaki M, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Efficacy of peginterferon- alfa 2b plus ribavirin in patients aged 65 years and older with chronic hepatitis C. *Liver Int*(30) 527-537, 2010.

2. 学会発表

林和彦、片野義明、後藤秀実: IL28B、C型肝炎ウイルス変異を解析したC型慢性肝炎に対するペグインターフェロン α 2b+リバビリン併用療法の治療効果における鉄調節因子ヘプシジンの役割について 第14回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション7 代謝異常(金属代謝を含む)からみたC型肝炎の病態解析 横浜 2010.10

石上雅敏、片野義明、後藤秀実: HBV-DNA陰性慢性B型肝炎患者における血清HBVコア関連抗原(HBVcrAg)の意味と核酸アナログ長期投与再考の可能性—肝移植後のHBVキャリア患者との比較から 第14回日本肝臓学会大会 パネルディスカッション14 B型肝炎に対する新たな治療戦略 横浜 2010.10

石津洋二、片野義明、石上雅敏、林和彦、舘佳彦、岩田浩史、土居崎正雄、清水潤一、小野幸矢、児玉祐加子、後藤秀実: B型肝炎硬変患者における血清IGFBP-3濃度を用いた栄養状態の評価 第14回日本肝臓学会

大会 横浜 2010.10

小野幸矢、片野義明、中野功、石上雅敏、林和彦、舘佳彦、岩田浩史、土居崎正雄、清水潤一、石津洋二、及部祐加子、藤田芳和、後藤秀実: 透過型電子顕微鏡(TEM)で見た、C型慢性肝炎の関組織内の微量元素から考察した、金属代謝についての検討 第14回日本肝臓学会大会 横浜 2010.10

舘佳彦、片野義明、中野功、石上雅敏、林和彦、本多隆、土居崎正雄、清水潤一、石津洋二、小野幸矢、及部祐加子、後藤秀実、鮫島庸一: C型慢性肝炎に対するPeg-IFN/Ribavirin併用療法の有効性における治療前CD4陽性T細胞数のえいきょうについて 第14回日本肝臓学会大会 横浜 2010.10

清水潤一、片野義明、児玉祐加子、小野幸矢、石津洋二、土居崎正雄、岩田浩史、舘佳彦、林和彦、石上雅敏、後藤秀実: EOBプリモビストMRIによる肝癌診断 第14回日本肝臓学会大会 横浜 2010.10

Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Nakano I, Goto H. Association between a single-nucleotide polymorphism of interleukin 28B and mutations in the core and NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b with response to pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin combination therapy. 61st The American

Association for the Study of Liver
Diseases Boston 2010.11

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

IFN- α と抗 PD-1 抗体を用いた消化器癌に対する免疫療法の検討

研究分担者 広石 和正 昭和大学医学部消化器内科 准教授

研究要旨

消化器癌患者は免疫抑制状態に陥っていることが多く、免疫療法で消化器癌を治療するには、強く抗腫瘍免疫を誘導する必要がある。本研究では IFN- α と抗 PD-1 抗体併用による免疫治療を検討した。IFN- α 遺伝子導入したマウス消化器癌細胞株と抗 PD-1 抗体とを、野生株を皮下接種しあらかじめ皮下腫瘍を形成したマウスに接種したところ、野生株腫瘍に対する抗腫瘍効果が認められた。腫瘍の縮小には CD4 陽性細胞が関与していた。IFN- α と抗 PD-1 抗体との併用により、高い抗腫瘍効果が誘導されることが分かり、これらを用いた免疫治療の臨床への応用が期待された。

A. 研究目的

消化器癌では強い副作用のため集学的治療を十分に行うことができない症例が多く免疫療法にかかる期待は大きい。しかし一般的に消化器癌は低免疫原性であり、担癌患者では免疫機能が低下しているため、強く効果的な抗腫瘍免疫を誘導する必要がある。今回我々は生体において活性化リンパ球を沈静化する負のシグナルの伝達に關与する PD-1 を阻害する事により、従来免疫療法をより効果的にすることが可能であると考えた。本研究では強い抗腫瘍効果を持つ IFN- α 療法に抗 PD-1 療法を併用した免疫療法に対する評価を行うことを目的とする。

B. 研究方法

消化器癌細胞株として、マウス大腸癌細胞株 MC38 を用いた。

In vivo の治療モデルとして、野生株を皮下接種しあらかじめ皮下腫瘍を形成したマウスに、IFN- α を遺伝子導入したマウス消化器癌細胞株 (MC38-IFN α) 3×10^5 cells と抗 PD-1 抗体 (250 μ g/mouse) とを治療目的に投与した後、野生株腫瘍の大きさを測定した。同モデルで野生株腫瘍内に浸潤している免疫細胞を、免疫組織染色で観察した。

(倫理面への配慮)

昭和大学動物実験委員会に動物実験実施申請書を提出し、倫理規定と照合された結果、実験実施の承認を得た。

C. 研究結果

MC38-IFN α と抗 PD-1 抗体を併用して治療することにより、IFN- α や抗 PD-1 抗体

単独治療と比較し、野生株腫瘍の増大が有意に抑制された(Day28; Control 321.7 mm² vs IFN- α + PD-1 174.2 mm², p=0.024)。IFN- α と抗PD-1抗体で治療したマウスの野生株腫瘍内には、CD4陽性細胞が多く浸潤していた。

D. 考察

細胞性免疫の活性化、MHC Class I分子の発現増強、樹状細胞の成熟促進、細胞傷害性T細胞のアポトーシ抑制などの多彩な免疫賦活効果を示すIFN- α の抗腫瘍作用を、抗PD-1抗体は増強することが明らかとなった。これらの治療は、今後の臨床への応用も期待できると考えられた。

E. 結論

IFN- α と抗PD-1抗体の併用療法は、マウス消化器癌に対し抗腫瘍効果が認められ、今後、臨床応用が期待できると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Strong CD8(+) T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma.

Hiroishi K, Eguchi J, Baba T, Shimazaki T, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Uozumi S, Omori R, Matsumura T, Yanagawa T, Ito T, Imawari M. *J Gastroenterol*. 2010; 45(4):451-458.

2) Immune response of cytotoxic T lymphocytes and possibility of vaccine development for hepatitis C virus infection.

Hiroishi K, Eguchi J, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Omori R, Imawari M. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010:263810.

3) Reactivation of Epstein-Barr virus in B cells of patients with chronic hepatitis C.

Shimozuma Y, Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Miyashita M, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K, Imawari M.

J Med Virol 82 (12): 2064-2072, 2010.

4) Cyclooxygenase-2 gene promoter haplotypes affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression.

Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, Doi H, Omori R, Imawari M. *Hepato Res* 40 (12): 1219-1226, 2010.

2. 学会発表

1) 肝癌におけるHLA拘束性Glypican-3エピトープの同定. 大森里紗、江口潤一、石井成明、平出綾子、坂木理、土肥弘義、広石和正、井廻道夫. 第96回日本消化器病学会総会

2) C自己免疫性肝疾患における病態とCOX-2及びosteopontin遺伝子プロモーター領域多型との関連性の解析. 坂木理、牧野鈴子、広石和正、江口潤一、石井成明、平出綾子、大森里紗、上田久美子、井廻道夫. 第46回日本肝臓学会総会

3) 消化器癌におけるIL-4とCpG併用による抗腫瘍効果と作用機序の検討. 江口潤一、広石和正、土肥弘義、石井成明、平出綾子、坂木理、大森里紗、馬場俊之、松村卓哉、魚住祥二郎、井廻道夫. 第52回日本消化器病学会大会.

4) 肝細胞癌患者における癌抗原特異的細胞性免疫応答. 広石和正、江口潤一、井廻道夫. 第14回日本肝臓学会大会.

5) HCV 感染における特異的 T 細胞免疫応答の検討. 石井成明、広石和正、井廻道夫. 第 38 回日本肝臓学会東部会.

6) Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M,

Shimozuma Y, Miyashita M, Hiroishi K, Imawari M.

B cell-infected or -associated hepatitis C virus has interferon-resistant phenotype. The Liver Meeting 2010, The 61st Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases, Boston, USA. 2010.10.31

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得なし
2. 実用新案登録なし
3. その他なし

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）
研究分担報告書

ウイルス性肝炎・肝がんにおける抗原特異的な免疫制御に関する研究

研究分担者 中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨： 独自に確立した世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースに基づいて、肝がん特異的な14種類のがん抗原におけるHLA-A24モチーフ拘束性の細胞障害性Tリンパ球（CTL）抗原ペプチド27個を同定してきた。そこで、抗原ペプチドに対するCTLの反応性をELISPOT法などハイスループットな手法を用いて臨床経過と合わせて検討した。対象とした31名の肝がん患者のうち24名にいずれかのペプチドに対する陽性反応を認めた。なかでもcyclophilin B, SART2, SART3, p53, MRP3, AFP, hTERTに対する反応が高頻度に認められた。肝がんの内科的局所療法（TAE, RFA）や化学療法に伴って陽性反応が誘導されるとともに、メモリー型のTリンパ球が増加することを観察した。さらに、CTL反応に抑制的に作用するCTLA-4分子の阻害実験を行ったところ、肝がん患者において優位に反応性が亢進した。これより、肝がん患者の病態における免疫原性の高い抗原ペプチドが同定されるとともに免疫治療の開発における有用性が示唆された。

A. 研究目的

肝がんの発がんや治療後の再発を制御する戦略として、腫瘍抗原特異的な免疫反応によって抗腫瘍効果を誘導する手法の有用性が示唆されている。我々は世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースに基づいて、肝がん特異的な14種類のがん抗原におけるHLA-A24モチーフ拘束性の細胞障害性Tリンパ球（CTL）抗原ペプチド27個を同定してきた。そこで、抗原ペプチドに対するCTLの反応性をELISPOT法などハイスループットな手法を用いて臨床経過と合わせて検討した。

B. 研究方法

HLA-A24陽性の肝がん患者（31名）および対照としてC型慢性肝炎患者（29名）、健康者（11名）について検討した。14種類のがん抗原（ART1, ART4, Cyp-B, Lck, MAG E-A1, MAGE-A3, SART1, SART2, SART3, Her-2/neu, p53, MRP3, AFP, hTERT）におけるHLA-A24モチーフ拘束性の抗原ペプチド27個を用いて末梢血より細胞障害性Tリンパ球（CTL）を誘導し、肝がん細胞株に対する障害活性を測定した。また、ELISPOTアッセイによってCTLの割合を測定した。肝がん患者においては、治療経過（TAE, RFA, 化学療法）と合わせて解析した。

（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたっては、倫理性・安全性の確保に十分配慮した。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に

従うとともに、実施機関である「金沢大学医学倫理委員会」の審査体制のもとに行った。また、個人情報保護の観点からすべてのサンプル及び結果は番号化した。

C. 研究結果

- 1) 肝がん患者31名中24名（77.4%）において、27個のペプチドのいずれかにCTL反応を認めた。また、23個（85.2%）のペプチドがいずれかの患者に認識された。
- 2) 治療経過における検討では、27個のペプチドのうち16個（59.3%）に対するCTL反応が亢進した。
- 3) 治療経過に伴って増加したCTLの細胞免疫学的検討（naive/effector/memory）において、central memoryタイプ（CD45RA-CCR7+）であった。
- 4) CTL反応の誘導に抑制的に作用するCTLA-4分子に対する抗体を用いて阻害実験を行ったところ、11/25（44%）のCTL反応、7/13（54%）の肝がん患者において優位に亢進した。
- 5) CTLA-4抗体によるCTL反応の亢進は、サイトカインIL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, TNF- α の産生を伴っていた。

D. 考察

肝がんに対する特異的な免疫反応を同定することは、新規の標的治療の開発につながるものと考えられる。これまでAFPタンパ

クに対する免疫治療の試みがなされ、CTL反応を誘導することに成功はしたものの、腫瘍縮小効果は得られなかったと報告されている。そこで、本研究では新たな標的となる抗原ペプチドエピトープの同定を検討した。

肝がん患者においてCTL陽性反応を高率に誘導するペプチドエピトープがスクリーニングされるとともに、治療経過によってこれらに対するCTLが誘導されることを観察した。さらに、CTLの特徴としてcentral memoryタイプを示したことから、ペプチドワクチンなどを用いて追加刺激することによって、抗腫瘍効果の高いエフェクター (effector memory / effector) に分化することが可能と考えられた。

最近の臨床研究において、がん治療におけるCTLA-4抗体の効果が報告されている。抗腫瘍免疫の誘導に抑制的なCTLA-4分子を阻害することによって有効な反応が得られるものと推測されている。そして本検討においても、CTLA-4抗体によってCTLの誘導性が亢進した。今後、抗原ペプチドを用いたワクチン開発において、CTLA-4抗体の併用は抗腫瘍効果を増強できる可能性が示唆された。

E. 結論

肝がん患者の病態における免疫原性の高い抗原ペプチドが同定されるとともに免疫治療の開発における有用性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Prolonged recurrence-free survival following ok432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 163: 165-177.
2. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O and Kaneko S: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 2010; 126: 2164-2174.
3. Kawano M, Nishida H, Nakamoto Y, Tsumura H and Tsuchiya H: Cryoimmunologic antitumor effects

enhanced by dendritic cells in osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2010; 468: 1373-1383.

4. Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Nakagawa H, Mizukoshi E, Naito M, Mukaida N and Kaneko S: Antitumor effect after radio-frequency ablation of murine hepatoma is augmented by an active variant of cc chemokine ligand 3/macrophage inflammatory protein-1alpha. *Cancer Res.* 2010; 70: 6556-6565.
5. Kakinoki K, Nakamoto Y, Kagaya T, Tsuchiyama T, Sakai Y, Nakahama T, Fujita Y, Mukaida N and Kaneko S: Prevention of intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma by combination of suicide gene therapy and monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. *J. Gene Med.* 2010; 12: 1002-1013.

2. 学会発表

1. Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: #1725; NFkB activation precedes dynamics of oxidative stress-related procarcinogenic signalings in a mouse model of chronic hepatitis B.; 第61回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 52 (4, Suppl.) 935A; 一般; poster: Nov. 1, 2010
2. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Dendritic Cell Transfer during Locoregional Treatments Induces Prolonged Recurrence-Free Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma.; International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa "Cancer and Host Response" (Satellite Symposium of 14th International Congress of Immunology - Kanazawa, Japan): Abstract p33-34; session; oral: Aug. 29, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
研究分担報告書

ソラフェニブによる肝がん細胞のオートファジー誘導について

研究分担者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・准教授

研究要旨： C型肝炎は肝線維化の進行とともに発癌のリスクが高くなることが知られており、肝がんは肝不全と並んでC型肝炎患者の予後を規定する重要な因子である。しかし早期肝癌に対しては局所治療といった治療法の進歩により予後の改善が認められているものの、進行肝癌に対しては未だ予後が厳しいのが現状である。近年進行肝癌において、ソラフェニブの投与による生存期間の延長が明らかにされ初めて認可された。しかし実際にPRやCRを得られる症例は少ないのが現状であり、その治療効果の改善は重要な課題である。そこで我々は肝癌のソラフェニブ抵抗性の一因として、オートファジーの関与を検討した。肝癌細胞株にソラフェニブを添加したところ、経時的なオートファゴソームの蓄積が認められた。また mRFP-GFP-LC3 発現プラスミドを用いた解析を行い、オートファゴソームの蓄積がオートファジー経路の活性化によるものであることを明らかにした。オートファジーを阻害するとソラフェニブの効果が増強され、ソラフェニブによって誘導されるオートファジーは肝癌の細胞死誘導を阻害すると考えられた。肝癌におけるソラフェニブ抵抗性のメカニズムのひとつとしてオートファジーの関与が認められ、治療のターゲットとなりうることが示された。

共同研究者

林 紀夫 関西労災病院

清水 聡 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

ソラフェニブは現在のところ肝癌に対して認可されている唯一の分子標的治療薬であり、Raf キナーゼや VEGF 受容体チロシンキナーゼの抑制を介して、細胞増殖の抑制さらには血管新生の阻害に寄与するとさ

れている。しかしその治療効果は未だ限定的であり、治療抵抗性の機序の解明は重要な課題の一つである。我々はこれまでソラフェニブ抵抗性の機序としてアポトーシスに着目した研究を行ってきた。そして、Bcl-xL がソラフェニブ抵抗性の一因であるとともに、Bcl-xL 阻害薬である ABT-737 の併用がソラフェニブの治療効果を増強すると報告した。本来オートファジーは、蛋白やオルガネラの代謝回転や飢餓状態におけ

るエネルギー供給に重要な役割を担う細胞内分解系の一つである。一方で、過剰な活性化により自己消化を起し、結果細胞死を誘導するという役割も併せ持っているため、近年各種癌におけるオートファジーの役割が注目されている。肝癌においても、オートファジー関連遺伝子である BECN1 の発現量と予後との相関やオートファジーを介した TGF β の増殖抑制効果など、オートファジーに関する報告が相次いでいる。しかしソラフェニブがオートファジーに与える影響については十分な解析はなされておらず、未だ明確ではない。そこで我々はソラフェニブのオートファジーに対する影響およびその役割を明確にするべく研究を開始した。

B. 研究方法

肝癌細胞株 Huh7 および PLC/PRF/5 にソラフェニブを添加し、オートファゴソーム蓄積の指標である LC3-II の経時的な変化をウェスタンブロット法にて検討した。また GFP-LC3 発現プラスミドを用いることにより肝癌細胞株における LC3-II の局在を蛍光顕微鏡にて観察した。続いてオートファジー経路の活性を評価するため、蛍光の変化によりオートファジーの進行をモニタリングできる mRFP-GFP-LC3 発現プラスミドを用いた解析を行い、電子顕微鏡にてオートファジーの進行を観察した。オートファジー阻害実験では、オートファジーの誘導に必須の分子である ATG7 に対する siRNA を用いた実験とオートファゴソームの分解を阻害するクロロキンをを用いた実験をそれぞれ行った。その際、肝癌細胞株の viability は WST 法を用い、アポトーシス経

路の活性化については上清中の Caspase3/7 活性の測定により評価を行った。

C. 研究成果

オートファジーの進行に伴い LC3-I は LC3-II に変換される。LC3-II の発現量はオートファゴソームの量と相関することが知られている。そこで LC3-II の発現量をウェスタンブロット法にて検討したところ、肝癌細胞株 Huh7 にソラフェニブ 10 μ M を添加した 1 時間後より LC3-II が誘導され、24 時間後まで経時的に LC3-II の増加が認められた。別の肝癌細胞株 PLC/PRF/5 を用いて検討すると、ソラフェニブ 5 μ M から LC3-II の誘導が認められ 10 μ M ではより強くオートファゴソームの蓄積が誘導された。続いて Huh7 に GFP-LC3 を強制発現させた後、ソラフェニブを添加し蛍光顕微鏡を用いて LC3 の局在を検討した。結果、コントロール群では細胞質内にびまん性に GFP-LC3 の分布が認められたのに対して、ソラフェニブ添加群では核周囲にオートファゴソームと考えられる点状の構造物が蓄積しているのが観察された。同様に mRFP-GFP-LC3 を強制発現した後ソラフェニブを添加したところ、核周囲にオートファゴソームと考えられる黄色の点状構造物に混じって、赤色の点状構造物が誘導された。これはオートファジーの進行に伴い GFP のみが不活化し、蛍光シグナルが赤に変化した LC3-II の凝集と考えられ、オートファジーがオートライソソームまで進行していることが示された。またソラフェニブを添加した肝癌細胞株 Huh7 を電子顕微鏡にて観察したところ、2 重膜構造として観察されるオートファゴソームのみならず、内容物の分解が進行

しているオートライゾームも観察され、蛍光顕微鏡の観察結果と一致するものであった。

続いてソラフェニブ添加時に肝癌細胞株に誘導されるオートファジーの役割を検討するべく、ATG7に対する siRNA を用いてオートファジー阻害実験を行った。siRNA により ATG7 の蛋白レベルでの減弱および LC3-I から LC3-II への変換の阻害が誘導されていることをそれぞれウェスタンブロット法にて確認した。siRNA によるオートファジーの阻害のみでは細胞の viability やアポトーシス誘導に明らかな影響を与えなかった。ソラフェニブ単独ではアポトーシスが誘導され細胞障害活性を認めたが、siRNA を用いたオートファジーの阻害下でソラフェニブを添加するとソラフェニブ単独群に比してソラフェニブのアポトーシス誘導効果、細胞障害活性ともに有意に増強された。次にオートファジー機構後半のライゾゾームでの分解段階を阻害するとされているクロロキンを用い阻害実験を行った。クロロキンによるオートファジーの阻害効果はオートファジー特異的に分解される p62 の発現量がウェスタンブロット法で増加することにより確認した。クロロキン単独でも高濃度において Caspase3/7 活性の上昇が認められたが、WST 法では明らかな細胞数の減少を認めなかった。しかし、ソラフェニブと併用するとクロロキンは濃度依存的にソラフェニブによるアポトーシス誘導作用および細胞障害効果を増強した。

D. 考察と結論

今回、ソラフェニブの投与が肝癌細胞にオートファジーを誘導することが明らかとな

った。誘導されたオートファジーは肝癌の細胞死誘導を阻害しており、オートファジー経路の阻害によりソラフェニブの抗腫瘍効果を高めることができた。肝癌においてオートファジー経路の阻害がソラフェニブ抵抗性の新たな治療標的になりうることを示された。

E. 研究発表

論文発表

1. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Li W, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Yin XM, Hennighausen L, Tatsumi T, Hayashi N. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology* 50: 1217-1226, 2009.
2. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 52: 1310-1321, 2010.
3. 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* 52: 698-704, 2010.

4. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 138: 2487-2498, 2010.

学会発表

The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 61th Annual Meeting, October 29-November 2, 2010, Boston, MA

Poster

#519 ABT-737, a Bcl-xL inhibitor, enhances the anti-tumor effect of sorafenib against hepatocellular carcinoma.

Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Li W, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N.

#593 The role of IFN-STAT1 signal transduction on inhibition of HCC development.

Hosui A, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Uemura A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Hayashi N.

#2014 Signal transducer and activator of transcription 3 signaling

in hepatocytes protects from liver injury and fibrosis during chronic cholestasis in mice.

Shigekawa M, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N, Takehara T.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

Peg-IFN/RBV 併用療法の肝発癌抑制効果について

研究分担者 平松 直樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 講師

研究要旨：Peg-IFN/RBV 併用療法を施行された C 型慢性肝疾患 1996 例（平均年齢：56.3±10.8 歳、平均観察期間：26.8±12.5 ヶ月）を対象とし、Kaplan-Meier 法、Log-rank 検定、Cox 比例ハザードモデルを用いて累積発癌率、肝発癌に関与する因子を検討した。

〔成績〕肝発癌に関与する因子についての多変量解析では、55 歳未満群に比し、55-65 歳群（Hazard ratio;HR:5.2）、65 歳以上群（HR:10.3）では高齢に伴って有意に発癌率が高く、男性（HR:2.9）、血小板 12 万未満群（HR:1.8）で有意に発癌が高率であった。治療効果別では、無効群に比し、再燃群（HR:0.40）、著効群（HR:0.27）で有意に発癌率が低かった。また、65 歳以上においても、性別、血小板数、治療効果は肝発癌に有意に関与し、無効群に比し、再燃群（HR:0.29）、著効群（HR:0.24）では有意に発癌率が低かった。一方、非著効群では、平均 ALT 値が 30IU/ml 以下群において、30IU/ml 超群に比し有意に肝発癌率が低率であった（ $p < 0.01$ ）。

〔結論〕Peg-IFN/RBV 併用療法の著効・再燃例では肝発癌が抑制され、非著効例では、ALT の低値維持が肝発癌抑制に重要であることが示唆された。

共同研究者

林 紀夫 関西労災病院

A. 研究目的

本邦における肝細胞癌の死亡者数は年間 3 万人を超え、悪性新生物による死亡の第 3 位を占めている。肝細胞癌の 7-8 割は C 型肝炎ウイルス（HCV）感染を背景としており、HCV 感染の根絶により、多くの肝発癌が予防可能であると考えられる。そこで、本研究では C 型肝炎症例に対する Peg-IFN/RBV 併用療法の肝発癌抑制効果について検討した。

B. 研究方法

大阪大学ならびに関連施設において Peg-IFN/RBV 併用療法を施行された C 型慢性肝疾

患 1966 例を解析対象とした（表 1）。平均年齢は 56.3±10.8 歳、男性 968 例/女性 998 例、Peg-IFN/RBV 併用療法の治療効果は、著効 1086 例/再燃 392 例/無効 479 例で、平均観察期間は、26.8±12.5 ヶ月であった。累積発癌率、肝発癌に関与する因子は、Kaplan-Meier 法、Log-rank 検定、Cox 比例ハザードモデルを用いて検討した。

C. 研究結果

全症例における肝癌発症は 68 症例で、累積発癌率は 1 年 0.8%/3 年 4.9%/5 年 9.6%であった。肝発癌に関与する因子についての多変量解析では、55 歳未満群に比し、55-65 歳群（Hazard ratio;HR:5.2, $p=0.002$ ）、65 歳以上群（HR:10.3, $p < 0.001$ ）では高齢に伴って有意に発癌率が高く、男性（HR:2.9, $p < 0.001$ ）、

血小板 12 万未満群(HR:1.8, p=0.02)で有意に発癌が高率であった(表2)。治療効果別では、無効群に比し、再燃群(HR:0.40, p=0.01)、著効群(HR:0.27, p<0.001)では有意に発癌率が低く、3年累積発癌率は、Peg-IFN/RBV 併用療法無効群5.0%/再燃群1.9%/著効群1.1%であった。また、65歳以上においても、性別、血小板数、治療効果は肝発癌に有意に関与し、無効群に比し、再燃群(HR:0.29, p=0.024)、著効群(HR:0.24, p=0.002)では有意に発癌率が低く、3年累積発癌率は、無効群15.6%/再燃群3.4%/著効群2.8%であった。一方、Peg-IFN/RBV 併用療法の非著効群では、平均ALT値が30IU/ml以下群において、30IU/ml超群と比し有意に肝発癌率が低率であった(p<0.01)(表3)。

D. 考察

Peg-IFN/RBV 併用療法により、著効のみならず、再燃例においても肝発癌が有意に抑制された。また、肝発癌の高リスク群である高齢者においても同様の効果が認められた。高齢者においては、非高齢者に比し著効率が低いことが知られているが、発癌抑制という点からは、Responder(再燃例+著効例)において、改善効果があることが示唆された。一方、Peg-IFN/RBV 併用療法の非著効例では、ALTの低値維持が肝発癌抑制に関連しているため、新規抗ウイルス剤までのbridge useとして、肝庇護療法やIFN少量投与などにより、積極的に肝炎を鎮静化させることが重要であると考えられた。

E. 結論

Peg-IFN/RBV 併用療法による治療介入により、C型肝炎における肝発癌が抑制されること

が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表:

1) Imai Y, Tamura S, Tanaka H, Hiramatsu N, Kiso S, Doi Y, Inada M, Nagase T, Kitada T, Imanaka K, Fukuda k, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Reduced risk of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in aged patients with chronic hepatitis C is limited to sustained virological responders. *J Viral Hepat.* 2010 ;17(3):185-91.

2) Tomimaru Y, Nagano H, Eguchi H, Kobayashi S, Marubashi S, Wada H, Tanemura M, Umeshita K, Hiramatsu N, Takehara T, Doki Y, Mori M. Effects of preceding interferon therapy on outcome after surgery for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Surg Oncol.* 2010 15;102(4):308 -14.

3) Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology.* 2010;52(4):1310-21.

2. 学会発表:

1) 黒川三佳、平松直樹、小瀬嗣子、他. “肝細胞癌治療後C型肝炎に対するPeg-IFN/Ribavirin 併用療法の治療効果と肝癌再発について” 一般演題 第46回日本肝臓学会総会 2010

2) 黒川三佳、平松直樹、倉繁奈緒、他.

“B型慢性肝疾患に対するラミブジン投
与症例における肝発癌についての検討”

一般演題 第46回日本肝臓学会総会

2010

3) 小瀬嗣子、平松直樹、薬師神崇行、他.

“Peg-IFN/Ribavirin併用療法の肝発癌
抑制効果について—多施設(OLF)共同研究

—”一般演題 第46回日本肝臓学会総会

2010

4) 黒川三佳、平松直樹、小瀬嗣子、他.

“肝癌治療後C型肝炎に対する
Peg-IFN/Ribavirin併用療法の治療効果

と肝癌再発について”一般演題 第14

回日本肝臓学会大会 2010

5) 小瀬嗣子、平松直樹、薬師神崇行、他.

“Peg-IFN/Ribavirin併用療法の肝発癌
抑制効果について—多施設(OLF)共同研究

—”一般演題 第14回日本肝臓学会大会

2010

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

Factor	ALL, n = 1966
Age (y.o)	56.3 ± 10.8
Sex: male/female	968 / 998
HCV serotype: 1/2	1463 / 474
Liver histology: Activity:A0-1/2-3	723 / 681
Fibrosis:F0-2/3-4	1186 / 218
WBC (/μl)	5158 ± 1574
Neutrophils (/μl)	2652 ± 1120
RBC (x10 ⁴ /μl)	439 ± 46
Hemoglobin (g/dl)	14.0 ± 1.4
Platelets (x10 ⁴ /μl)	16.8 ± 5.7
AST (IU/l)	64 ± 52
ALT (IU/l)	80 ± 78
γGTP (IU/l)	63 ± 73
Scr (mg/dl)	0.71 ± 0.16
AFP (ng/ml)	13.9 ± 57.1
PIVKA-II (mAU/ml)	26.4 ± 10.8
SVR/Relapse/NR	1086 / 392 / 479
Observation period (months)	26.8 ± 12.5

表1. 患者背景

Factor	Category	Hazard ratio	95% CI	P value
Age	0: < 55 y.o.	1		< 0.001
	1: 55 - 65 y.o.	5.20	1.800 - 14.998	0.002
	2: ≥ 65 y.o.	10.33	3.628 - 29.398	< 0.001
Sex	0: male	2.91	1.706 - 4.977	< 0.001
	1: female	1		
Platelet	0: < 12 x 10 ⁴ /μl	1.79	1.079 - 2.980	0.024
	1: ≥ 12 x 10 ⁴ /μl	1		
ALT	0: < 40 IU/l	1	1.092 - 6.043	0.031
	1: ≥ 40 IU/l	2.57		
Antiviral effect	0: NR	1	0.198 - 0.803	0.01
	1: Relapse	0.40		
	2: SVR	0.27		

(Cox's proportion hazards model)

表2. 肝発癌に関与する因子 (多変量解析)

Factor	Category	Hazard ratio	95% CI	P value
Age	0: < 55 y.o.	1		< 0.001
	1: 55 - 65 y.o.	4.6	1.356 - 15.607	0.014
	2: ≥ 65 y.o.	11.44	3.399 - 38.520	< 0.001
Sex	0: male	3.65	1.968 - 6.756	< 0.001
	1: female	1		
Platelet	0: < 12 x 10 ⁴ /μl	2.06	1.166 - 3.655	0.013
	1: ≥ 12 x 10 ⁴ /μl	1		
ALT	0: > 80 IU/l	1		0.047
	1: 40 - 80 IU/l	0.54	0.258 - 1.137	0.105
	2: 30 - 40 IU/l	0.55	0.229 - 1.303	0.173
	3: ≤ 30 IU/l	0.19	0.058 - 0.609	0.005

(Cox's proportion hazards model)

表3. Peg IFN/RBV併用療法非著効例における肝発癌に関与する因子
(多変量解析)

原発性肝癌における TIE2 陽性単球の意義

研究分担者 考藤 達哉 大阪大学大学院医学系研究科樹状細胞制御治療学寄附講座准教授

研究の要旨

肝癌は血流の豊富な腫瘍であり、その発生、進展、転移に血管新生が重要な役割を果たしている。TIE2 陽性単球 (TEM) は、種々の癌の血管新生に関わることが報告されている。本研究では、血液中や肝癌組織における新生血管前駆細胞 (EPC, TEM) を同定し、肝癌患者における TEM と病態との関連性を明らかにすることを目的とした。本年度は TEM の早期肝癌の biomarker としての有用性についても検討した。TEM は肝癌群において、他群 (健康成人、慢性肝炎、肝硬変) に比べて有意に増加しており、径 2cm 以下の肝癌群に限っても増加していた。TEM の頻度、TIE2 陽性率と肝癌の病期、腫瘍径、治療後再発率などとの間に相関は認めなかった。PBMC 中の TEM 頻度 (>0.4%) は肝癌と肝硬変の判別において、AFP、PIVKA-II より感度、特異度ともに優れていた。以上より、TEM/TIE2 は肝発癌に伴って増加しており、微小肝癌の診断のための biomarker と成り得ることが示唆された。

共同研究者

林 紀夫 関西労災病院

A.研究目的

肝癌は血流の豊富な腫瘍であり、その発生、進展、転移に血管新生が重要な役割を果たしている。肝癌における腫瘍血管の形成機序に関しては、流血中に存在する血管内皮細胞の前駆細胞が関与するという報告があるが、組織への遊走や浸潤機序、血管への分化過程の詳細は世界的にも明らかではない。また、種々の癌患者において、免疫抑制作用を持つ制御性 T 細胞や骨髄系抑制細胞が増加、活性化しており、癌の増大、転移や治療抵抗性に関与している可能性がある。本研究では、肝癌患者を対象として、血液中や癌組織における血管内皮細胞や免疫細胞の頻度、分布、機能解析を行い、血管新生の前駆細胞の同定やそれらの癌組織への遊走、浸潤の機序、肝癌組織での細胞分化や抗腫瘍免疫細胞の機能低下の機序、免疫抑制細胞の誘導の機序を解明することを目的とする。これによって、血管新生と免疫抑制の制御に基づく肝癌に対する新規治療法の開発を目指す。

B.研究方法

画像検査によって肝癌 (HCC) と診断された HCV 陽性患者を対象とした。また慢性肝疾患患者 (慢性肝炎、肝硬変)、健康成人を比較対照とした。末梢血 PBMC 中の TIE2 陽性細胞を同定し、各種表面抗原の染色から、TIE2 陽性細胞の表現型を解析した。肝切除例においては、切除癌組織を用いて、浸潤リンパ球中の TIE2 陽性細胞を解析した。TIE2 陽性細胞の頻度と肝癌の Stage、脈管浸潤の有無、臨床指標などの臨床病態

との関連性を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪大学医学部倫理委員会、臨床試験部審査評価委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C.研究結果

TIE2 は CD14^{high} CD16 陽性単球で選択的に発現しており、T 細胞、B 細胞分画では発現を認めなかった。TIE2 陽性単球 (TIE2-expressing monocytes, TEM: CD14+CD16+TIE2+) は CD45 陽性、VEGFR 陰性、AC133 陰性であり、血管内皮前駆細胞とは異なる表現型であった。TEM は CD14+CD16-TIE2-単球に比べて CD80, CD86, HLA-DR が高発現であり、より活性化した細胞群であった。HCC 群では、末梢血 TEM 頻度は他群に比べて有意に増加していた。肝癌組織浸潤リンパ球中の TEM 頻度は、同一患者での末梢血と比べ増加しており、TEM は血中から肝癌組織へ浸潤する可能性が示唆された。TEM の頻度と肝癌の臨床病態 (Stage、腫瘍径、脈管侵襲、AFP、PIVKA-II など) との間に相関は認めなかった。TEM 頻度は肝癌の判別において AFP、PIVKA-II より感度、特異度ともに優れていた

D.考察

肝癌患者において、CD14+CD16+TIE2+CD45+VEGFR2-AC133-HLA-DR++の TEM を同定した。肝癌患者では TEM の頻度が増加していた。TEM/TIE2 は肝癌の進展度や悪性度との関連性は低く、発癌の初期に関与する可能性が示唆された。

E. 結論

TEM/TIE2 は肝発癌に伴って増加しており、微小肝癌の診断のための biomarker と成り得ることが示唆された

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Kanto T.** Dendritic cells in hepatitis virus infection: a legatus within. *Current Immunology Reviews* 2010:1-33.
- 2) Yamaguchi, S., Tatsumi, T., Takehara, T., Sasakawa, A., Yamamoto, M., Kohga, K., Miyagi, T., **Kanto, T.**, Hiramastu, N., Akagi, T., Akashi, M. and Hayashi, N., EphA2-derived peptide vaccine with amphiphilic poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles elicits an anti-tumor effect against mouse liver tumor. *Cancer Immunol Immunother* 2010. **59**: 759-767.

2. 学会発表

- 1) Higashitani K, **Kanto T**, Miyazaki M, Matsubara T, Kakita N, Itose I, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Active role of tryptophan catalyzing enzyme, indoleamine 2, 3-dioxygenase, in the generation of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients
The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course
Boston, MA, USA 10.29-11.2, 2010
- 2) Matsubara M, **Kanto T**, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Pro-angiogenic receptor TIE2 expressing monocytes/ TEMs as novel diagnostic biomarker for hepatocellular carcinoma
The Liver Meeting AASLD 61st Annual Meeting and Postgraduate Course
Boston, MA, USA 10.29-11.2, 2010
- 3) Kakita N, **Kanto T**, Matsubara M, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Distinctive roles of IL-10-producing Type 1 regulatory T cells (Tr1) in the pathogenesis of hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma
The Liver Meeting AASLD 61st Annual

Meeting and Postgraduate Course
Boston, MA, USA 10.29-11.2, 2010

- 4) Kakita N, **Kanto T**, Matsubara M, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Crucial roles of IL-10-producing Type 1 regulatory T cells (Tr1) in the pathogenesis of hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma
17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses
Yokohama, Japan, September 10-14, 2010
- 5) Higashitani K, **Kanto T**, Kakita N, Matsubara M, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Indoleamine 2, 3-dioxygenase as an active inducer of regulatory T cells in chronic HCV infection”
17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses
Yokohama, Japan, September 10-14, 2010
- 6) Matsubara M, **Kanto T**, Kakita N, Higashitani K, Miyazaki M, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing monocytes/ TEMs as novel diagnostic marker for HCV-infected hepatocellular carcinoma
17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses
Yokohama, Japan, September 10-14, 2010
- 7) Miyazaki M, **Kanto T**, Matsubara M, Kakita N, Higashitani K, Inoue M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Type-I and type-III interferon induction from myeloid and plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis C patients; lack of association with single nucleotide polymorphism near IL28B gene
17th International Meeting on Hepatitis C virus and related viruses
Yokohama, Japan, September 10-14, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況 特に予定なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
上田啓次 (上田)	HHV-8	新居志郎ら	病原細菌・ウイルス図鑑	北海道大学出版会	札幌		印刷中
平松直樹 (平松)	肝発癌予防	日本肝臓学会	肝臓診療マニュアル(第2版)	医学書院	東京	2010	23-28
Kanto T. (考藤)	Dendritic cells in hepatitis virus infection: a legatus within	Kita H	Current Immunology Reviews	Bentham Science Publishers	USA	2010	1-33

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Uemura A, (林)	Natural killer cell is a major producer of interferon γ that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice.	Cancer Immunol Immunother	59	453-463	2010
Inoue Y, (林)	Factors affecting efficacy in patients with genotype 2 chronic hepatitis C treated by pegylated interferon alpha-2b and ribavirin: reducing drug doses has no impact on rapid and sustained virological responses.	J Viral Hepat	17	336-344	2010
Imai Y, (林)	Reduced risk of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in aged patients with chronic hepatitis C is limited to sustained virological responders.	J Viral Hepat	17	185-191	2010