

の細胞は、間葉系マーカー陽性細胞とマクロファージ系マーカー陽性細胞であった。

・研究分担者：宮島 篤(東京大学)

- (1) マウス硬変肝の生着骨髄細胞は、CD45 陽性血球系細胞が大部分で、Thy1 陽性細胞も存在した。  
 (2) マウス硬変肝への HTVi 法による MMP9 遺伝子導入で肝線維化は有意に抑制された。

・研究分担者：河田 純男、齋藤 貴文(山形大学)

- (1) アルコール性肝硬変に対して山口大学と共同で ABM / 療法を 6 例施行し、その有効性を確認した。

・研究分担者：梅村 武司(信州大学)

- (1) 骨髄細胞中における肝炎ウイルスの最適な検出方法を確立した。

・研究分担者：大河内 仁志(国立国際医療研究センター)

- (1) マウス皮下脂肪組織由来およびヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の肝硬変改善効果を検討した。

・研究分担者：酒井 佳夫(金沢大学)

- (1) マウス皮下脂肪組織由来間葉系幹細胞の分離培養法とマウス NASH モデルを確立した。

・研究分担者：小川 佳宏(東京医科歯科大学)

- (1) 新規マウス NASH モデルである高脂肪食負荷メラノコルチン 4 型受容体欠損マウス (MC4R-K0) の病態形成において、マクロファージ機能の変化が観察された。

・研究分担者：仁科 博史(東京医科歯科大学)

- (1) 単離した NASH 模倣メダカ変異体の病態関連遺伝子解析で、ヒト NASH との類似性を見つけた。

#### IV. 23 年度の課題

・研究代表者：坂井田 功、分担研究者：寺井 崇二(山口大学)

- (1) ヒト骨髄細胞から分離培養した間葉系マーカー陽性細胞とマクロファージ系マーカー陽性細胞の免疫不全肝硬変マウス投与による肝線維化抑制効果を検討する。  
 (2) (1)における造腫瘍性の有無を検討評価する。

・研究分担者：宮島 篤(東京大学)

- (1) CCl<sub>4</sub>以外の肝障害モデルへの骨髄細胞投与の抗線維化効果を評価する。  
 (2) マウス初代肝星細胞と骨髄細胞との共培養による肝線維化関連因子の変動を評価する。

・研究分担者：河田 純男、齋藤 貴文(山形大学)

- (1) 引き続き ABM / 療法を実施した症例の QOL 改善効果を評価し、初代ヒト骨髄由来細胞の無血清培養法を開発する。

・研究分担者：梅村 武司(信州大学)

- (1) ABM / 症例の骨髄細胞中における肝炎ウイルスの同定とその複製について検討する。

・研究分担者：大河内 仁志(国立国際医療研究センター)

- (1) ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞の肝硬変モデルマウス投与による肝機能改善効果を検討する。

・研究分担者：酒井 佳夫(金沢大学)

- (1) マウス NASH モデルへの脂肪組織由来培養間葉系幹細胞投与の肝修復・再生効果を検討する。

・研究分担者：小川 佳宏(東京医科歯科大学)

- (1) MC4R-K0 マウスの NASH 病態形成におけるマクロファージの機能的意義を検討する。

・研究分担者：仁科 博史(東京医科歯科大学)

(1) 肝再生・修復過程における「細胞競合」について解析を行う。

## V. 行政施策への貢献の可能性

(1) ヒト非代償性肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の先進医療

(2) 安全なヒト初代骨髄および脂肪組織由来細胞の GMP に準拠した培養方法の確立

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

・研究代表者：坂井田 功、研究分担者：寺井 崇二(山口大学)

(1) Terai S and Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 2010 Jul 15. [Epub ahead of print]

(2) Kim JK, Park YN, Kim JS, Park MS, Paik YH, Seok JY, Chung YE, Kim HO, Kim KS, Ahn SH, Kim DY, Kim MJ, Lee KS, Chon CY, Kim SJ, Terai S, Sakaida I, Han KH. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant*. 2010 Jun 3. [Epub ahead of print]

・研究分担者：宮島 篤(東京大学)

(1) Itoh T, Kamiya Y, Okabe M, Tanaka M, and Miyajima A. Inducible expression of Wnt genes during adult hepatic stem/progenitor cell response. *FEBS Letters*. 2009;583:777-781.

(2) Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, Suzuki K, Saito S, Kamiya Y, Tsujimura T, Nakamura K, and Miyajima A. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse livers. *Development*. 2009;136:1951-1960.

・研究分担者：河田 純男、斎藤 貴文(山形大学)

(1) Haga H, Saito T, Okumoto K, Ugajin S, Sato C, Ishii R, Nishise Y, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Enhanced expression of fibroblast growth factor 2 in bone marrow cells and its potential role in the differentiation of hepatic epithelial stem-like cells into hepatocyte lineage. *Cell and Tissue Res*. 2010, *in press*.

・研究分担者：大河内 仁志(国立国際医療研究センター)

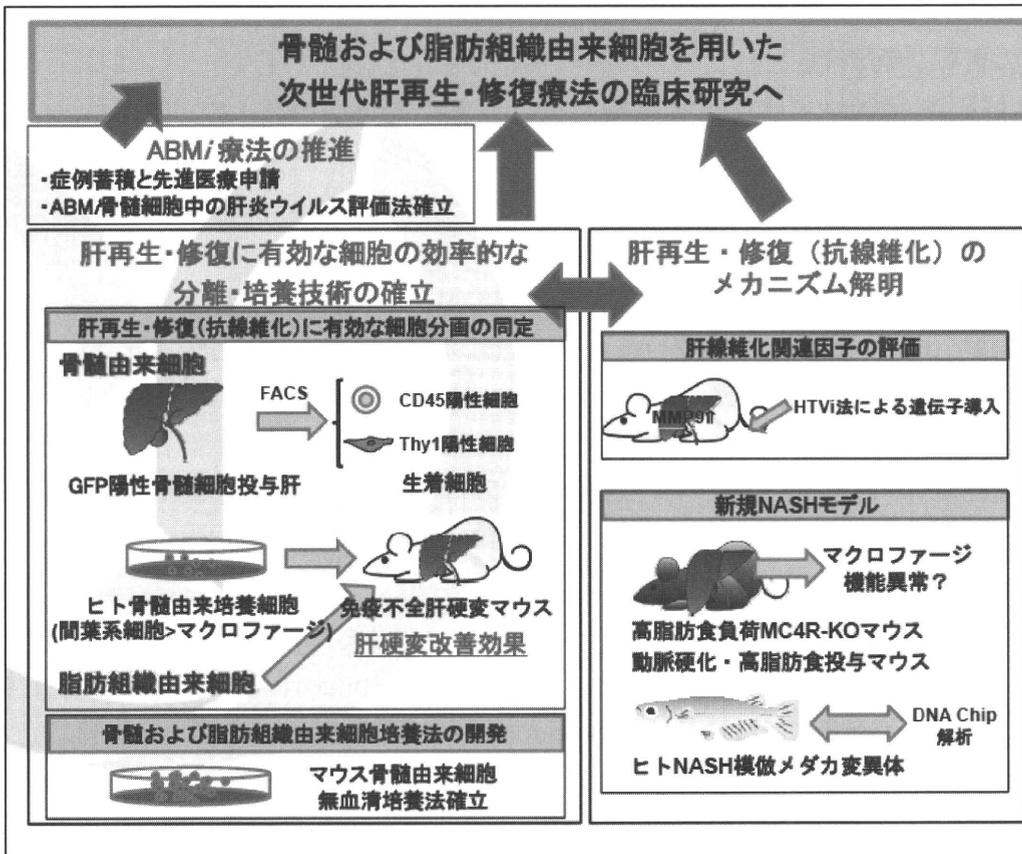
(1) Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, Asashima M, Okochi H. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400:461-5.

・研究分担者：仁科 博史(東京医科歯科大学)

(1) Takahashi S, Ebihara A, Kajiho H, Kontani K, Nishina H, and Katada T. RASSF7 negatively regulates pro-apoptotic JNK signaling by inhibiting the activity of phosphorylated-MKK7. *Cell Death Differ*. 2010, *in press*.

(2) Negishi T, Nagai Y, Asaoka Y, Ohno M, Namae M, Mitani H, Sasaki T, Shimizu N, Terai S, Sakaida I, Kondoh H, Katada T, Furutani-Seiki M, Nishina H. Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka. *Hepatology*. 2010;51(3):1037-45.

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等



	平成21年度 (1年目)	平成22年度 (2年目)	平成23年度 (3年目)
<b>1. 肝再生・修復(抗線維化)に有効な骨髄および脂肪組織由来細胞分画の分離培養法開発</b>	→ 実施済み	→ 計画	
<b>骨髄および脂肪組織中の肝再生・修復に有効な細胞分画の同定</b>	・自己骨髄細胞投与とマウス肝の解析 ・マウス骨髄または脂肪由来培養細胞機能評価	・自己骨髄細胞投与とマウス肝のFACS解析 ・ヒト骨髄および脂肪組織由来細胞のマウス免疫不全肝硬変モデル投与	・有効な細胞分画の細胞同定と細胞キャラクター評価
<b>有効な細胞分画の培養法の開発</b>	・マウス骨髄由来培養細胞High density法培養 ・ヒト骨髄細胞培養	・Life Technology無血清培地システム(マウス細胞) ・SCIDマウス投与実験	・Life Technology無血清培地システム(ヒト細胞) ・SCIDマウス投与実験
<b>有効な細胞分画の安全性評価試験</b>			
<b>2. 肝再生・修復(抗線維化)のメカニズム解明</b>			
<b>分離肝臓構成細胞と骨髄および脂肪由来細胞との相互作用の解析</b>	・p75NTR抗体陽性細胞分離	・モノクローナル抗体による各種肝臓構成細胞分離との培養	・骨髄細胞と肝星細胞や血管内非細胞との共培養
<b>投与骨髄および脂肪由来細胞の抗肝線維化メカニズムの解明</b>	・自己骨髄細胞投与とマウス肝マイクロアレイ解析、遺伝子抽出 ・HTVi法開発	・HTVi法によるMMP9評価 ・MC4R KOマウス、NASHメダカ、質量顕微鏡	・HTVi法 ・MC4R KOマウス、メダカNASHモデル、細胞競合
<b>3. ABM/療法臨床研究推進</b>			
	・先進医療申請 ・ABM/療法、山形大学で実施 ・リアルタイムPCR法	・先進医療申請・協議 ・ABM/療法、山形大学で実施 ・CPC、GMPノウハウ蓄積 ・骨髄細胞の肝炎ウイルス	・先進医療認可予定 ・ABM/療法症例蓄積 ・骨髄細胞の肝炎ウイルス評価 ・次世代型肝再生修復療法臨床試験プロトコル準備

## ●研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

昭和 62 年 4 月から平成元年 3 月にかけて、アメリカ・Thomas-Jefferson 大学 (John Farber 教授) にて肝細胞死におけるシグナル伝達・ラジカル研究に従事した。帰国後は、山口大学医学部に於て肝線維化・肝硬変症・肝不全の制御機構の基礎および臨床研究を行ってきた。平成 17 年 8 月 1 日からは山口大学教授として、骨髄細胞投与による肝線維化改善のメカニズムを基礎と臨床の両面から解析している。また国際的にもアメリカ Duke 大学やイギリス Imperial College の客員教授として国際的に共同研究を行っている。

(所属学会) 日本肝臓学会認定指導医・日本消化器病学会指導医・日本内視鏡学会指導医・日本内科学会指導医・日本臨床腫瘍学会暫定指導医

(学会並びに社会における活動) 日本肝臓学会 (評議員)、日本消化器病学会 (評議員)、日本内視鏡学会 (評議員)、日本内科学会 (評議員)、日本病態栄養学会 (評議員)、Duke 大学客員教授 (米国)、Imperial College of London 客員教授 (英国)、日印 (インド) 再生医療センターアドバイザー、新エネルギー産業技術総合開発機構 NEDO 技術委員、2010 年より NEDO 幹細胞標準化評価委員

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

Scott L. Friedman (Mt. Sinai Hospital, USA)

Mark A Zern (UD Davis, USA)

Strom SC (University of Pittsburgh, USA)

Nagy Habib (Imperial College of London, UK)

Han KH (Yonsei University, Korea)

### ・主な研究課題

肝線維化・肝硬変症・肝不全の制御機構の基礎研究および臨床研究

### ・これまでの研究実績(現在から 2004 年まで)

1. *Kuwashiro S, Terai S, Oishi T, Fujisawa K, Matsumoto T, Nishina H, Sakaida I. Telmisartan improved nonalcoholic steatohepatitis in medaka (Oryzias latipes) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation. Cell & Tissue Res. 2010, in press.*

2. *Iizuka N, Oka M, Sakaida I, Moribe T, Miura T, Kimura N, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Yamashita S, Okita K, Sakata K, Karino Y, Toyota J, Ando E, Ide T, Sata M, Tsunedomi R, Tsutsui M, Iida M, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Tamesa T, Fujita Y, Hamamoto Y. Efficient detection of hepatocellular carcinoma by a hybrid blood test of epigenetic and classical protein markers. Clin Chim Acta. 2011;412(1-2):152-8.*

3. *Taba K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Yoshida K, Tanaka T, Mori-Iwamoto S, Maehara SI, Maehara Y, Sakaida I, Nakamura K. KNK437 Downregulates Heat Shock Protein 27 of Pancreatic Cancer Cells and Enhances the Cytotoxic Effect of Gemcitabine. Chemotherapy. 2010;57(1):12-16.*

4. *Kuramitsu Y, Taba K, Ryozaawa S, Yoshida K, Zhang X, Tanaka T, Maehara S, Maehara Y, Sakaida*

- I, Nakamura K. Identification of up- and down-regulated proteins in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Anticancer Res.* 2010;30(9):3367-72.
5. Kiyotoki S, Nishikawa J, Satake M, Fukagawa Y, Shirai Y, Hamabe K, Saito M, Okamoto T, Sakaida I. Usefulness of magnifying endoscopy with narrow-band imaging for determining gastric tumor margin. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25(10):1636-41.
6. Harano M, Ryozaawa S, Iwano H, Taba K, Sen-Yo M, Sakaida I. Clinical impact of endoscopic papillectomy for benign-malignant borderline lesions of the major duodenal papilla. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010 Sep 18. [Epub ahead of print]
7. Okita K, Motohashi S, Shinnakasu R, Nagato K, Yamasaki K, Sato Y, Kitamura H, Hijikata A, Yamashita M, Shimizu K, Fujii S, Ohara O, Taniguchi M, Sakaida I, Nakayama T. A set of genes associated with the interferon-gamma response of lung cancer patients undergoing alpha-galactosylceramide-pulsed dendritic cell therapy. *Cancer Sci.* 2010;101(11):2333-40.
8. Nishikawa J, Satake M, Hamabe K, Fukagawa Y, Shirai Y, Kiyotoki S, Saito M, Okamoto T, Sakaida I. Fine-tuning the criteria for strip biopsy and endoscopic submucosal dissection improves the outcome of early gastric carcinoma treatment. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25(9):1514-7.
9. Yamasaki T, Hamabe S, Saeki I, Harima Y, Yamaguchi Y, Uchida K, Terai S, Sakaida I. A novel transcatheter arterial infusion chemotherapy using iodized oil and degradable starch microspheres for hepatocellular carcinoma: a prospective randomized trial. *J Gastroenterol.* 2010 Aug 25. [Epub ahead of print]
10. Taba K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Yoshida K, Tanaka T, Maehara S, Maehara Y, Sakaida I, Nakamura K. Heat-shock protein 27 is phosphorylated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* 2010;30(7), 2539-43.
11. **Terai S, Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010 Jul 15. [Epub ahead of print]**
12. Harima Y, Yamasaki T, Hamabe S, Saeki I, Okita K, Terai S, Sakaida I. Effect of a late evening snack using branched-chain amino acid-enriched nutrients in patients undergoing hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2010;40(6), 574-84.
13. **Kim JK, Park YN, Kim JS, Park MS, Paik YH, Seok JY, Chung YE, Kim HO, Kim KS, Ahn SH, Kim DY, Kim MJ, Lee KS, Chon CY, Kim SJ, Terai S, Sakaida I, Han KH. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant.* 2010 Jun 3. [Epub ahead of print]**
14. Okita K, Sakaida I, Okada M, Kaneko A, Chayama K, Kato M, Sata M, Yoshihara N, Ono N, Murawaki Y. A multicenter, open-label, dose-ranging study to exploratively evaluate the efficacy, safety, and dose-response of tolvaptan in patients with decompensated liver cirrhosis. *J Gastroenterol.* 2010;45(9):979-87.

15. **Matsumoto T, Terai S, Oishi T, Kuwashiro S, Fujisawa K, Yamamoto N, Fujita Y, Hamamoto Y, Furutani-Seiki M, Nishina H, Sakaida I. *Medaka as a model for human nonalcoholic steatohepatitis. Dis Model Mech.* 2010;3(7-8):431-40.**
16. Okada T, Suehiro Y, Ueno K, Mitomori S, Kaneko S, Nishioka M, Okayama N, Sakai K, Higaki S, Hazama S, Hirata H, Sakaida I, Oka M, Hinoda Y. TWIST1 hypermethylation is observed frequently in colorectal tumors and its overexpression is associated with unfavorable outcomes in patients with colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010;49(5):452-62.
17. Shimizu K, Hashimoto S, Washida Y, Onoda H, Matsunaga N, Higaki S, Fujiwara K, Fujita T, Yamatogi S, Kato M, Hashimoto K, Sakaida I. Computed tomography enteroclysis for recurrent severe gastrointestinal bleeding in a patient with vascular malformation of the small bowel. *Jpn J Radiol.* 2010;28(1):58-61.
18. Iwamoto S, Ryozaawa S, Yamamoto H, Taba K, Ishigaki N, Harano M, Iwano H, Sakaida I. Double balloon endoscope facilitates endoscopic retrograde cholangiopancreatography in roux-en-y anastomosis patients. *Dig Endosc.* 2010;22(1):64-8.
19. **Negishi T, Nagai Y, Asaoka Y, Ohno M, Namae M, Mitani H, Sasaki T, Shimizu N, Terai S, Sakaida I, Kondoh H, Katada T, Furutani-Seiki M, Nishina H. *Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka. Hepatology.* 2010;51(3):1037-45.**
20. **Takami T, Terai S, Sakaida I. *Various Liver Diseases: Novel findings for the development of drug therapy; Current state and future prospects for our liver regeneration therapy using autologous bone marrow cells for decompensated liver cirrhosis patients. J Pharmacol Sci.* 2010, *in press.***
21. Takami T and Sakaida I. Iron regulation by hepatocytes and free radicals. *J Clin Biochem Nutr.* 2010, *in press.*
22. **Segawa M, Sakaida I. *Diagnosis and treatment of portal hypertension. Hepatol Res.* 2009;39(10):1039-43.**
23. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet.* 2009;41(10):1105-9.
24. Kiyotoki S, Nishikawa J, Yanai H, Okamoto T, Higaki S, Taguchi T, Sakaida I. Use of the light-emitting diode-illuminated endoscope for upper gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy.* 2009;41 Suppl 2:E173-4.
25. Ryozaawa S, Iwamoto S, Iwano H, Ishigaki N, Taba K, Sakaida I. ERCP using double-balloon endoscopes in patients with Roux-en-Y anastomosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009;16(5):613-7.

26. Kusakabe A, Tanaka Y, Mochida S, Nakayama N, Inoue K, Sata M, Isoda N, Kang JH, Sumino Y, Yatsushashi H, Takikawa Y, Kaneko S, Yamada G, Karino Y, Tanaka E, Kato J, Sakaida I, Izumi N, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M. Case-control study for the identification of virological factors associated with fulminant hepatitis B. *Hepatol Res.* 2009;39(7):648-56.
27. Korenaga K, Korenaga M, Furukawa M, Yamasaki T, Sakaida I. Usefulness of Sonazoid contrast-enhanced ultrasonography for hepatocellular carcinoma: comparison with pathological diagnosis and superparamagnetic iron oxide magnetic resonance images. *J Gastroenterol.* 2009;44(7):733-41.
28. Nakamura H, Yanai H, Satake M, Okamoto T, Nishikawa J, Sakaida I, Kawano T, Matsusaki K, Miura O. Retrospective analysis of the results of strip biopsies to determine the indication for endoscopic submucosal dissection for early gastric cancer. *J Gastrointest Cancer.* 2008;39(1-4):29-33.
29. Mori-Iwamoto S, Taba K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Tanaka T, Maehara S, Maehara Y, Okita K, Nakamura K, Sakaida I. Interferon-gamma down-regulates heat shock protein 27 of pancreatic cancer cells and helps in the cytotoxic effect of gemcitabine. *Pancreas.* 2009;38(2):224-6.
30. Terai S, Sakaida I. Current status of autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *Hepatol Res.* 2008 Nov;38(s1The 6 Japan Society of Hepatology Single Topic Conference: Liver Failure: Recent Progress and Pathogenesis to Management. 28-29 September 2007, Iwate, Japan):S72-S75.
31. Ohata S, Nawa M, Kasama T, Yamasaki T, Sawanobori K, Hata S, Nakamura T, Asaoka Y, Watanabe T, Okamoto H, Hara T, Terai S, Sakaida I, Katada T, Nishina H. Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 20;379(4):817-23.
32. Okazawa T, Yoshida T, Shirai Y, Shiraishi R, Harada T, Sakaida I, Abe T, Oka M. Expression of vascular endothelial growth factor C is a prognostic indicator in esophageal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2008;55(86-87):1503-8.
33. Takaki-Hamabe S, Yamasaki T, Saeki I, Harima Y, Okita K, Terai S, Sakaida I. Hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma: Is the addition of subcutaneous interferon-alpha-2b beneficial? *Hepatol Res.* 2009;39(3):223-30.
34. Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Hino K, Sakaida I, Mizokami M. Direct cytopathic effects of particular hepatitis B virus genotypes in severe combined immunodeficiency transgenic with urokinase-type plasminogen activator mouse with human hepatocytes. *Gastroenterology.* 2009;136(2):652-62. e3.
35. Fujiwara K, Kojima H, Yonemitsu Y, Yasui S, Imazeki F, Miki M, Suzuki K, Sakaida I, Okita K, Tanaka E, Omata M, Yokosuka O. Phylogenetic analysis of hepatitis A virus in sera from patients with hepatitis A of various severities. *Liver Int.* 2009;29(6):838-45.

36. Ishida H, Wong JB, Hino K, Kurokawa F, Nishina S, Sakaida I, Okita K, Tamesa T, Oka M, Torimura T, Sata M, Takahashi S, Chayama K, Inoue Y. Validating a Markov model of treatment for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Methods Inf Med.* 2008;47(6):529-40.
37. Ishigaki N, Yamamoto N, Jin H, Uchida K, Terai S, Sakaida I. Continuous intravenous infusion of atrial natriuretic peptide (ANP) prevented liver fibrosis in rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378(3):354-9.
38. Shiraishi R, Yamasaki T, Saeki I, Okita K, Yamaguchi Y, Uchida K, Terai S, Sakaida I. Pilot study of combination therapy with transcatheter arterial infusion chemotherapy using iodized oil and percutaneous radiofrequency ablation during occlusion of hepatic blood flow for hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Oncol.* 2008;31(4):311-6.
39. Korenaga K, Korenaga M, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. Effects of a late evening snack combined with alpha-glucosidase inhibitor on liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 2008;38(11):1087-97.
40. Fukagawa Y, Nishikawa J, Kuramitsu Y, Iwakiri D, Takada K, Imai S, Satake M, Okamoto T, Fujimoto M, Okita K, Nakamura K, Sakaida I. Epstein-Barr virus upregulates phosphorylated heat shock protein 27 kDa in carcinoma cells using the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Electrophoresis.* 2008;29(15):3192-200.
41. Shirai Y, Yoshida T, Shiraishi R, Okamoto T, Nakamura H, Harada T, Nishikawa J, Sakaida I. Prospective randomized study on the use of a computer-based endoscopic simulator for training in esophagogastroduodenoscopy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(7Pt1):1046-50.
42. Iwasaki S, Ohira H, Nishiguchi S, Zeniya M, Kaneko S, Onji M, Ishibashi H, Sakaida I, Kuriyama S, Ichida T, Onishi S, Toda G; Study Group of Intractable Liver Diseases for Research on a Specific Disease, Health Science Research Grant, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. The efficacy of ursodeoxycholic acid and bezafibrate combination therapy for primary biliary cirrhosis: A prospective, multicenter study. *Hepatol Res.* 2008;38(6):557-64.
43. Sakaida I. Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(9):1349-53. Review.
44. Ando M, Korenaga M, Hino K, Ikeda M, Kato N, Nishina S, Hidaka I, Sakaida I. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int.* 2008;28(8):1158-66.
45. Harada K, Higaki S, Hashimoto K, Hashimoto S, Oga A, Gondo T, Sakaida I. Study on the colonoscopic features of GVHD enteritis that developed after hematopoietic stem cell transplantation. *Hepatogastroenterology.* 2007;54(80):2221-7.
46. Ooishi T, Nishikawa J, Satake M, Fukagawa Y, Okamoto T, Sakaida I. Ulceration after arterial microcoil embolization. *Gastrointest Endosc.* 2008;67(4):723
47. Marumoto Y, Terai S, Urata Y, Matsumoto T, Mizunaga Y, Yamamoto N, Jin H, Fujisawa K, Murata T, Shinoda K, Nishina H, Sakaida I. Continuous high expression of XBP1 and GRP78 is

important for the survival of bone marrow cells in CCl<sub>4</sub>-treated cirrhotic liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367(3):546-52.

48. Hashimoto K, Shimizu Y, Suehiro Y, Okayama N, Hashimoto S, Okada T, Hiura M, Ueno K, Hazama S, Higaki S, Hamanaka Y, Oka M, Sakaida I, Hinoda Y. Hypermethylation status of APC inversely correlates with the presence of submucosal invasion in laterally spreading colorectal tumors. *Mol Carcinog.* 2008;47(1):1-8.

49. Isobe-Harima Y, Terai S, Segawa M, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. Serum S100b (astrocyte-specific protein) is a useful marker of hepatic encephalopathy in patients with fulminant hepatitis. *Liver Int.* 2008;28(1):146-7.

50. Nishina S, Hino K, Korenaga M, Vecchi C, Pietrangelo A, Mizukami Y, Furutani T, Sakai A, Okuda M, Hidaka I, Okita K, Sakaida I. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology.* 2008;134(1):226-38.

51. Akashi K, Yanai H, Nishikawa J, Satake M, Fukagawa Y, Okamoto T, Sakaida I. Ulcerous change decreases the accuracy of endoscopic ultrasonography diagnosis for the invasive depth of early gastric cancer. *Int J Gastrointest Cancer.* 2006;37(4):133-8.

52. Mori-Iwamoto S, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Mikuria K, Fujimoto M, Maehara S, Maehara Y, Okita K, Nakamura K, Sakaida I. Proteomics finding heat shock protein 27 as a biomarker for resistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Int J Oncol.* 2007;31(6):1345-50.

53. Isobe-Harima Y, Terai S, Miura I, Segawa M, Murata T, Itamoto K, Taura Y, Shinoda K, Sakaida I. A new hepatic encephalopathy model to monitor the change of neural amino acids and astrocytes with behaviour disorder. *Liver Int.* 2008;28(1):117-25.

54. Jin H, Yamamoto N, Uchida K, Terai S, Sakaida I. Telmisartan prevents hepatic fibrosis and enzyme-altered lesions in liver cirrhosis rat induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;364(4):801-7.

55. Tokuhisa Y, Iizuka N, Sakaida I, Moribe T, Fujita N, Miura T, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Circulating cell-free DNA as a predictive marker for distant metastasis of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer.* 2007;97(10):1399-403.

56. Sakaida I. Possibility and limitations in cell therapy. 5) Anti-fibrosis therapy: a therapy using bone marrow cells. *Nippon Naika Gakkai Zasshi.* 2007;96(9):1941-5. Japanese.

57. Okita K, Kurokawa F, Yamasaki T, Sakaida I. Screening of hepatocellular cancer: Japanese strategy. *Hepatol Res.* 2007;37 Suppl 2:S142-5.

58. Jin H, Terai S, Sakaida I. The iron chelator deferoxamine causes activated hepatic stellate cells to become quiescent and to undergo apoptosis. *J Gastroenterol.* 2007;42(6):475-84.

59. Hidaka I, Hino K, Korenaga M, Gondo T, Nishina S, Ando M, Okuda M, Sakaida I. Stronger Neo-Minophagen C, a glycyrrhizin-containing preparation, protects liver against carbon

- tetrachloride-induced oxidative stress in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Liver Int.* 2007;27(6):845-53.
60. Tajima K, Terai S, Takami T, Kawaguchi K, Okita K, Sakaida I. Importance of inhibitor of DNA binding/differentiation 2 in hepatic stellate cell differentiation and proliferation. *Hepatol Res.* 2007;37(8):647-55.
61. Satake M, Nishikawa J, Fukagawa Y, Akashi K, Okamoto T, Yoshida T, Hirano A, Maetani N, Iida Y, Sakaida I. The long-term efficacy of Helicobacter pylori eradication therapy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(12):2233-7.
62. Urata Y, Okita K, Korenaga K, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. The effect of supplementation with branched-chain amino acids in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 2007;37(7):510-6.
63. Isobe Y, Yamasaki T, Yokoyama Y, Kurokawa F, Hino K, Sakaida I. Hepatocellular carcinoma developing six and a half years after a diagnosis of idiopathic portal hypertension. *J Gastroenterol.* 2007;42(5):407-9.
64. Aoyama K, Tsuchiya M, Mori K, Kubo Y, Shiraishi K, Sakaguchi E, Yamashita S, Sakaida I. Effect of a late evening snack on outpatients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 2007 ;37(8):608-14.
65. Harada K, Higaki S, Amano A, Hashimoto K, Hashimoto S, Gondo T, Sakaida I. A reduced COX-2 expression and a reduced number of pericryptal myofibroblasts are associated with depressed adenoma of the colon. *Oncol Rep.* 2007;17(6):1353-8.
66. Terai S, Matsumoto T, Sakaida I. [Candidate drugs for non-alcoholic steatohepatitis (NASH)]. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2007;129(4):271-5. Review. Japanese.
67. Mikuriya K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Fujimoto M, Mori S, Oka M, Hamano K, Okita K, Sakaida I. Nakamura K. Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two-dimensional electrophoresis and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *Int J Oncol.* 2007;30(4):849-55.
68. Iizuka N, Sakaida I. Moribe T, Fujita N, Miura T, Stark M, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Elevated levels of circulating cell-free DNA in the blood of patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2006;26(6C):4713-9.
69. Hashimoto S, Higaki S, Amano A, Harada K, Nishikawa J, Yoshida T, Okita K, Sakaida I. Relationship between molecular markers and endoscopic findings in laterally spreading tumors. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(1):30-6.
70. Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Murata T, Mizunaga Y, Yamamoto N, Nishina H, Shinoda K, Sakaida I. Administration of fibroblast growth factor 2 in combination with bone marrow transplantation synergistically improves carbon-tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Cell Tissue Res.* 2007;327(3):463-70.

71. Higaki S, Nakano K, Onaka S, Amano A, Tanioka Y, Harada K, Hashimoto S, Sakaida I, Okita K. Clinical significance of measuring blood coagulation factor XIIIa regularly and continuously in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(9):1407-11.
72. Sakaida I, Terai S, Okita K. Use of bone marrow cells for the development of cellular therapy in liver diseases. *Hepatol Res*. 2005;31(4):195-6.
73. Sakaida I. Bone marrow cell as a source of hepatic stem cell. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi*. 2006;103(6):607-14. Review. Japanese.
74. Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*. 2006;24(10):2292-8.
75. Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Harada T, Fujimoto M, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Proteomic analysis of autoantibodies in patients with hepatocellular carcinoma. *Proteomics*. 2006;6(13):3894-900.
76. Furutani T, Hino K, Okuda M, Gondo T, Nishina S, Kitase A, Korenaga M, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM, Sakaida I, Okita K. Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology*. 2006;130(7):2087-98.
77. Kuramitsu Y, Harada T, Takashima M, Yokoyama Y, Hidaka I, Iizuka N, Toda T, Fujimoto M, Zhang X, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Increased expression and phosphorylation of liver glutamine synthetase in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus. *Electrophoresis*. 2006;27(8):1651-8.
78. Yokoyama Y, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Urata Y, Marumoto Y, Nishina H, Nakamura K, Okita K, Sakaida I. Proteomic analysis of serum marker proteins in recipient mice with liver cirrhosis after bone marrow cell transplantation. *Proteomics*. 2006;6(8):2564-70.
79. Sakaida I. Clinical application of bone marrow cell transplantation for liver diseases. *J Gastroenterol*. 2006;41(1):93-4.
80. Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Terai S, Oka M, Nakamura K, Okita K, Sakaida I. Protein level of apolipoprotein E increased in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 2006;28(3):625-31.
81. Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol*. 2005;38(4):197-202. Review.
82. Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Sakaida I, Murata T, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res*. 2006;323(2):221-31.
83. Sakaida I, Okita K. The role of oxidative stress in NASH and fatty liver model. *Hepatol Res*. 2005;33(2):128-31.
84. Sakaida I, Kawaguchi K, Kimura T, Tamura F, Okita K. D-Penicillamine improved

laparoscopic and histological findings of the liver in a patient with Wilson's disease: 3-year follow-up after diagnosis of Coombs-negative hemolytic anemia of Wilson's disease. *J Gastroenterol.* 2005;40(6):646-51.

85. Terai S, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Lesson from the GFP/CCl4 model--translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2005;12(3):203-7.

86. Shen J, Sakaida I, Uchida K, Terai S, Okita K. Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci.* 2005;77(13):1502-15.

87. Ishikawa T, Yamasaki T, Isobe Y, Sakaida I, Kurokawa F, Okita K, Kimura T. Rupture of peritoneal metastatic tumor that developed due to needle-tract implantation of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2005;40(5):547-8.

88. Takami T, Terai S, Yokoyama Y, Tanimoto H, Tajima K, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I, Nishina H, Thorgeirsson SS, Okita K. Human homologue of maid is a useful marker protein in hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology.* 2005;128(5):1369-80.

89. Jin H, Sakaida I, Tsuchiya M, Okita K. Herbal medicine Rhei rhizome prevents liver fibrosis in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Life Sci.* 2005;76(24):2805-16.

90. Sakaida I, Kimura T, Yamasaki T, Fukumoto Y, Watanabe K, Aoyama M, Okita K. Cytochrome c is a possible new marker for fulminant hepatitis in humans. *J Gastroenterol.* 2005;40(2):179-8574

91. Yamasaki T, Kimura T, Kurokawa F, Aoyama K, Ishikawa T, Tajima K, Yokoyama Y, Takami T, Omori K, Kawaguchi K, Tsuchiya M, Terai S, Sakaida I, Okita K. Percutaneous radiofrequency ablation with cooled electrodes combined with hepatic arterial balloon occlusion in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2005;40(2):171-8.

92. Tsuchiya M, Sakaida I, Okamoto M, Okita K. The effect of a late evening snack in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 2005;31(2):95-103.

93. Yamasaki T, Kimura T, Kurokawa F, Aoyama K, Ishikawa T, Tajima K, Yokoyama Y, Takami T, Omori K, Kawaguchi K, Tsuchiya M, Terai S, Sakaida I, Okita K. Prognostic factors in patients with advanced hepatocellular carcinoma receiving hepatic arterial infusion chemotherapy. *J Gastroenterol.* 2005;40(1):70-8.

94. Sakaida I, Tsuchiya M, Okamoto M, Okita K. Late evening snack and the change of blood glucose level in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 2004;30S:67-72.

95. Omori K, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Sakaida I, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett.* 2004;578(1-2):10-20.

96. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology.*

2004;40(6):1304-11.

97. Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics*. 2004;4(7):2111-6.

98. Sakaida I, Murakami F, Okita K. Acute iron intoxication. *Vet Hum Toxicol*. 2004;46(3):158-9.

99. Mori S, Yamasaki T, Sakaida I, Takami T, Sakaguchi E, Kimura T, Kurokawa F, Maeyama S, Okita K. Hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol*. 2004;39(4):391-6. Review.

100. Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(1):187-95.

101. Sakaida I, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Yamasaki T, Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. *Life Sci*. 2004;74(18):2251-63.

102. Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada T, Sakaida I, Nishina H, Okita K. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(4):1110-8.

#### (特許関連)

103. 寺井 崇二、高見 太郎、坂井田 功、沖田 極

特許出願 2004-267065 新規肝細胞癌の腫瘍マーカー抗 HHMIgG の発見 (平成 16 年 9 月 14 日)  
肝細胞癌の新規腫瘍マーカーとしての機能を有する抗 HHM IgG 抗体、肝癌のスクリーニング法および肝癌進行マーカーとしての利用 (特許第 4465467 号) (平成 22 年 3 月 5 日)

課題番号 H21-肝炎-一般-014

## 骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復(抗線維化)療法の開発研究

研究代表者: 山口大学 坂井田 功  
 分担研究者: 東京大学 宮島 篤  
 東京医科歯科大学 小川佳宏・仁科博史  
 山形大学 河田純男・斉藤貴文  
 金沢大学 酒井佳夫  
 信州大学 梅村武司  
 国立国際医療研究センター 大河内仁志  
 山口大学 寺井崇二

Yamaguchi University School of Medicine  
 Since 2006 First Department of Internal Medicine

### 肝硬変治療の現状 GUCHI UNIVERSITY

慢性肝炎(350万人) → 肝硬変(30万人)

- 肝硬変は不治の病
- 肝がんに移行
- 年間5万人が肝不全死亡
- 肝硬変の根治治療: 肝移植のみ

問題点

- ドナー不足
- 免疫拒絶
- 高額医療費(2-4千万円)(総額0.6-1.2兆円)

臓器移植を伴わない肝再生治療法

3カ月後 ABM/療法開発 2006

肝機能改善

血清アルブミン値 (g/dL)

通常治療

### 概要

自己骨髄細胞投与(autologous bone marrow cell infusion: ABM/)療法 主要特許・特許公開2003-70377・特許特種2007-089532

診断と治療(適応) 投与 投与 投与

## C型肝硬変以外の肝硬変への適応拡大

↓

低侵襲・次世代型細胞治療法の開発

↓

有効細胞分画の同定  
 培養法の確立  
 有効性・安全性評価

安全性評価 適応患者の大幅な拡大

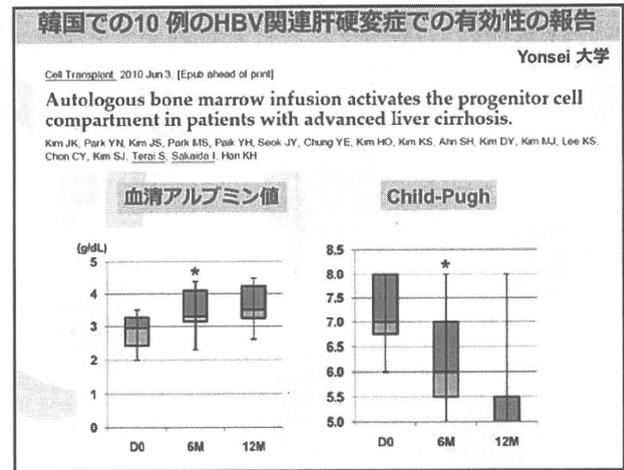
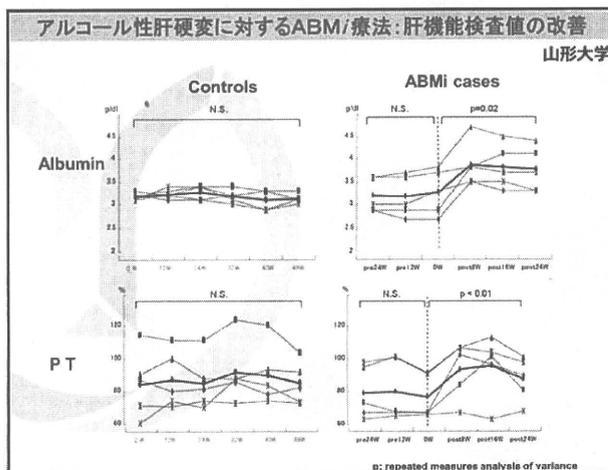
### 研究組織

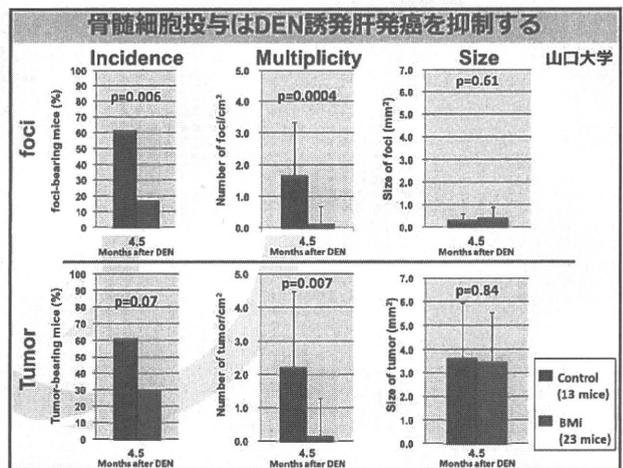
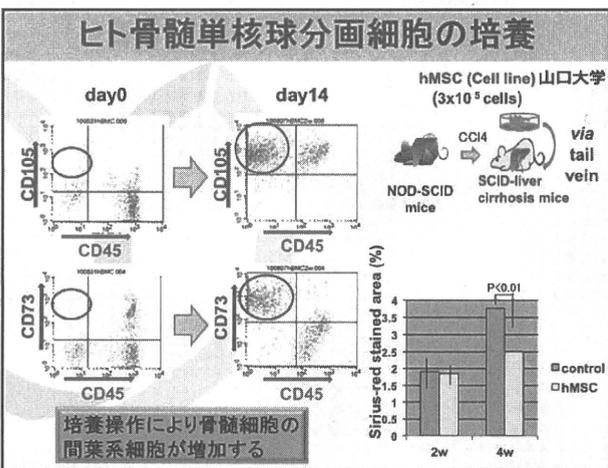
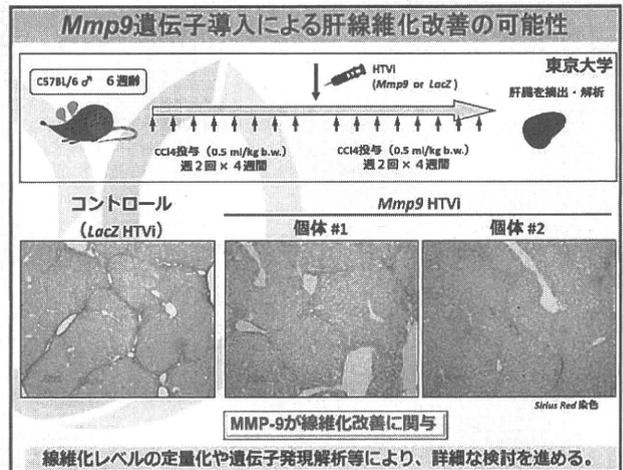
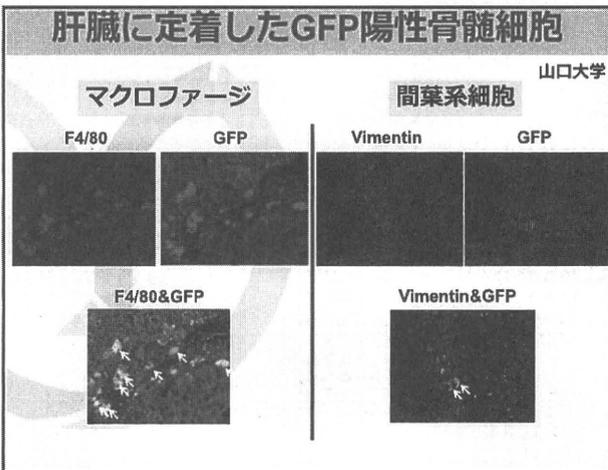
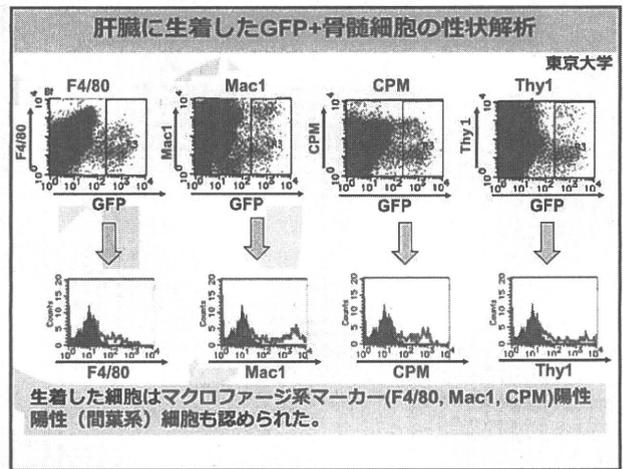
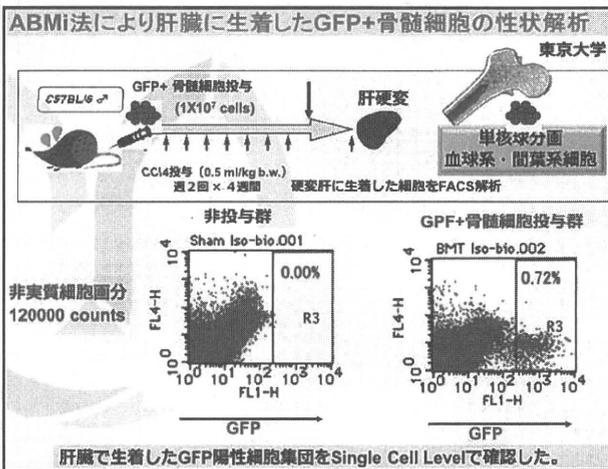
骨髄細胞を用いた再生修復細胞療法

- 臨床応用拡大: アルコール性肝硬変症に対するABM療法 (山形大学)
- 基礎研究: 有効細胞の分画同定 抗線維化メカニズムの解析 (東京大学)
- 骨髄由来細胞分離培養法確立 安全性評価 (山口大学)
- 骨髄由来細胞のウイルス解析 (信州大学)

脂肪由来細胞を用いた再生修復細胞療法

- 基礎研究: 脂肪由来細胞を用いた細胞療法の開発 (国立国際医療研究センター) (金沢大学)
- 新たな対象肝疾患への適応拡大: NASHモデルマウス解析 (東京医科歯科大学)

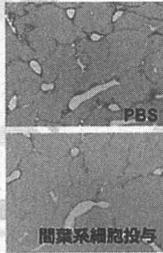




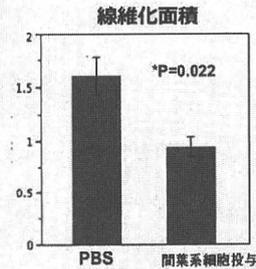
肝硬変モデルマウスに対する脂肪組織由来細胞の効果

マウス: C57/B6 8W オス  
 肝硬変誘導: 1ml/kg of CCl<sub>4</sub> 週2回 8週間 腹腔内投与  
 投与細胞: マウスソケイ部の脂肪組織から得た新鮮な間葉系細胞150万個を200ulのHBSSに入れ、尾静脈から注入。対照群はPBS。N=4  
 細胞投与4週間後に犠死させ、組織学的検査。

国立国際医療センター  
 金沢大学



Sirius-red 染色



メラノコルチン4型受容体 (MC4R)欠損マウス

東京医科歯科大学

MC4R: Melanocortin-4 Receptor

主に視床下部に発現し、食欲抑制・エネルギー消費亢進に重要

MC4R knockout mice (MC4R-KO)

ヒト肥満症患者と共通の表現型

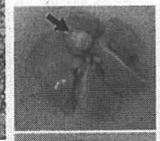
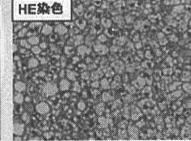
- ・過食による肥満
- ・インスリン抵抗性
- ・高コレステロール血症
- ・高レプチン血症
- ・低アディポネクチン血症

+

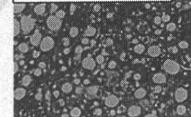
肝臓における表現型

- ・NASHに合致する組織像
- ・小葉内炎症細胞浸潤
- ・肝細胞風船様変性
- ・肝細胞周囲性線維化

HE染色



Masson trichrome染色



全個体に腫瘍形成

(in submission)

YAMAGUCHI UNIVERSITY

結果

- ・自己骨髄細胞投与療法の臨床適応を拡大した。
- ・硬変肝内には、マクロファージ系細胞と間葉系細胞が浸潤していた。
- ・MMP-9が肝線維化改善に関与している。
- ・ヒト骨髄細胞(単核球分画)を培養すると間葉系細胞が主に増殖した。
- ・培養骨髄間葉系細胞にも線維化改善効果を確認した。
- ・少なくとも発癌促進作用は認めなかった。
- ・脂肪組織由来の骨髄間葉系細胞にも線維化改善効果の可能性が示された。
- ・新しいNASHモデルの開発に成功した。

課題

- ・肝機能改善効果に対するマクロファージ系細胞の役割の解明。
- ・骨髄細胞への肝炎ウイルス感染の有無の解明。
- ・培養骨髄細胞の無血清培養と安全性評価。
- ・NASH肝硬変での培養骨髄細胞の有効性の評価。
- ・治療用の細胞規格の決定。

## 平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題： 肝がんの新規治療法に関する研究  
 課題番号： H21-肝炎-一般-015  
 予定期間： H21 年度から H23 年度まで  
 研究代表者： 本多 政夫  
 所属研究機関： 金沢大学  
 所属部局： 医薬保健研究域保健学系  
 職 名： 教授  
 年次別研究費(交付決定額)：1 年目 68,640,000 円 2 年目 68,640,000 円

**I. 研究の意義**

- (1) 肝がんはウイルス性慢性肝炎の病態の一つであり、我が国の肝がんによる年間死亡数は 3 万人を超えている。
- (2) 分子標的薬ソラフェニブが進行肝がん初めて使用され、非環式レチノイドや多くの新規分子標的薬、抗がん剤が国内第Ⅲ相臨床試験に至るに及び、進行肝がんの治療法の選択肢が増えた。これらの新規抗がん剤の治療効果と副作用の見極めが重要であり、これまでの治療法との使い分けが重要となった。
- (3) 現行の薬剤だけで肝がんを治癒することは困難であり新規治療法に関する研究を行う必要がある。

**II. 研究の目的、期待される成果**

- (1) 我が国におけるソラフェニブや新規抗がん剤であるミプラチンの治療成績を明らかにし、懸念される副作用の現状を調査する。また、現行の肝動注化学療法との効果を比較する事により、適切な治療法の選択を可能にする。
- (2) ソラフェニブや非環式レチノイドをはじめとする分子標的薬は、治療効果の有無をバイオマーカーを用いて判別できる可能性がある。有効なバイオマーカーの検索を行う。
- (3) がん幹細胞治療、免疫療法といった新規の治療法を開発する。
- (4) 肝がんは肝炎ウイルス感染症の終末像であり、肝がんを治癒あるいは制御することによって患者が通常の社会生活をおくることができ、社会への貢献も大きい。

**III. 2 年間の研究成果****・研究代表者(本多政夫)**

全体研究として新規抗がん剤治療効果ならびに安全性調査を行った。ソラフェニブが投与された進行性肝がん症例約 300 例の各施設からのエントリーが得られ、治療効果、安全性、有害事象及び副作用の検討を行った。また、新規抗がん剤である肝動注肝がん治療薬ミプラチンについても同様に約 450 例を集積し、治療効果、安全性、有害事象及び副作用の検討を行った。これらの解析結果を基に治療適応、中止基準を含めた新規抗がん剤使用に関するガイドラインの作成を行う。

個別研究として肝特異的血小板由来増殖因子(PDGF-C)過剰発現マウスに対する非環式レチノイドの肝線維化抑制機序・肝発がん抑制機序の解析を行った。非環式レチノイドにより、PDGF レセプターの発現抑制、肝星細胞の不活性化、血管新生抑制及び Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の抑制が認められた。また非環式レチノイドの肝がん二次発がん抑制を目的とした国内第 II/III 相試験における薬物動態試験において、投与前と投与 8 週後の肝生検組織の遺伝子発現プロファイリングを行い投与 8 週後では再発群と非再発群では遺伝子発現パターンが異なることが明らかとなった。非環式レチノイドの治療反応性を分ける遺伝子が明らかとなった。

**・研究分担者(金子周一)**

肝幹細胞マーカーである EpCAM と AFP を用いた新たな肝がん分類システムを構築し、EpCAM 陽性 AFP 陽性肝がん(幹細胞様)は若年発症、門脈腫瘍浸潤、予後不良であることを明らかにした。肝細胞分化を誘導するサイトカイン Oncostatin M (OSM)を用いてがん幹細胞の分化誘導療法の可能性を検討した。OSM 投与によって EpCAM 陽性がん幹細胞の減少、Albumin 陽性細胞の増加を認め、OSM と 5-FU を組み合わせることで有意な腫瘍増殖抑制効果を *in vitro* 及び *in vivo* で認めた。抗がん剤に抵抗性を示すがん幹細胞に対する新たな治療法の可能性を示した。

**・研究分担者(中本安成)**

肝がんの局所療法と併用して二次発がん(再発)を抑制する治療法として、肝動脈塞栓療法(TAE)と同時に各種の樹状細胞を投与する安全性臨床研究を行った。治療後 12 カ月以内の再発率は、樹状細胞を OK-432 で刺激した群において有意に低下した。OK432 刺激群では IL-9、IL-15、TNF $\alpha$  が上昇し、血清アルギナーゼ活性が治療後低下傾向を示し、骨髄由来抑制細胞の低下が示唆された。肝がんに対するTAEと併用する樹状細胞は、二次

発がんの抑制効果を発揮する可能性が示唆された。

•研究分担者(恩地森一)

愛媛大学医学部附属病院に設立された GMP レベル細胞プロセッシングセンターを利用して、新たな第 I/II 相の臨床研究を開始した。進行肝がん症例5例からアフレーシスにて末梢血単核球を単離し、サイトカイン誘導下に DC を誘導した。その後、腫瘍抗原パルス DC を作成して患者の皮下に投与した。全例で重篤な副作用はみられず、安全性が確認された。

•研究分担者(汐田剛史)

hTERT mRNA 高発現株とし HepG2 を、低発現株として Hep3B 及び PLC/PRF/5 を決定した。転写開始点より上流 5 kbp のゲノム DNA を含む hTERT プロモーター下に EGFP を安定に発現する Hep3B 及び HepG2 由来細胞株を作成した。リボザイムスクリーニングを行い、hTERT 発現制御遺伝子の同定を行う。

•研究分担者(横須賀収)

進行肝がん患者を対象とした TS-1+ソラフェニブ併用療法の第 I 相試験を行った。試験デザインは 3 on 3 cohort study で 1cycle は 3 週間とし、投与方法はソラフェニブ連日投与、TS-1 は 2 週投与 1 週休薬とした。主要評価項目は 1cycle での用量制限毒性(Dose limiting toxicity:DLT)の発現率とした。2010 年 11 月末時点で、Cohort 1 を DLT 発現率 1/6 例、Cohort 2 を 0/3 例で通過し、Cohort 3 (ソラフェニブ 800mg 連日投与+TS-1 80%用量を 2 週投与 1 週休薬)が進行中である。すでに Cohort 3 の症例登録は完了し、試験継続中である。

•研究分担者(坂井田功)

肝細胞の発生を制御する HHM(Human Homologue of Maid, HHM)をクローニングし Maid 分子の肝発生、分化の重要性を明らかにしてきた。Maid KO マウスに四塩化炭素投与を行ったところ線維化がより誘導されることが明らかになった。Maid が肝線維化進展、肝発がんの両方を制御する分子である可能性が明らかになった。

•研究分担者(竹原徹郎)

マウスに  $\alpha$ -GalCer を投与することにより、肝臓内の樹状細胞(DC)が効率的に活性化され、高い獲得免疫応答が誘導されることを示した。肝臓は DC や NKT 細胞の活性化によるがん免疫治療効果が得られやすい臓器であることを示した。また肝臓で高発現する Bcl-xL に対する特異的阻害剤 ABT-737 を用いた臨床研究を行った。肝がん細胞株にアポトーシスを誘導するためには高濃度の ABT-737 が必要であり、この治療抵抗性に Mcl-1 の誘導的発現が関与していることが示された。ABT-737 と Mcl-1 阻害剤の併用が肝がんに対する有望な治療法であることが明らかとなった。

•研究分担者(古瀬純司)

ソラフェニブの使用に際し、実際の臨床では Child-Pugh B の軽度肝機能低下例も適応となる症例も多く、Child-Pugh A および B を含めた患者でのソラフェニブの安全性や有効性を多数例で評価する必要がある。Child-Pugh score 5-8 点の肝がん患者を対象とし、試験を実施し、現在 14 施設が登録可能となった。平成 22 年 4 月から登録が開始され、11 月現在、Child-Pugh A 17例、B 1例が登録されている。今後、さらに試験を継続する。

•研究分担者(上野義之)

肝硬変で出現するアミノ酸不均衡が免疫機構に与える影響について解析し、進行した肝硬変患者に出現する L-シスチン(L-Cys) / L-グルタミン酸(L-Glu) 不均衡に注目し免疫細胞(単球)に与える影響を解析した。肝硬変で出現する L-Cys、L-Glu の不均衡は CD14+単球の機能・数に L-Cys / L-Glu 交換輸送体 xCT を介して関与している可能性が示唆された。

•研究分担者(廣石和正)

肝がんにおいて高頻度に発現する MAGE-1 抗原、Glypican-3 抗原、NY-ESO-1 抗原に対する腫瘍特異性細胞応答と患者の臨床経過との関連を検討し、肝がんに対する免疫応答が臨床経過に及ぼす影響を考察した。特定の肝がん特異的細胞障害性 T 細胞応答が、肝がんを抑制できる可能性も示唆された。

•研究分担者(西口修平)

IFN の抗腫瘍効果に関して *in vitro* および *in vivo* で検討を行った。IFN の作用機序に関して、肝がん細胞の増殖抑制に加え血管新生抑制が関与する可能性、また IFN が Sorafenib の効果を増強させる可能性を明らかにした。

•研究分担者(工藤正俊)

進行肝細胞癌に対するソラフェニブと低用量シスプラチン/フルオロウラシル肝動注療法の併用化学療法の第 I / II 相臨床試験を倫理委員会の承認を受けて開始した。

•研究分担者(森脇久隆)

非環式レチノイドが核内受容体 RXR $\cdot$ の異常リン酸化修飾を解除しその機能を回復することで、肥満に関連したマウスの肝発がんを抑制することを明らかにした。さらに脂質や糖代謝を制御する核内受容体 FXR の agonist と非環式レチノイドを併用することで、肝がん細胞にアポトーシスの誘導と相乗的な増殖抑制が起きることを確認した。

•研究分担者(山本和秀)

DCPは、KDRを介して血管新生を亢進させ、肝がん患者組織における検討でDCP発現と血管新生を示すCD31発現に相関関係があることを明らかにした。マウスモデルの検討では、 $\Delta 2$ -GGCX 遺伝子導入 Hep3B(DCP 産生)は、血管新生に富む腫瘍を形成し、ソラフェニブ、スニチニブによる腫瘍縮小率は、 $\Delta 2$ -GGCX Hep3B において大きく、薬剤効果の発現にDCPが関与していることが示唆された。

•研究分担者(池田健次)

肝がん患者におけるセルサーチシステムによる血液中の循環がん細胞(CTC)検出の有効性を検討し、肝外転移を有する肝がん転移15例中CTC陽性は8例(53.3%)、陰性は7例(46.7%)であった。対照群の17例では全例CTC陰性であった。また新規抗がん剤ミプラチンの治療効果を検討し、動注治療3カ月後の効果判定ではTE4が23例、TE3が26例(奏効率55%)で、重大な副作用はなかった。初回治療例の奏効率が良好(81% P=0.0014)であった。

•研究分担者(佐田通夫)

単施設におけるリピオドール混和シスプラチンと5-FU併用動注化学療法(NFP)の治療効果を評価し、51例の切除不能肝がん症例に対する治療成績はCR10例、PR34例で、平均生存期間は33カ月であった。また、多施設間におけるNFP療法の治療効果を検討し、52例の切除不能肝がん症例に対する治療成績はCR10例、PR29例、SD11例、PD2例、平均生存期間は27カ月、腫瘍の無増悪期間は8.5カ月であった。重篤な副作用は少なく、NFP療法の高度進行肝がんに対する有効性が示唆された。

#### IV. 23年度の課題

- (1) ソラフェニブ及び新規抗がん剤ミプラチンの治療成績を明らかにし、懸念される副作用の現状をまとめ、適正な使用に関する具体的なガイドラインを作成する。
- (2) 非環式レチノイド、インターフェロン及び新規分子標的薬の抗腫瘍効果の分子機序を明らかにし、併用療法の有効性を検討する。
- (3) 肝がん幹細胞関連分子の解析とがん幹細胞の抗がん剤体制機序の解明、分化誘導療法によるがん幹細胞の抗がん剤感受性亢進のメカニズムを明らかにする。がん幹細胞の抗原エピトープを用いた樹状細胞を免疫療法の可能性を検討する。
- (4) 分子標的薬や化学療法の治療効果を予測する分子マーカーを探索する。

#### V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 進行肝臓癌に対する化学療法、分子標的薬の使用に関するガイドラインを作成する。
- (2) 肝がんは肝炎ウイルス感染症の終末像であり、肝がんを治癒あるいは制御することによってウイルス感染症がもたらす社会的問題を撲滅できる。患者が通常の世界生活をおくることができることから、社会への貢献も大きい。

#### VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等) (論文229編より抜粋)

研究代表者:

1. Honda M, Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2010 Nov;53(5):817-26.
2. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010 Aug;139(2):499-509.
3. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La Protein Required for Internal Ribosome Entry Site-Directed Translation Is a Potential Therapeutic Target for Hepatitis C Virus Replication. *J Infect Dis* 202(1):75-85, 2010 Jul.
4. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009 Oct;41(10):1105-9
5. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009 Apr;49(4):1098-112.

金子周一:

1. H Misu, T Takamura, H Takayama, H Hayashi, N Matsuzawa-Nagata, S Kurita, K Ishikura, H Ando, Y Takeshita, T Ota, M Sakurai, T Yamashita, E Mizukoshi, T Yamashita, M Honda, K Miyamoto, T Kubota, N Kubota, T Kadowaki, HJ Kim, IK Lee, Y Minokoshi, Y Saito, K Takahashi, Y Yamada, N Takakura, S Kaneko. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab* 12(5):483-95, 2010 Nov.
2. N Iida, Y Nakamoto, T Baba, H Nakagawa, E Mizukoshi, M Naito, N Mukaida, S Kaneko. Antitumor Effect after Radiofrequency Ablation of Murine Hepatoma Is Augmented by an Active Variant of CC Chemokine Ligand 3/Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ . *Cancer Res* 70(16):6556-65, 2010 Aug.
3. Y Wu, Y Y Wang, Y Nakamoto, Y-Y Li, T Baba, S Kaneko, C Fujii, N Mukaida. Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in the liver. *Oncogene* 29(15):2228-37, 2010 Apr.
4. T Yamashita, J Ji, A Budhu, M Farges, W Yang, HY Wang, H Jia, Q Ye, LX Qin, E Wauthier, LM Reid, H Minato, M Honda, S Kaneko, ZY Tang, XW Wang. EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features. *Gastroenterology* 136(3):1012-1024, 2009.

5. T Yamashita, M Honda, H Takatori, R Nishino, H Minato, H Takamura, T Ohta, and S Kaneko. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatology* 50(1):100-110, 2009.

中本安成:

1. Baba T, Nakamoto Y and Mukaida N: Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J. Immunol.* 183: 3053-3063, 2009.
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* 126: 2164-2174, 2010.
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.* 468: 1373-1383, 2010.
4. 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 and Kaneko S: Prolonged recurrence-free survival following ok432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin. Exp. Immunol.* 2010 [Epub ahead of print].
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 (in press).

恩地森一:

1. Akbar SM, Onji M. et al. Immune modulator and antiviral potential of dendritic cells pulsed with both hepatitis B surface antigen and core antigen for treating chronic HBV infection. *Antivir Ther.* 2010; 15(6): 887-95.
2. Hirooka M, Onji M. et al. Mass reduction by radiofrequency ablation before hepatic arterial infusion chemotherapy improved prognosis for patients with huge hepatocellular carcinoma and portal vein thrombus. *AJR Am J Roentgenol.* 2010; 194(2):W221-6.
3. Tamura Y, Onji M. et al. Fucosylated fraction of alpha-fetoprotein as a predictor of prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative treatment. *Dig Dis Sci.* 2010; 55(7): 2095-101.
4. Uehara T, Onji M. et al. Usefulness of the hyperechoic rim for assessing the therapeutic efficacy of radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatol Res.* 2009; 39(10): 954-62.

横須賀收:

1. Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, Iwama A. Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both Ink4a/Arf-dependent and -independent manners in mice. *Hepatology.* 2010 Sep;52(3):1111-23.
2. Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, Iwama A. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective. *Cancer Lett.* 2009 Dec 28;286(2):145-53.
3. Yonemitsu Y, Imazeki F, Chiba T, Fukai K, Nagai Y, Miyagi S, Arai M, Aoki R, Miyazaki M, Nakatani Y, Iwama A, Yokosuka O. Distinct expression of polycomb group proteins EZH2 and BMI1 in hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol.* 2009 Sep;40(9):1304-11.

坂井田功:

1. Matsumoto T, Terai S, Oishi T, Kuwashiro S, Fujisawa K, Yamamoto N, Fujita Y, Hamamoto Y, Furutani-Seiki M, Nishina H, Sakaida I. Medaka as a model for human nonalcoholic steatohepatitis. *Dis Model Mech* 2010; 3: 431-40.
2. Negishi T, Nagai Y, Asaoka Y, Sakaida I, et al. Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka. *Hepatology* 2010; 51: 1037-45.
3. Ishigaki N, Yamamoto N, Jin H, Uchida K, Terai S, Sakaida I. Continuous intravenous infusion of atrial natriuretic peptide (ANP) prevented liver fibrosis in rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;378: 354-9.
4. Marumoto Y, Terai S, Urata Y, Matsumoto T, Mizunaga Y, Yamamoto N, Jin H, Fujisawa K, Murata T, Shinoda K, Nishina H, Sakaida I. Continuous high expression of XBP1 and GRP78 is important for the survival of bone marrow cells in CCl4-treated cirrhotic liver. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 14: 546-52.

竹原徹郎:

1. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 69: 8050-8057, 2009. [2009 Oct 15;69(20):8050-7. Epub 2009 Oct 13.]
2. Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hennighausen L, Yin XM, Hayashi N. BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. *Hepatology* 50: 1972-1980, 2009. [2009 Dec;50(6):1972-80.]
3. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ishida H, Miyagi T, Hosui A, Hayashi N. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. *Hepatology* 51: 1264-1273, 2010. [2010 Apr;51(4):1264-73.]
4. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Wei Li, 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. [2010 Jun;138(7):2487-98, 2498.e1-7. Epub 2010 Mar 2.]
5. 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. [2010 Oct;52(4):1310-21.]

古瀬純司:

1. Yeo W, Chen PJ, Furuse J, Han KH, Hsu C, Lim HY, Moon H, Qin S, Yeoh EM, Ye SL. Eastern Asian expert panel opinion: designing clinical trials of molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2010;10(1):620.
2. Furuse J, Okusaka T, Kaneko S, Kudo M, Nakachi K, Ueno H, Yamashita T, Ueshima K. Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and efficacy of S-1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2010;101(12):2606-2611.
3. Kudo M, Kubo S, Takayasu K, Sakamoto M, Tanaka M, Ikai I, Furuse J, Nakamura K, Makuuchi M; for The Liver Cancer Study Group of Japan (Committee for Response Evaluation Criteria in Cancer of the Liver, Liver Cancer Study Group of Japan). Response Evaluation Criteria in Cancer of the Liver (RECICL) proposed by the Liver Cancer Study Group of Japan (2009 Revised Version). *Hepatol Res* 2010;40(7):686-692.
4. Chen PJ, Furuse J, Han KH, Hsu C, Lim HY, Moon H, Qin S, Ye SL, Yeoh EM, Yeo W. Issues and controversies of hepatocellular carcinoma-targeted therapy clinical trials in Asia: experts' opinion. *Liver Int* 2010;30(10):1427-1438

上野義之:

1. Kondo Y, Ueno Y, Kobayashi K, Kakazu E, Shiina M, Inoue J, Tamai K, Wakui Y, Tanaka Y, Ninomiya M, Obara N, Fukushima K, Ishii M,