

Hippo pathway による肝臓のサイズと発癌の制御

The Hippo Pathway in Liver Size Control and Cancer Development

梶 星治, 宮村憲央, 仁科博史

Shoji Hata, Norio Miyamura, Hiroshi Nishina

哺乳動物の器官サイズを制御するメカニズムは、長年多くの研究者の興味の対象であったが、その実体はほとんど明らかになっていなかった。数ある器官の中でも、肝臓はサイズ制御を受けている再生能の高い器官であることが知られている。近年、ショウジョウバエにおいて同定された器官サイズを制御するHippo pathwayが、哺乳動物の肝臓においてもサイズ制御機構を担っていることが明らかとなった。さらに、Hippo pathwayの破綻は肝癌の発症につながることも見いだされ、この分野の急速な理解が進んでいる。本稿では、肝臓におけるHippo pathwayの最新の知見を紹介する。



Hippo pathway, 器官サイズ, 肝癌

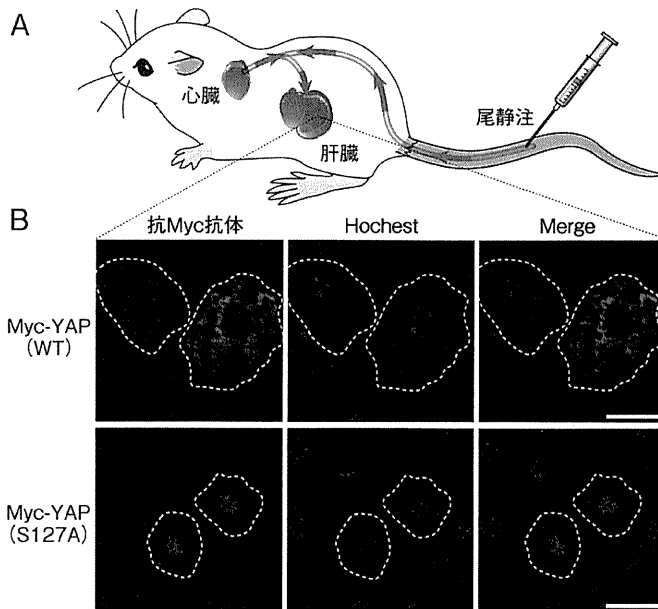
はじめに

肝臓は、哺乳動物において体内最大重量をなす実質臓器であり、エネルギー代謝の中核的な役割をはじめ、有害物質の解毒や胆汁の産生など、個体の恒常性の維持に必須の機能を担っている。代謝能や胆汁の産生などの主要な肝機能を担っているのは肝実質細胞であり、肝臓全体の約70%を占めている。残りの約30%は、胆管上皮細胞、類洞内皮細胞、肝星細胞、クッパー細胞などの非実質細胞によって構成されている。肝実質細胞は高い増殖能を有する細胞であるが、通常は細胞周期でいう休止期(G0)の状態にあり、ほとんど増殖していない¹⁾。

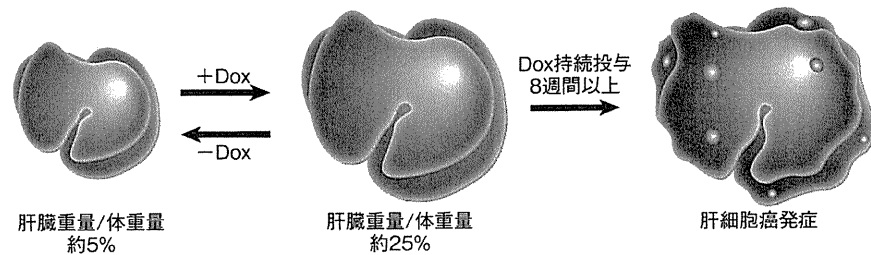
肝臓は腸から取り込まれた様々な物質が血流に乗って到達する最初の臓器であるため、栄養素などと共に含まれる有害物質や細菌などにより障害を受けやすい。このため、肝臓は高い再生能を有していると考えられている。マウスやラットにおいて肝臓を70%近く切除すると、肝実質細胞や非実質細胞の増殖が誘導され、1週間ほどで肝臓はほぼ元の大きさにまで回復する。また、生体部分肝移植されたドナーの肝臓は、ドナー本来のサイズではなくレシピエントに適したサイズにまで増大することが知られている。このように肝臓は、個体の恒常性維持に十分な肝機能を発揮できるサイズを保てるように、常にサイズ制御を受けている器官である。

I 肝臓におけるHippo pathwayの恒常的な活性化

肝臓のサイズを一定に保つために、サイズ制御機構は恒常的に機能していると考えられる。2003年から2005年にかけて



■ 図1 肝臓におけるHippo pathway 依存的なYAPの細胞内局在制御
A: HTVi法の概略図。マウスの尾静脈からプラスミドを含む2mlの溶液を5~7秒で注入する。心臓で許容できなくなった溶液は後大静脈と肝静脈を逆流して肝臓へ流入し、その圧力でプラスミドが取り込まれる。
B: 肝実質細胞に発現する外来YAPの細胞内局在。赤色はMyc-YAP、青色は核を示す。スケールバーは20 μm。



■図2 YAP過剰発現による肝臓サイズの増大と肝癌の発症

Dox依存的にYAPを過剰発現するトランスジェニックマウスの肝臓。通常は約5%の肝臓重量比がDoxの投与により約25%にまで増加するが、Doxの投与を中止すると元に戻る。Doxを8週間以上の長期間投与すると肝細胞癌を発症する。

て、ショウジョウバエにおいて器官サイズを制御するシグナル系としてHippo pathwayが同定された。近年、このHippo pathwayが肝臓のサイズ制御機構を担うことが、以下に示すように明らかになりつつある。Hippo pathwayは転写共役因子YAP (yes-associated protein) のSer127をリン酸化することでYAPを細胞質に局在化させて核内移行を抑制し、様々な遺伝子発現を負に制御することが知られている。そこで筆者らは、YAPの細胞内局在を指標に、Hippo pathwayが肝臓において恒常的に活性化しているかどうかについて検証を行った。HTVi (hydrodynamic tail vein injection) 法は、マウスの尾静脈からプラスミドを含む溶液を短時間に大量に注入することで、肝臓への遺伝子導入を簡便に行える方法である(図1A)。HTVi法により、Ser127をAlaに置換させたMyc-YAP (S127A)を肝実質細胞に発現させると、その局在は主に核に認められた。一方、Hippo pathwayによりSer127がリン酸化されるMyc-YAP (WT)は、主に細胞質への局在を示した(図1B)。この結果が示すように、肝臓はHippo pathwayが恒常的に活性化している器官である。

II YAP依存的な肝臓のサイズ増大と肝癌の発症

ショウジョウバエでHippo pathwayが同定されて以来、哺乳動物においても器官サイズ制御シグナルとして機能している可能性が考えられていたが、2007年に2つのグループがYAPを過剰発現させると肝臓のサイズが顕著に増大することを実証した^{2), 3)}。Dongらはドキシサイクリン(Dox)依存的に肝臓でYAPを過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作成し、成体マウスへのDox投与により、通常は全体重の約5%に維持されている肝臓重量比が、約25%にまで

増加することを見いだした(図2)。興味深いことに、肝臓が増大した後にDoxの投与を中止すると、元のサイズにまで戻ることが示された。このように、YAP依存的に肝臓のサイズが可逆的に変化することから、YAPの制御機構が肝臓のサイズ制御機構を担っていることが示唆された。また、8週間以上の長期間にわたりDoxを投与することで、肝細胞癌(hepatocellular carcinoma; HCC)を発症することも見いだされた。

YAPはヒトでもHCCの発症に寄与することが示唆されている。ヒトのHCCにおいて、YAP遺伝子座を含むゲノム領域の増幅や、YAPの発現亢進が複数のグループから報告されている^{2), 4), 5)}。さらに、YAPの発現亢進がHCCの悪性度と相関し、YAP陰性の場合と比較して、YAP陽性HCC患者の生存率は有意に低いことが示されている⁶⁾。これらの知見から、YAPは肝臓のサイズ制御に加えて、肝癌の発症においても重要な役割を担っていると考えられる。

III Hippo pathwayによる肝臓のサイズと発症の制御

2009年から2010年にかけて、Hippo pathwayの構成因子を肝臓特異的にノックアウト(KO)したマウスの解析結果が次々と報告され、いずれのマウスにおいても肝臓のサイズが増大し、肝癌を発症することが見いだされた(表1)。最初に報告されたのはHippo pathwayの主要構成因子であるMst1 (mammalian ste20-like kinase 1)とMst2に関する知見である。3つのグループによって作出されたMst1とMst2遺伝子の肝臓特異的ダブルノックアウト(Mst1/2 DKO)マウスは、いずれも肝臓のサイズが5倍程度まで増大し、3~6カ月ほどで肝癌を発症した^{7)~9)}。また、ZhouらはMst1^{-/-}Mst2^{+/-}

■表1 Hippo pathway 構成因子の遺伝子改変マウスの表現型

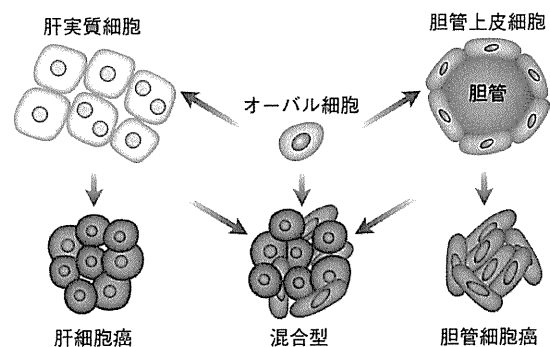
遺伝子	マウス	肝臓サイズの増大	肝臓癌	肝実質細胞の過増殖	オーバル細胞の過増殖	文献
Nf2 (Mer)	<i>Nf2</i> ^{+/-}	-	+	未記載	未記載	13
	<i>Alb-Cre Nf2</i> ^{fl/fl}	+	+	未記載	+	11
	<i>Alb-Cre Nf2</i> ^{fl/fl} <i>YAP</i> ^{fl/fl}	-	-	未記載	-	11
	<i>Alb-Cre Nf2</i> ^{fl/fl}	+	+	-	+	12
Sav1	<i>Sav</i> ^{+/-}	-	+	未記載	+	10
	<i>Alb-Cre Sav1</i> ^{fl/fl}	+	+	-	+	10
	<i>Alb-Cre Sav1</i> ^{fl/fl}	+	+	+	+	8
	<i>MMTV-Cre Sav1</i> ^{fl/fl}	未記載	+	未記載	未記載	8
	<i>CAGGS-CreER Sav1</i> ^{fl/fl}	未記載	+	未記載	未記載	8
Mst1/2	<i>Mst1</i> ^{-/-}	-	-	未記載	未記載	7
	<i>Mst2</i> ^{-/-}	-	-	未記載	未記載	7
	<i>Mst1</i> ^{-/-} <i>Mst2</i> ^{+/-} *1	+	+	未記載	+	7
	<i>Mst1</i> ^{+/-} <i>Mst2</i> ^{-/-} *2	+	+	未記載	未記載	7, 16
	<i>Alb-Cre Mst1</i> ^{-/-} <i>Mst2</i> ^{fl/fl}	+	+	+	未記載	7
	<i>Ad-Cre Mst1</i> ^{-/-} <i>Mst2</i> ^{fl/fl}	+	+	+	+	7, 16
	<i>Alb-Cre Mst1</i> ^{fl/fl} <i>Mst2</i> ^{fl/fl}	+	+	+	+	8
	<i>Alb-Cre Mst1</i> ^{-/-} <i>Mst2</i> ^{fl/fl}	+	未記載	+	未記載	9
<i>CAGGS-CreER Mst1</i> ^{-/-} <i>Mst2</i> ^{fl/fl}	+	+	+	+	9	
YAP	<i>Tg:ApoE/tTA</i>	+	+	+	未記載	2
	<i>Tg:LAP/tTA</i>	+	未記載	+	未記載	3

*1: Mst2のアレル欠失が生じると観察される。*2: Mst1のアレル欠失が生じると観察される。

マウスおよび *Mst1*^{+/-} *Mst2*^{-/-} マウスが7~15カ月ほどで肝癌を発症することを示し、これらの癌組織において、残っている *Mst2* または *Mst1* の野生型アレルが欠失していることを見いだした⁷⁾。このような結果から、*Mst1* と *Mst2* は肝癌の抑制に相補的に働くことが示唆された。Hippo pathway の主要構成因子であり足場タンパク質として機能する Sav1 (salvador1) の肝臓特異的 KO マウスにおいても、肝臓のサイズが増大し、肝癌を発症することが2つのグループにより報告された^{8), 10)}。しかし、このマウスが示す肝臓サイズの増大は野生型の1.5倍程度であり、肝癌の発症時期も12~14カ月と、肝臓特異的 *Mst1/2* DKO マウスよりも表現型は弱い。*NF2* (neurofibromatosis type 2) 遺伝子がコードする Mer (merlin) は上皮細胞のアピカル膜(頂端膜)の裏打ちタンパク質であり、Hippo pathway の上流の調節因子として機能する。2つのグループにより作出された肝臓特異的 *NF2* KO マウスも、肝臓のサイズが5倍程度増大し、7~12カ月ほどで肝癌を発症することが示されている^{11), 12)}。また、*NF2* は以前から癌抑制遺伝子として働くことが知られており、*NF2* のヘテロ接合性(アレルのDNA配列が違うこと)の消失(loss of heterozygosity: LOH)が生じたマウスは肝癌以外にも様々な種類の癌を発症することが知られている¹³⁾。

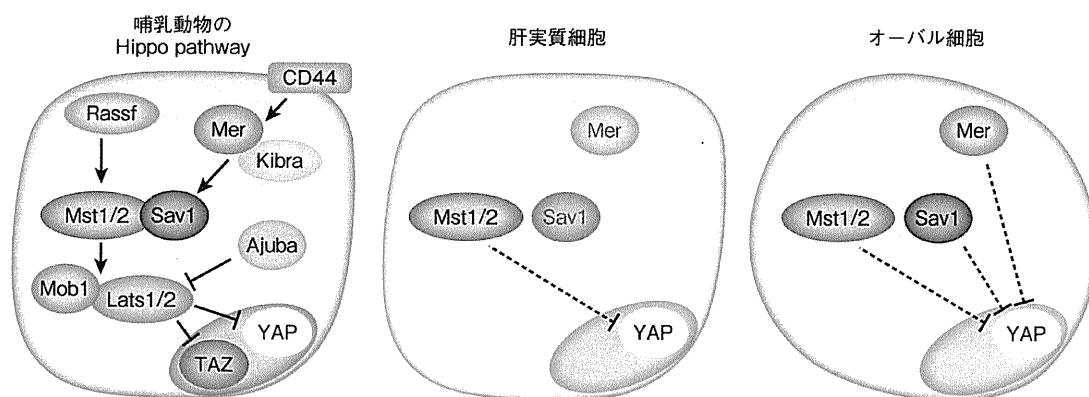
以上のように、*Mst1/2*、*Sav1*、*NF2* のいずれの肝臓特異的

KO マウスも、程度の違いはあるものの、*YAP* Tg マウスと同様の表現型を示すことが明らかとなった。また、Zhou らは肝臓特異的 *Mst1/2* DKO マウスの HCC から細胞株を単離し、この細胞株が示す高い増殖能は *YAP* のノックダウンによって低下することを見いだしている⁷⁾。さらに、Zhang らは *NF2* と *YAP* の肝臓特異的 DKO マウスを作製し、*NF2* の KO マウスで見られる肝臓サイズの増大や肝癌の発症といった表現型が *YAP* を KO することで消失することを見いだし



■図3 肝癌と由来する細胞のモデル図

肝癌の種類として肝細胞癌、胆管細胞癌、およびその混合型が知られており、それぞれ肝実質細胞、胆管上皮細胞、オーバル細胞などに由来することが示唆されている。



■図4 肝実質細胞とオーバル細胞で機能するHippo pathway構成因子

哺乳動物のHippo pathwayは主要構成因子であるSav1, Mst1/2, Lats1/2, Mob1, YAP, TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) と、上流調節因子であるRassf (ras-association domain family), Mer, Kibra, Ajubaなどにより構成される。遺伝子改変マウスを用いた解析結果から、肝実質細胞では主にMst1/2が、オーバル細胞ではMst1/2, Sav1, MerがYAPを負に制御していることが示唆されている。

た¹¹⁾。これらの結果は、Hippo pathwayがYAPを負に制御することにより、肝臓のサイズと発癌の制御を担っていることを強く示唆している。

IV 肝臓の構成細胞におけるHippo pathway

肝臓は、肝実質細胞に由来するHCCと胆管上皮細胞に由来する胆管細胞癌 (cholangio carcinoma: CC) の他に、HCCとCCの混合型も存在することが知られている (図3)。HCC/CC混合型は肝実質細胞と胆管上皮細胞への分化能を有する肝前駆細胞由来であることが示唆されている¹⁴⁾。この細胞はオーバル細胞と呼ばれており、通常の肝臓にはほとんど存在していないが、肝実質細胞の増殖が阻害されるような肝障害が生じると顕著な増殖を示す¹⁵⁾。

通常、肝臓を構成する細胞のほとんどは休止期にあるが、Hippo pathway構成因子の肝臓特異的KOマウスでは構成細胞の過増殖が認められる。興味深いことに、過増殖する細胞種やその結果生じる肝臓の種類は、それぞれのKOマウスによって異なっている。肝臓特異的Mst1/2 DKOマウスでは、肝実質細胞においてYAP Ser127のリン酸化が低下しており、顕著な増殖亢進が認められる^{7)~9)}。さらに、オーバル細胞の過増殖も見いだされており、発症する肝臓は主にHCCであるが、HCC/CC混合型の発症も報告されている。一方、肝臓特異的Sav1 KOマウスでは、肝実質細胞においてYAP Ser127のリン酸化に変化はなく、過増殖も認められな

い^{8)~10)}。しかし、オーバル細胞の増殖は亢進しており、HCC/CC混合型の肝臓を主に発症する。NF2の肝臓特異的KOマウスにおいても、肝実質細胞の過増殖は認められていないが、オーバル細胞の増殖は顕著に亢進しており、HCC/CC混合型の肝臓を主に発症する^{11)~12)}。このオーバル細胞の過増殖の表現型は、YAPをKOすることで消失することが示されている¹¹⁾。

このように、細胞種によってHippo pathway構成因子の使われ方が異なっており、肝実質細胞では主にMst1/2が、オーバル細胞ではMst1/2, Sav1およびMer (NF2遺伝子産物) がYAPの機能を抑制し、細胞周期を休止期に留めることで、肝臓のサイズと発癌の制御を担っていると考えられている¹⁶⁾ (図4)。

V 各種器官とHippo pathway

YAPはES細胞などの未分化性の高い細胞で高発現しており、ES細胞の自己複製能を制御していることが報告されている¹⁷⁾。また、Sav1 KOマウスやYAPを過剰発現させたマウスの皮膚や小腸では、幹 (前駆) 細胞の過増殖が生じている^{3)~18)~19)}。このような知見から、Hippo pathwayは肝臓以外の器官においても、高い増殖能を有する幹 (前駆) 細胞などの細胞周期制御を担っていると考えられる。しかし、興味深いことに、Songらは薬剤依存的に生後10日から様々な器官でMst1/2をDKOしたマウスの解析を行い、1~7カ月ほど

で肝臓と胃ではサイズが増大するが、肺、腎臓、小腸など他の器官では大きなサイズ変化は認められないことを報告している⁹⁾。このように、成長過程や成体でのHippo pathwayの破綻による器官サイズの変化は、すべての器官で生じるわけではなく、特に肝臓において顕著に認められる。この理由は定かではないが、各器官の休止期にある高い増殖能を有する細胞の割合に着目すると興味深い。成体の多くの器官では主に幹(前駆)細胞がこれに該当するが、その割合は低い。一方、成体の肝臓には典型的な幹細胞はほとんど存在していないが、休止期にある高い増殖能を有する細胞が大部分を占めている。すなわち、Hippo pathwayにより制御される細胞の割合が高いために、肝臓はHippo pathwayの破綻によって顕著なサイズの増大を示すと考えられる。

おわりに

遺伝子改変マウスを用いた解析により、Hippo pathwayが肝臓サイズと発癌の制御に重要な役割を担っていることが明らかとなった。しかし、細胞種ごとのHippo pathway構成因子の使われ方や、サイズ変化を感受する上流の分子機構、

YAPと協調して働く転写因子やその標的遺伝子など、不明な点は数多く残されている。今後は、主要構成因子であるLats (large tumor suppressor) やMob1 (mps one binder 1) などの様々なHippo pathway構成因子の肝臓特異的KOマウスを用いた解析が行われ、肝臓におけるHippo pathwayの全体像が明らかになることが期待される。また、ヒトの肝臓においてもHippo pathwayの破綻が見られることから、Hippo pathwayの分子機構の解明は新たな肝臓治療法の開発にとっても重要である。

PROFILE 梶 皇治

- 東京医科歯科大学難治疾患研究所 発生再生生物学分野 特任助教
- E-mail : hata.bio@tmd.ac.jp
- 趣味 : ソフトテニス, 料理

2008~2011年日本学術振興会特別研究員DC1. 2011年東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部博士課程修了。理学博士。同年4月より現職。Hippo-YAP pathwayの制御機構に関する研究に従事。

PROFILE 宮村憲央

- 東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部 博士課程

PROFILE 仁科博史

- 東京医科歯科大学難治疾患研究所 発生再生生物学分野 教授
- E-mail : nishina.dbio@mri.tmd.ac.jp

文献

- 1) Taub R, et al: Nat Rev Mol Cell Biol (2004) 5: 836-847
- 2) Dong J, et al: Cell (2007) 130: 1120-1133
- 3) Camargo FD, et al: Curr Biol (2007) 17: 2054-2060
- 4) Zender L, et al: Cell (2006) 125: 1253-1267
- 5) Zhao B, et al: Genes Dev (2007) 21: 2747-2761
- 6) Xu MZ, et al: Cancer (2009) 115: 4576-4585
- 7) Zhou D, et al: Cancer Cell (2009) 16: 425-438
- 8) Lu L, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2010) 107: 1437-1442
- 9) Song H, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2010) 107: 1431-1436
- 10) Lee KP, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2010) 107: 8248-8253
- 11) Zhang N, et al: Dev Cell (2010) 19: 27-38
- 12) Benhamouche S, et al: Genes Dev (2010) 24: 1718-1730
- 13) McClatchey AI, et al: Genes Dev (1998) 12: 1121-1133
- 14) Zhang F, et al: Histopathology (2008) 52: 224-232
- 15) Tanaka M, et al: J Biochem (2011) 149: 231-239
- 16) Avruch J, et al: Br J Cancer (2011) 104: 24-32
- 17) Lian I, et al: Genes Dev (2010) 24: 1106-1118
- 18) Lee JH, et al: EMBO J (2008) 27: 1231-1242
- 19) Schlegelmilch K, et al: Cell (2011) 144: 782-795

for beginners

肝細胞研究会HP : 研究交流 <http://hepato.umin.jp/kouryu/index.html>

トランスポートソームの世界

— 膜輸送研究の源流から未来へ —

編著

大阪大学大学院医学系研究科教授	金井好克
京都大学大学院薬学研究科教授	竹島 浩
京都大学大学院工学研究科教授	森 泰生
自然科学研究機構生理学研究所教授	久保義弘



KYOTO
HIROKAWA



京都廣川書店
KYOTO HIROKAWA

なタンパク質複合体の高次機能制御機構の詳細を解明する上で、従来の GFP に替わる非常に強力な解析ツールになり得ると考えられる。細胞内タンパク質の 80% 以上は、何らかの複合体を形成して機能を発揮していることを考えると、タンパク質の機能阻害を最小限にしながら自由にタンパク質のラベル化を行うことのできる発現後ラベル化法の細胞生物学研究における潜在的有用性は非常に高いと言える。今後、実用面ですぐれたラベル化特異性や汎用性を兼ね備えたタンパク質ラベル化法の開発、改良が続けられていくことが期待される。

(4-3-8 王子田彰夫)

参考文献

- 1) Sletten, E. M. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 6974-6998, 2009.
- 2) Maurel, D. *et al. ACS Chem. Biol.*, **5**, 507-516, 2010.
- 3) Los, G. V. *et al. ACS Chem. Biol.*, **3**, 373-382, 2008.
- 4) Uttamapinant, C. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10914-10919, 2010.
- 5) Vivero-Pol, L. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12770-12771, 2005).
- 6) Tour, O. *et al. Nature Chem. Biol.*, **3**, 423-431, 2007.
- 7) Guignet, E. G. *et al. Nature Biotechnol.*, **22**, 440-444, 2004.
- 8) Lata, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2365-2372, 2006.
- 9) Hauser, C. T. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **104**, 3693-3697, 2007.
- 10) Ojida, A. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10452-10459, 2006.
- 11) Nonaka, H. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 9301-9309, 2010.

4-3-9 モデル生物-マウスと小型魚類

(1) はじめに

生体膜を介する物質の輸送は細胞のホメオスタシスの基本であり、イオンチャネルやトランスポーターといった輸送体はその中心的な役割を担っている。また、これら細胞膜に存在する分子を裏打ちする複合体である「トランスポートソーム」が、下流のシグナル伝達系と連結して、細胞の増殖、死、形態、運動など多様な細胞応答を制御することが知られている。個々の細胞応答の結果、組織や器官は形成され、最終的には何十兆もの細胞が調和して我々の体は作られる。この統合的な高次生命現象である組織や器官の形成（発生および再生）の理解は現代の生命科学の中心課題の一つである。本稿では「モデル生物」の観点から、シグナル伝達系および器官形成の研究成果について概説する。

(2) モデル生物

分子機能や細胞応答に関する現在の理解は、ウイルス、細菌、酵母、原生動物、粘菌、カエル、ウニ、線虫、昆虫、魚類、ニワトリ、マウス、植物などのモデル生物およびヒト疾患の研究成果に基づいている。研究者は投げかけられた疑問に正確に素早く答えるために、最も適したモ

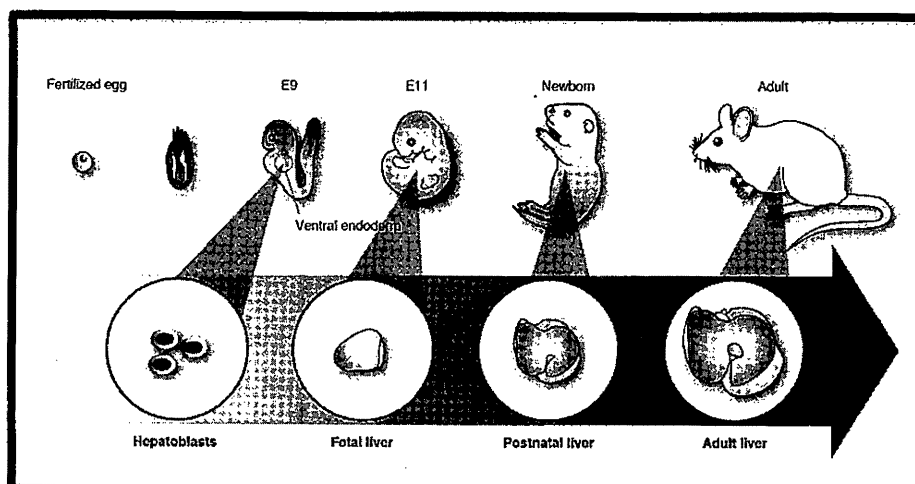


図 4-3-9a マウスの肝発生

デル生物を選択する。遺伝子、タンパク質、細胞小器官、細胞種などが進化的に保存されている場合、あるモデル生物で得られた結果が、他の生物にも広く適用できることが多いからである。ゲノム配列が完全（あるいはほぼ完全）に決められた生物では、遺伝学やゲノミクスの研究には特に有用である。このうちマウスは、広範な研究者に用いられている（図 4-3-9a）。それは強力な遺伝学的方法が適用できるモデル生物の中で、最もヒトに近いことが理由である。ヒトの特定の遺伝病に見出される変異を有する変異マウスがヒトの疾患と類似の表現型を示せば、特定遺伝子と疾患との関連が支持されたことになる。また、ヒト疾患を模倣するマウスモデルが得られれば、疾患研究のみならず治療法の開発や創薬研究に役立つ。

(3) マウスを用いたストレス応答性 JNK シグナルの研究成果

トランスポートソームの下流に存在するストレス応答性の JNK シグナル伝達系は、ヒトやマウス培養細胞を用いた研究から、当初はストレスに应答し細胞死を誘導するシグナル系であると考えられていた。しかしながら、2種類の JNK 活性化因子 MKK4 および MKK7 ノックアウトマウス（JNK シグナルが低下したマウス）が示した表現型は、肝臓形成不全（肝幹細胞の増殖能が低下）を伴う胎性致死であった。すなわち、JNK シグナル系は、発生期の肝形成においては細胞死誘導ではなく細胞生存誘導シグナルとして必須の役割を果たすことが示された¹⁻³⁾。また、JNK が Filamin を足場にして MKK4 および MKK7 によって協調的に活性化される分子機構も明らかにされた⁴⁾（図 4-3-9b）。さらに、JNK シグナル系がトランスポートソームに直結し細胞増殖・死を制御する別の Hippo シグナル伝達系とクロストークすることも明らかとなり、シグナルネットワークの解明が進んだ^{5,6)}。Hippo シグナル系は、2003 年にショウジョウバエの器官サイズを制御するシグナルとして発見され、マウスやヒトにも保存されている。興味深いことにヒト Hippo シグナル系は、構成因子の多くが発がんに関わることから、がん抑制シグナル系

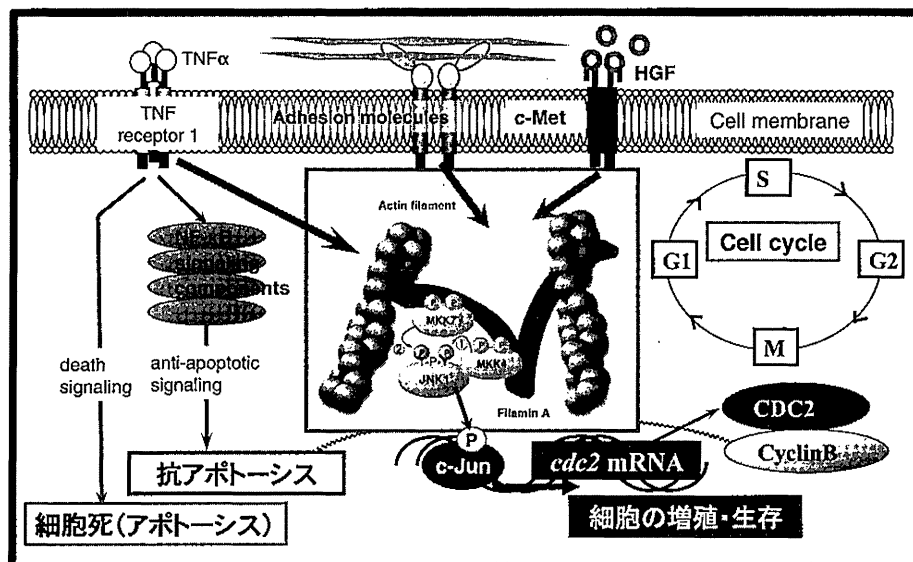


図 4-3-9b マウス肝幹細胞におけるシグナル伝達系

とも呼ばれている。

(4) 小型魚類を用いた器官形成研究

母胎内の子宮で発生するマウス胚を用いる器官形成研究には様々な困難が伴うため、母胎外で発生する小型魚類のゼブラフィッシュやメダカは、器官形成を研究する適切なモデル生物である。1) 卵生で胚が透明であるため、器官形成の過程を生きのまま経時的に観察できる（生きのまま分子や細胞のイメージングが可能）、2) 細胞移植等の胚操作ができる、3) モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いた遺伝子ノックダウンの機能阻害実験ができる、4) マウスと比較して、体もゲノムサイズも小さく、飼育スペースや経費が節約できるため、突然変異体の大規模スクリーニングが可能である。ゼブラフィッシュのゲノムサイズ 1700 Mb は、ヒトやマウスの半分であり、全塩基配列の決定プロジェクトや大規模な変異体スクリーニングなど研究環境の整備が進んでいる。特に 1990 年代にはドイツのチュービンゲンとアメリカのボストンの 2 ケ所で数百に及ぶ変異体が単離され、現在までに器官形成に関わる重要な遺伝子が明らかにされた実績がある⁷⁾。一方、マウスでは ES 細胞を用いた遺伝子破壊によって、ノックアウトマウスの作出が容易になっているが、小型魚類では特定遺伝子破壊実験はまだ一般的には普及していないが、TILLING 法や Zinc Finger Nuclease 法など有望な技術の改良と普及によって、ノックアウトゼブラフィッシュやノックアウトメダカの作出が容易になることが期待されている。また最近になって、細胞周期の進行を生きのまま可視化できる fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) トランスジェニックゼブラフィッシュが作出された⁸⁾。細胞周期 G1 期の細胞核は赤色、S/G2/M 期の細胞核は緑色の蛍光を発するので、増殖中の細胞と休止期の細胞を同時に

区別して可視化できる。最新の遺伝学や遺伝子工学を駆使した解析が無脊椎動物のショウジョウバエや線虫で行われているが、脊椎動物のゼブラフィッシュを用いた研究もこれらに近づきつつある。

(5) メダカを用いた器官形成研究

日本産のモデル生物であるメダカは、1) ゲノムサイズが800 Mbであり、ゼブラフィッシュの半分であること、2) メラニン色素を欠失している系統が存在し、胚発生後期においても胚が透明で観察しやすいこと（透明メダカ）、3) 性染色体が確定していること（ヒト同様に性決定はXYシステム）、さらに4) 生育温度幅が広く（14～34℃）温度感受性変異体の単離も可能であるなど、ゼブラフィッシュにない特性を有する（図4-3-9c）。メダカも全ゲノム配列の解読やゲノムライブラリの作製がほぼ完了し、今後数年以内に研究環境は十分に整備されると期待されている。このようなゲノムサイズや形態の特徴から、メダカの利点を活かした変異体の単離が期待されている。

1998～2003年にかけてERATO近藤誘導分化プロジェクトが京都の鴨川のほとりに立ち上がり、国内外の約10の研究グループが集結し、メダカを用いた大規模スクリーニングが行われた（図4-3-9d）。上述したゼブラフィッシュでは単離できなかったユニークな変異体も多数単離された⁹⁾。我々のグループは、肝形成および肝機能異常変異メダカのスクリーニングを行い、肝形成や肝機能不全変異体を複数単離することに成功した。このうち“緋扇 (*hiohgi*)”と命名した変

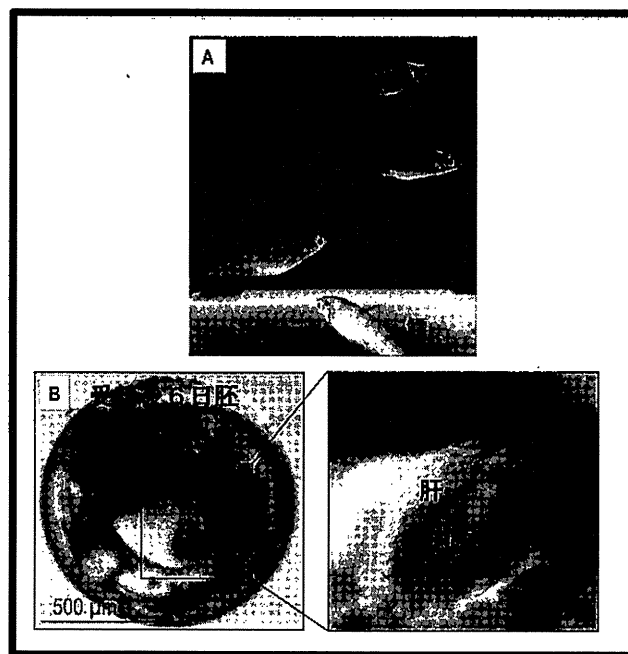


図4-3-9c 小型魚類モデル生物メダカ

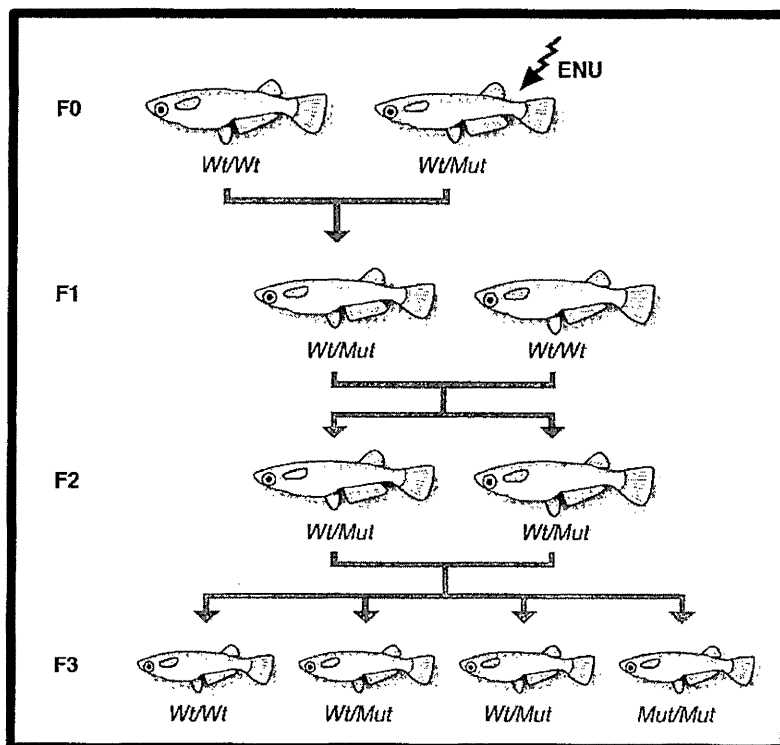


図 4-3-9d メダカ変異体の作出

異体（胚の形が扇子に似ている）は，“肝臓が小さく，胸鰭が無い”という興味深い表現型を示す¹⁰⁾。原因遺伝子の同定から，ビタミンAからオールトランスレチノイン酸（RA）を合成する酵素（レチノイン酸合成酵素タイプ2，RALDH2）をコードする遺伝子の変異であることが判明した。詳細な解析から，側板中胚葉（lateral plate mesoderm）に発現するRALDH2がRAを産生し，下流に位置するWnt2bb遺伝子の発現を誘導し，肝臓の特異化を決定することが示された。興味深いことに，このRALDH2によるWnt遺伝子誘導のシグナル系は，胸鰭の特異化を決定するシグナル系と酷似している。マウス前脚（ヒトの上肢に相当）およびゼブラフィッシュの胸鰭にRALDH2が必須の役割を果たし，その下流にWntやTbxのシグナル分子が存在することはこれまでに示されてきたが，いずれの変異体も肝形成以前に致死となり，RALDH2の肝形成における役割については不明のままであった。それ故，マウス，ゼブラフィッシュ，メダカの3種類のモデル生物を比較検討することで初めて明らかになった研究成果と言える。

(6) まとめ

小型魚類のメダカやゼブラフィッシュは，ヒトやマウスと同じ脊椎動物であり，対応する多くの器官が存在する。またその形成に関わる分子メカニズムは種間を越えて保存されている。欧米では既にゼブラフィッシュを用いた創薬研究が盛んである。今後は，ノックアウトマウスを用い

た研究に加えて、メダカやゼブラフィッシュ変異体を用いた研究が我が国でも盛んになることを期待している。

(4-3-9 仁科博史)

参考文献

- 1) Nishina H. *et al. Development* **126**, 505-516, 1999.
- 2) Watanabe T. *et al. Dev. Biol.* **250**, 332-347, 2002.
- 3) Wada T. *et al. Nat. Cell Biol.* **6** 215-226, 2004.
- 4) Nakagawa K. *et al. Biochem. J.* **427**, 237-245, 2010.
- 5) Kitagawa D. *et al. EMBO J.* **25**, 3286-3297, 2006.
- 6) Ura S. *et al. Mol. Cell. Biol.* **27**, 5514-5522, 2007.
- 7) Zebrafish Special Issue. *Development* **123**, 1-461, 1996.
- 8) Sugiyama M. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 20812-20817, 2009.
- 9) Medaka Special Issue. *Mech. Dev.* **121**, 593-1008, 2004.
- 10) Negishi T. *et al. Hepatology* **51**, 1037-1045, 2010.

4-3-10 1分子追跡：それによって見えてきたシグナル伝達をする瞬間の細胞膜ラフト

(1) 1分子追跡によってシグナル伝達をする瞬間の細胞膜ラフトが見えてきた。

細胞を包んでいる細胞膜上の受容体に、細胞外からやってきたシグナル分子が結合すると、シグナルが細胞内に伝わるが、今までは、このようなシグナル変換過程は、受容体などのタンパク質が担うものと考えられてきた。

最近、われわれは、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型受容体において、タンパク質分子だけではなく、受容体分子の周辺の細胞膜構造が局所的に変化して、シグナルが伝わるという事例を、免疫関連の GPI アンカー型受容体 CD59 で初めて見いだした。細胞膜は液体のような構造を持っているが、シグナル分子が CD59 に結合すると、CD59 が数個集まって集合体を形成する。すると集合体に、液体の細胞膜の中のコレステロールや糖脂質などが集合し、いわば細胞膜という海の中で、CD59 を中心にしたイカダのような構造 (ラフト) が形成されることがわかった。さらに、このラフトに多くのシグナルタンパク質が集まってきて、細胞内にシグナルが伝わるということが明らかになった。

従来は、ラフトは細胞膜上に恒常的に存在していると考えられ、その存在を証明するために、多くの研究者が研究に取り組んできた。我々の得た結果は、ラフトは、シグナルがきて初めてオンデマンド (必要に応じて) で形成されることを示したという点で非常に画期的であり、さらに、そこで細胞内へのシグナル伝達が起こることを初めて証明したという点で、非常に面白いものであると考えている。このような発見が可能になったのは、生細胞中で、複数種のシグナル分子を同時に1分子ずつ追跡する技術を開発した研究成果によるものであり、それによって、ラフトが形成され、シグナル分子が集まってくる様子がまさに手に取るように見えてきた。

患者まで届いている

再生医療

自己骨髄細胞投与による肝再生療法

Autologous Bone Marrow Cell infusion therapy (ABMi therapy) for liver regeneration

寺井 崇二 坂井田 功

Terai, Shuji/Sakaida, Isao

山口大学大学院医学系研究科 消化器病態内科学

Department of Gastroenterology and Hepatology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

E-mail : terais@yamaguchi-u.ac.jp

Key words

自己骨髄細胞投与療法 / Autologous Bone Marrow Cell infusion therapy (ABMi therapy) / 肝硬変症 / 肝再生 / 肝線維化 / 肝前駆細胞 / MMP

Summary

We developed a novel cell therapy, autologous bone marrow cell infusion (ABMi) therapy for liver cirrhosis patients. The development of ABMi therapy was depended on the results from basic studies that bone marrow cell (BMC) infusion repairs liver fibrosis in the cirrhotic liver, and improves liver function and the survival rate. In improvement of liver function, BMC-derived MMP9 improved liver fibrosis, and sequentially resident hepatocyte and liver progenitor cell was activated and proliferated. The clinical study of ABMi therapy began in November 2003 at Yamaguchi University. Serum albumin level and Child-Pugh score was improved by ABMi therapy. ABMi therapy was safe and effective for liver cirrhosis patients. Multicenter trials in Japan and Korea have also shown the effectiveness of ABMi therapy. In this paper, we report the current status and future perspective of ABMi therapy.

はじめに

我々は、2003年11月より、適応基準を満たす非代償性肝硬変患者に対して、『自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法〔自己骨髄細胞の投与療法, Autologous Bone Marrow Cell infusion therapy (ABMi療法)〕』の臨床研究を推進してきた。ABMi療法の硬変肝に与える効果については、“投与した骨髄細胞が肝硬変部に遊走されコラゲナーゼを出すことで肝線維化の改善を

起こす。それに引き続き肝前駆細胞および肝細胞の活性化, 増殖が起こり, 肝再生, 肝機能が改善する”と考えている。現在までに山口大学さらに、2005年度からは多施設研究を山形大学で実施、さらに2006年11月には国際共同研究として韓国延世大学で自己骨髄細胞投与療法を実施し、重篤な副作用の発生はなく、有効性を報告した。本稿では骨髄細胞を用いた肝臓再生療法の今までの結果、現状について概説する。



肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与の意義

2000年に男性ドナー由来の造血幹細胞移植を受けた女性の肝組織中に、Y染色体が確認されたことが報告された¹⁾。このことより我々は骨髄細胞を用いた肝硬変治療の可能性を考え基礎研究を開始した。骨髄に存在する幹細胞の肝細胞への分化機序に関しては骨髄幹細胞の肝細胞への分化転換²⁾や骨髄由来細胞と既存肝細胞との融合³⁾などさまざまな機序が考えられてい

る。現在わが国にはウイルス肝炎・肝硬変患者は約350万人いる。その終末像である肝不全患者に対する根本治療はいまだ肝移植しかないのが現状であるが、移植に伴う外科侵襲、費用の問題、ドナーの問題は依然として大きい。我々は肝硬変などの肝不全患者の救命のため2000年より基礎研究を開始した。まずは肝硬変症患者に対する自己骨髄細胞投与療法の有効性を検討するために、基礎研究として、四塩化炭素の持続投与による肝硬変モデルマウスに対して、GFPトランスジェニックマウス由来の全骨髄細胞を投与するGFP/CCl4モデルを開発し解析してきた⁴⁾。このモデルは、骨髄細胞投与がどのような肝病態において有効か検討するためのモデルである。その結果明らかになったのは、ドナー由来の骨髄細胞が肝硬変肝の門脈領域に定着しmatrix metalloproteinase (MMP)9などの線維化分解酵素を産生することで肝線維化が改善したこと、これに伴い肝機能の改善および生存率の改善が得られたことを2004年に報告した⁵⁾。基本的には、投与した骨髄細胞が肝硬変症の門脈域に遊走されMMP9などのコラゲナーゼを出すことで、肝線維化の改善とそれに続く肝前駆細胞の活性化および肝細胞が増殖することで肝再生、肝機能の改善が誘導されると考えられる⁶⁾ (図1, 2)。一方で、基礎研究として、アデノウイルスベクターなどを用いてMMPを肝臓に

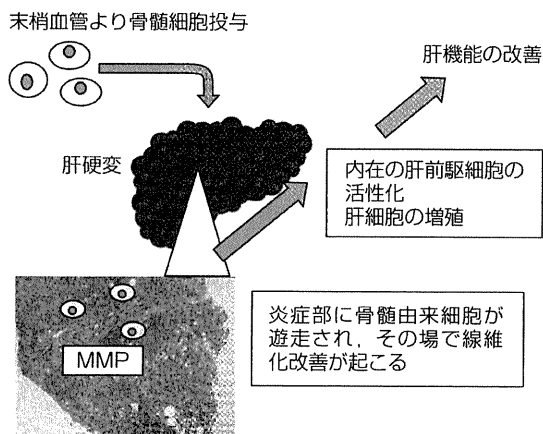


図1 骨髄細胞の肝線維化改善メカニズム

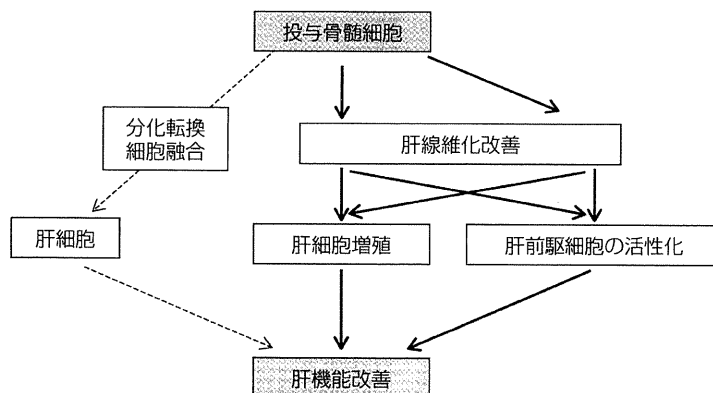


図2 骨髄細胞投与による肝硬変症改善のメカニズム

発現させたところ肝線維化が改善したとの報告がなされており⁷⁾⁻⁹⁾、骨髄細胞投与によるMMPの産生を介した肝線維化および肝機能の改善効果は、肝臓修復、再生の重要なメカニズムと考えられた。

以上の基礎研究の結果より、骨髄細胞投与により肝機能改善、生存率の改善が明らかになったことより次の段階として臨床研究を推進した。

自己骨髄細胞投与療法の方法

対象は18～75歳までの肝硬変症の患者。総ビリルビン値が3 mg/dL以下、血小板値が5万以上、MRI、CT診断にて肝細胞癌がない患者が対象である。実際の方法は、全身麻酔下で400mLの骨髄液を採取し、細胞を洗浄、単核球成分を採取する。このプロセスは約3～4時間のプロセスである。最終産物を末梢静脈から投与し、その後6ヵ月間経過観察を行う¹⁰⁾⁻¹²⁾。臨床研究は山口大学医学部倫理委員会にて承認を得て実施しており、細胞のCell Processingは、山口大学医学部附属病院再生・細胞療法センターにおいてGMPグレードに沿って実施した。我々が最初の肝硬変症症例

に対して自己骨髄細胞投与療法を行う際に、果たして肝硬変症患者より十分な骨髄採取が可能であるかは不明であったが、実際は400mLの骨髄液より、 $7.81 \pm 0.98 \times 10^9$ の単核球細胞の採取ができ、洗浄後平均 $5.20 \pm 0.63 \times 10^9$ の単核球細胞を投与できている。また総ビリルビン値が3 mg/dL以下の理由は、安全に全身麻酔を施行できる限界値と考え設定した。

自己骨髄細胞投与療法の臨床研究の現状と結果

図3が今までの自己骨髄細胞投与療法開発の経過である。世界に先駆けて我々は2003年より自己骨髄細胞投与療法の臨床研究を開始し、重篤な有害事象なく肝硬変症例の血清アルブミン値、およびChild-Pughスコアなどの肝機能が有意差をもって改善したことを報告した¹⁰⁾。また術前、術後の肝生検組織解析においても、自己骨髄細胞投与後の肝臓は、AFPおよびPCNA陽性細胞の増加が確認され、基礎研究と同様に肝再生に誘導が示唆された。次に実施した韓国延世大学との共同研究としては、B型肝炎ウイルスを起因と

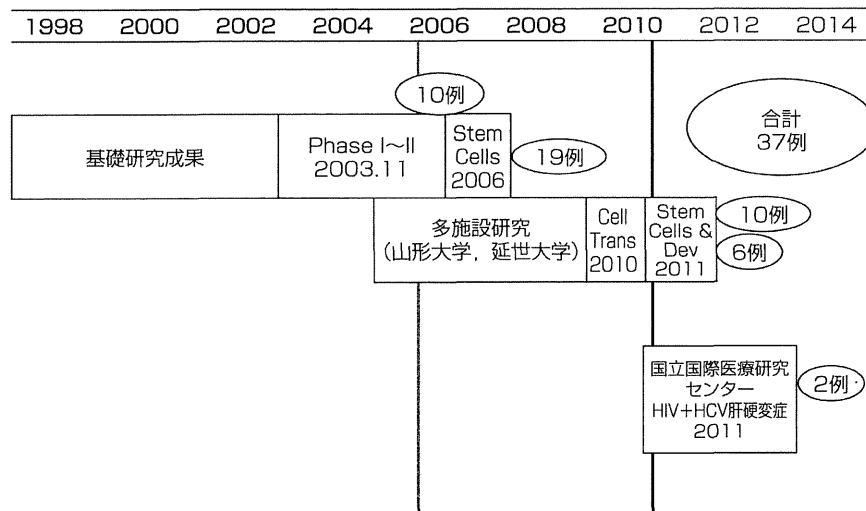


図3 肝硬変症に対する自己骨髄細胞投与療法の経過



する肝硬変 (Child-Pugh B) の10例に対して自己骨髄細胞投与療法を行い、肝機能・Child-Pugh scoreの有意な改善をみた。治療効果は12ヵ月にわたり維持された。経時的な肝生検では、肝前駆細胞の活性化も確認された¹³⁾。この結果もやはり、ヒトにおいてもGFP/CC14モデル解析同様に¹⁴⁾、肝組織において骨髄細胞投与による肝前駆細胞の活性化が確認されたことになる。山形大学との共同研究では6例のアルコール性肝硬変に対して自己骨髄細胞投与療法を行い、Child-Pugh scoreの有意な改善を認め、自己骨髄細胞投与療法のアルコール性肝硬変症に対する有用性を明らかにした¹⁵⁾。この際の解析において骨髄細胞投与後、Indium111の骨髄の取り込みが自己骨髄細胞投与療法後に明らかになっており、今後解析が必要であるが自己骨髄細胞投与療法に伴う骨髄の活性化の可能性も新たに明らかになった。新たに、国立国際医療研究センターエイズ治療研究開発センターにおいて、HIV＋HCV合併肝硬変症患者に対して、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針の審査の承認を得て、現在までに2例の患者に対して自己骨髄細胞投与療法を実施している。

一方、中国の中山大学では、自己骨髄細胞投与療法の臨床研究がされ、527人のHBVに起因した肝不全患者をリクルートし、53人の120mLの骨髄液を肝動脈から投与する群と、105人の投与しない群に分け解析した結果、早期(2～3週)観察群と192週観察した群に分け解析し、早期の肝機能の改善を確認した。また長期観察では、骨髄細胞投与により肝細胞癌の発生率の変化なく、生存率の改善の可能性が示唆された¹⁶⁾。このように長期においても骨髄細胞投与により肝発癌の誘導を認めなかったことは、今後の骨髄由来細胞を用いた肝臓再生療法を開発する上で重要な結果であった。

今後の課題

自己骨髄細胞投与療法をより多くの患者に施行するには、1日も早い保険収載が必要であり、現在さらに多施設無作為臨床研究を行うべく準備しており、さらに高度医療の認可を目指す。また現状の自己骨髄細胞投与療法の効果を上げる方法として、脾臓摘出術を施行した後に自己骨髄細胞投与療法を行った場合がより治療効果がある可能性が示された。この理由としては、脾臓摘出により、末梢から投与された骨髄細胞が脾臓にトラップされることなく、より多くの骨髄細胞が硬変肝にいくためという基礎研究から明らかになった¹⁷⁾。この結果は、骨髄細胞の遊走機構の工夫がより効果を高める可能性を示唆する。

一方で、現在の自己骨髄細胞投与療法は、全身麻酔下にて400mLの骨髄液を採取し投与する。しかしながら、肝不全患者の中では、全身麻酔が困難な患者が多く、自己骨髄細胞投与療法の対象にならない患者が多い。この問題の解決には、局所麻酔で少量の骨髄液を採取し、その後肝硬変症の修復再生に有効な分画を増殖し、投与する方法の開発が求められる。このためには、自己骨髄細胞の中のどの細胞分画が肝線維化改善および肝機能の修復に重要な役割を担うかについての検討が重要になる。また肝機能改善の機序解析も重要である。現在骨髄由来細胞から肝臓を修復する細胞を体外で培養増幅し、肝硬変症患者に投与する次世代型の培養細胞を用いた治療法を、橋渡し研究として現在開発を進めており、培養細胞を用いた低侵襲な再生療法を一日も早く患者に届けられよう努力していく。

謝辞

本研究を行うにあたり、文部科学省、厚生労働省、科学技術振興機構、また学術振興会の助成を受け行った。深謝いたします。

●文 献

- 1) Theise ND, Badve S, Saxena R, et al : Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* **31** : 235-240, 2000
- 2) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al : Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* **109** : 1291-1302, 2002
- 3) Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al : Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416** : 542-545, 2002
- 4) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, et al : An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* **134** : 551-558, 2003
- 5) 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
- 6) Terai S, Sakaida I, Nishina H, et al : 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* **12** : 203-207, 2005
- 7) Jimuro Y, Nishio T, Morimoto T, et al : Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology* **124** : 445-458, 2003
- 8) 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
- 9) Siller-Lopez F, Sandoval A, Salgado S, et al : Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology* **126** : 1122-1133 ; discussion 1949, 2004
- 10) Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al : Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* **24** : 2292-2298, 2006
- 11) Terai S, Sakaida I : Autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* **18** : 23-25, 2011
- 12) 寺井崇二, 浦田洋平, 丸本芳雄, 他 : 再生医療最前線 多施設臨床研究 : 肝硬変症に対するABMi療法の開発. *再生医療* **5** : 79-87, 2006
- 13) Kim JK, Park YN, Kim JS, et al : Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant* **19** : 1237-1246, 2010
- 14) Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, et al : An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* **134** : 551-558, 2003
- 15) Saito T, Okumoto K, Haga H, et al : Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem Cells Dev* **20** : 1503-1510, 2011
- 16) Peng L, Xie DY, Lin BL, et al : Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B : Short-term and long-term outcomes. *Hepatology* **54** : 820-828, 2011
- 17) Iwamoto T, Terai S, Mizunaga Y, et al : Splenectomy enhances the anti-fibrotic effect of bone marrow cell infusion in cirrhotic mice and patients. *J Gastroenterology*, 2011 (in press)

In daily practice, the concept of fiberoptic intubation in the awake patient is not clearly defined. In most cases, the choice of technique is dependent on institutional and personal preferences. Ultimately, such a choice is a compromise between safety, practicability, and acceptance. The technique as shown in the video is a thoroughly documented, well-tested method that has not been changed for many years.⁵

Thomas Heidegger, M.D.

Spitalregion Rheintal Werdenberg Sarganserland
Walenstadt, Switzerland
thomas.heidegger@srrws.ch

Since publication of his article, the author reports no further potential conflict of interest.

1. Langeron O, Masso E, Huraux C, et al. Prediction of difficult mask ventilation. *Anesthesiology* 2000;92:1229-36.
2. Khetarpal S, Martin L, Shanks AM, Tremper KK. Prediction and outcomes of impossible mask ventilation: a review of 50,000 anesthetics. *Anesthesiology* 2009;110:891-7.
3. Cook TM, Woodall N, Frerk C. Major complications of airway management in the UK: results of the Fourth National Audit Project of the Royal College of Anaesthetists and the Difficult Airway Society. Part 1: anaesthesia. *Br J Anaesth* 2011;106:617-31.
4. O'Sullivan E, Laffey J, Pandit JJ. A rude awakening after our fourth 'NAP': lessons for airway management. *Anaesthesia* 2011;66:331-4.
5. Heidegger T, Gerig HJ, Ulrich B, Schnider TW. Structure and process quality illustrated by fiberoptic intubation: analysis of 1612 cases. *Anaesthesia* 2003;58:734-9.

Deferoxamine for Advanced Hepatocellular Carcinoma

TO THE EDITOR: We have previously reported that the iron chelator deferoxamine can prevent liver injury as well as the development of preneoplastic lesions in rats,^{1,2} and we have proposed the use of deferoxamine as an anticancer drug. The antiproliferative effect of deferoxamine arrests the cell cycle and induces apoptosis.³ To our knowledge, no clinical study has been performed to evaluate deferoxamine therapy in patients with hepatocellular carcinoma.⁴

Our study involved 10 patients (6 men and 4 women) who had advanced hepatocellular carcinoma and did not have a response to hepatic arterial infusion chemotherapy with anticancer drugs. The average age of the patients was 64 years (range, 43 to 77). Written informed consent was obtained before the study, which was approved by the institutional review board of Yamaguchi University Hospital. Seven patients had hepatitis C virus infection, 2 patients had hepatitis B virus infection, and 1 patient did not have either type of infection. The tumor stages were classified as II, IVA, and IVB (according to the Liver Cancer Study Group of Japan criteria) for 1, 2, and 7 patients, respectively. The Child-Pugh class was A, B, and C for 3, 5, and 2 patients, respectively. (In the Child-Pugh classification of liver disease, class A indicates the least severe disease, class B moderately severe disease, and class C the most severe disease.) The patients received an arterial

infusion of deferoxamine (at a dose of 10 to 80 mg per kilogram of body weight) over 24 hours on alternate days, through the injection port.

Deferoxamine was administered an average of 27 times (range, 9 to 78). Two, three, and five patients had a partial response, stable disease, and progressive disease, respectively (according to the Eastern Cooperative Oncology Group criteria). The overall response rate was 20%.

Tumor-marker levels (alpha-fetoprotein, des-gamma-carboxyprothrombin, alpha-fetoprotein L3, or all of these levels) decreased in patients with a partial response. In one patient, a massive hepatocellular tumor with lung metastases disappeared with deferoxamine treatment (Fig. 1). The 1-year cumulative survival rate was 20%. Four patients had grade 2 or 3 interstitial pneumonia (according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 4.0), and one patient had grade 2 renal dysfunction. However, no grade 4 adverse events were observed.

Sorafenib, a multikinase inhibitor, has recently been established as the standard of care for patients with advanced hepatocellular carcinoma and preserved liver function (Child-Pugh class A) because it increases survival.⁵ However, its safety and efficacy for patients with Child-Pugh class B or C disease is still unknown. Deferoxamine may warrant testing in patients with Child-Pugh class B or C hepatocellular carcinoma.

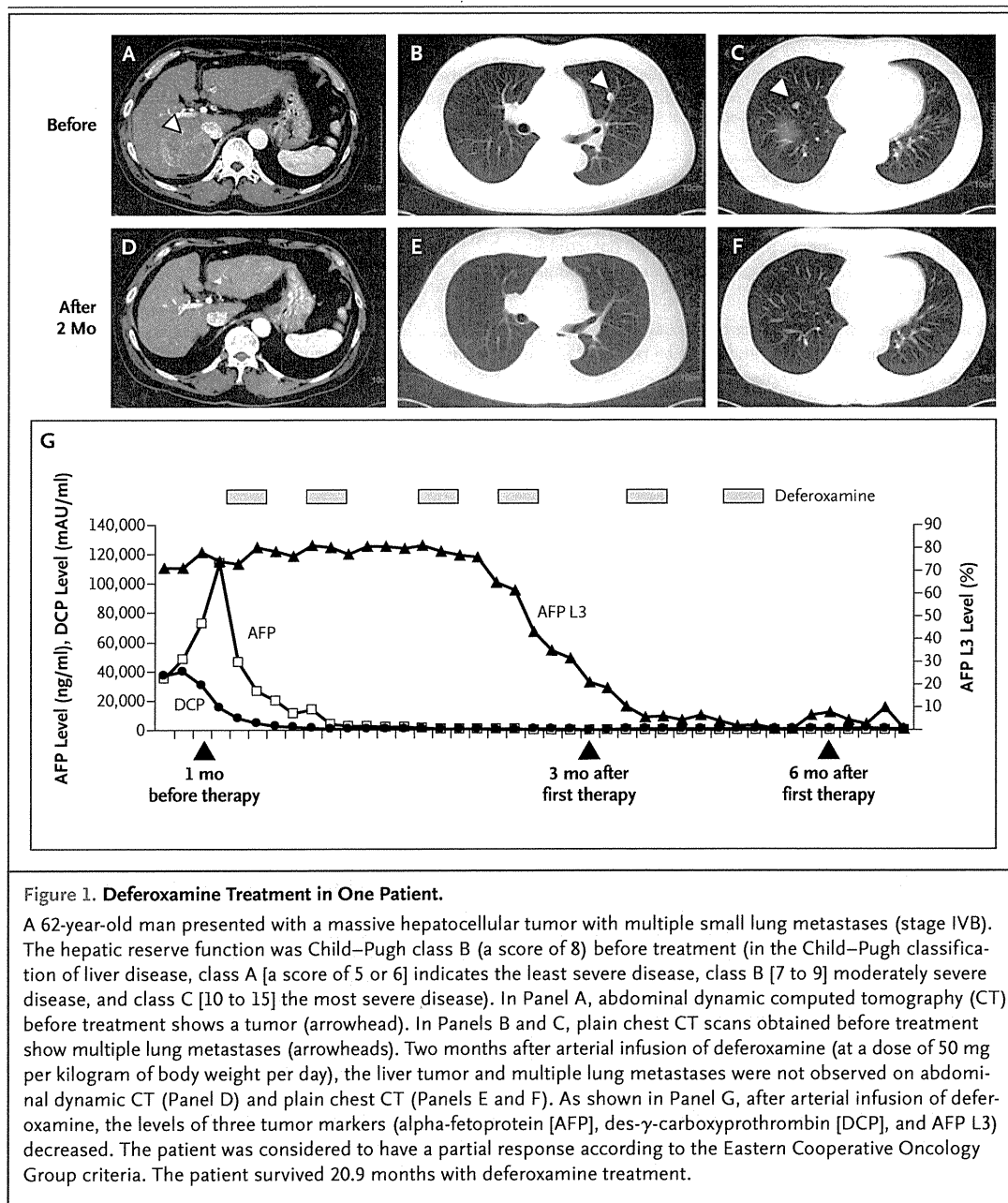


Figure 1. Deferoxamine Treatment in One Patient.

A 62-year-old man presented with a massive hepatocellular tumor with multiple small lung metastases (stage IVB). The hepatic reserve function was Child–Pugh class B (a score of 8) before treatment (in the Child–Pugh classification of liver disease, class A [a score of 5 or 6] indicates the least severe disease, class B [7 to 9] moderately severe disease, and class C [10 to 15] the most severe disease). In Panel A, abdominal dynamic computed tomography (CT) before treatment shows a tumor (arrowhead). In Panels B and C, plain chest CT scans obtained before treatment show multiple lung metastases (arrowheads). Two months after arterial infusion of deferoxamine (at a dose of 50 mg per kilogram of body weight per day), the liver tumor and multiple lung metastases were not observed on abdominal dynamic CT (Panel D) and plain chest CT (Panels E and F). As shown in Panel G, after arterial infusion of deferoxamine, the levels of three tumor markers (alpha-fetoprotein [AFP], des- γ -carboxyprothrombin [DCP], and AFP L3) decreased. The patient was considered to have a partial response according to the Eastern Cooperative Oncology Group criteria. The patient survived 20.9 months with deferoxamine treatment.

Takahiro Yamasaki, M.D., Ph.D.

Shuji Terai, M.D., Ph.D.

Isao Sakaida, M.D., Ph.D.

Yamaguchi University Graduate School of Medicine
Ube, Japan
t.yama@yamaguchi-u.ac.jp

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this letter at NEJM.org.

1. Sakaida I, Kayano K, Wasaki S, Nagatomi A, Matsumura Y, Okita K. Protection against acetaminophen-induced liver injury in vivo by an iron chelator, deferoxamine. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:61-7.
2. Sakaida I, Hironaka K, Uchida K, Okita K. Iron chelator deferoxamine reduces preneoplastic lesions in liver induced by choline-deficient L-amino acid-defined diet in rats. *Dig Dis Sci* 1999;44:560-9.
3. Yu Y, Kovacevic Z, Richardson DR. Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cell Cycle* 2007;6:1982-94.

4. Donfrancesco A, Deb G, Dominici C, Pileggi D, Castello MA, Helson L. Effects of a single course of deferoxamine in neuroblastoma patients. *Cancer Res* 1990;50:4929-30.

5. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-90.

Correspondence Copyright © 2011 Massachusetts Medical Society.

INSTRUCTIONS FOR LETTERS TO THE EDITOR

Letters to the Editor are considered for publication, subject to editing and abridgment, provided they do not contain material that has been submitted or published elsewhere. Please note the following:

- Letters in reference to a *Journal* article must not exceed 175 words (excluding references) and must be received within 3 weeks after publication of the article.
- Letters not related to a *Journal* article must not exceed 400 words.
- A letter can have no more than five references and one figure or table.
- A letter can be signed by no more than three authors.
- Financial associations or other possible conflicts of interest must be disclosed. Disclosures will be published with the letters. (For authors of *Journal* articles who are responding to letters, we will only publish new relevant relationships that have developed since publication of the article.)
- Include your full mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address with your letter.
- All letters must be submitted at authors.NEJM.org.

Letters that do not adhere to these instructions will not be considered. We will notify you when we have made a decision about possible publication. Letters regarding a recent *Journal* article may be shared with the authors of that article. We are unable to provide prepublication proofs. Submission of a letter constitutes permission for the Massachusetts Medical Society, its licensees, and its assignees to use it in the *Journal's* various print and electronic publications and in collections, revisions, and any other form or medium.

NOTICES

Notices submitted for publication should contain a mailing address and telephone number of a contact person or department. We regret that we are unable to publish all notices received. Notices also appear on the Journal's Web site (NEJM.org/medical-conference). The listings can be viewed in their entirety or filtered by specialty, location, or month.

INTENSIVE MEDICAL SPANISH & CULTURAL COMPETENCY WORKSHOP

The conference will be held in the following cities: Tucson, AZ (Sept. 16–19); La Paz, BCS, Mexico (Oct. 22–29); Phoenix, AZ (Nov. 4–7); San Francisco (Nov. 11–14); San Diego, CA (Nov. 18–21); Las Vegas (Dec. 2–5); and Acapulco, GRO, Mexico (Dec. 9–16).

Contact Tamara Rios, Rios Associates, 3729 N. Bay Horse Loop, Tucson, AZ 85719; or call (520) 907-3318; or see <http://www.medspanish.org>.

MEDICAL MUSICAL GROUP

The VA-National Medical Musical Group is seeking members for its symphony orchestra and chorale. The group will perform a concert entitled "healing for the Nations," to be held in Washington, DC, on Nov. 9 and in Geneva on Nov. 15.

Contact VA-NMMMG, 1700 17th St. NW, Suite 508, Washington, DC 20009; or call (202) 797-0700; or fax (202) 797-0771; or see <http://www.medicalmusical.org>; or e-mail vanmmg@hotmail.com.

CALL FOR APPLICATIONS

The American Philosophical Society is accepting applications for its "Daland Fellowships in Clinical Investigation," which support research in the several branches of clinical medicine, including internal medicine, neurology, pediatrics, psychiatry, and surgery. The committee emphasizes patient-oriented research. Deadline for submission is Sept. 1.

Contact Linda Musumeci, Director of Grants and Fellowships, American Philosophical Society, 104 S. Fifth St., Philadelphia, PA 19106; or call (215) 440-3429; or e-mail lmusumeci@amphilsoc.org; or see <http://www.amphilsoc.org/grants>.

OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH EDUCATION AND RESEARCH CENTER

The following courses will be offered in Chapel Hill, NC: "Building Inspection and Management Planning for Asbestos" (Oct. 10–14; refresher course, Sept. 9, Dec. 8); "Certified Safety Professional (CSP) Review Course" (Oct. 31–Nov. 4); "Supervising Asbestos Abatement Projects" (Nov. 14–18; refresher course, Sept. 8, Dec. 7); "31st Annual Occupational Safety and Health Update" (Dec. 1 and 2); and "Designing Asbestos Abatement Projects" (Dec. 9).

Contact the Occupational Safety and Health Education and Research Center, University of North Carolina, P.O. Box 16248, Chapel Hill, NC 27516-6248; or call (888) 235-3320 or (919) 962-2101; or fax (919) 966-7579; or e-mail osherc@unc.edu; or see <http://www.osherc.sph.unc.edu>.

PEDIATRIC SEDATION OUTSIDE OF THE OPERATING ROOM

The conference will be held in Boston, Sept. 17 and 18. It is jointly sponsored by Children's Hospital Boston and Harvard Medical School Department of Continuing Education.

Contact Amanda Buckley, Harvard Medical School Department of Continuing Education, P.O. Box 825, Boston, MA 02117; or e-mail amanda.buckley@childrens.harvard.edu; or see <http://www.pediatricsedationconference.com>.

43RD INTERNATIONAL DANUBE NEUROLOGY SYMPOSIUM 2011

The symposium will be held in Dresden, Germany, Oct. 6–8.

Contact Hanser & Co GmbH, P.O. Box 12 21, 22882 Barsbüttel, Germany; or call (49) 40 670 88 20; or fax (49) 40 670 32 83; or e-mail danube2011@cpo-hanser.de; or see <http://www.danube2011.org>.

THE JOURNAL'S WEB AND E-MAIL ADDRESSES:

For letters to the Editor: authors.NEJM.org

For information about the status of a submitted manuscript: authors.NEJM.org

To submit a meeting notice: meetingnotices@NEJM.org

The Journal's Web pages: NEJM.org