

肝細胞癌の治療は一般に癌進行度と肝障害度に応じて治療選択が行われ、肝切除、ラジオ波焼灼療法、TACEなどの局所療法が中心となっている。しかし、肝外転移例やTACEが無効な例など化学療法が適応となる症例も少なくないことから、有効な治療法が必要である。

近年、分子標的薬の開発が盛んに行われ、肝細胞癌でも多くの臨床試験が行われるようになってきていた。その中で、RAFキナーゼ、VEGFR-1-3、PDGFR- β などを標的とするマルチキナーゼ阻害薬ソラフェニブを用いたプラセボ対照のランダム化比較試験(SHARP試験)の結果、ソラフェニブ治療群はプラセボ群に比べ有意な生存期間の延長が確認された。わが国では肝細胞癌に対する第I相試験により、SHARP試験と同じ推奨用量が示され、2009年5月、わが国でも肝細胞癌に適応が承認されている。現在、ソラフェニブによる化学療法は肝外転移を有する例や局所治療が適応にならない進行例に対する標準治療として位置づけられている。

これまでの比較試験では、Child-Pugh Aの肝機能良好例のみを対象としており、肝機能低下例での安全性と有効性は確立していない。一般臨床において肝機能低下例も少なくなく、これらの患者におけるソラフェニブの安全性と有効性を明らかにすることが求められている。Child-Pugh Cの高度肝機能不良例は化学療法の適応はないことから、本研究ではChild-Pugh AとBの患者を対象に前向きな臨床試験を実施し、最終的に52例が登録された。SHARP試験などの臨床試験ではChild-Pugh Aが対象となっていたことから、ソラフェニブの適正使用の

推奨がChild-Pugh Aとされており、登録された症例の多くがChild-Pugh Aであった。しかし、Child-Pugh Bも12例登録され、その治療成績は貴重なデータとなるものと考えられる。

Child-Pugh Aのうち、score 5点と6点では6点の症例で肝障害が強く出ている傾向があり、注意が必要である。今後、追跡調査により、肝機能別の安全性や有効性を評価する予定である。

E. 結論

ソラフェニブの大規模な臨床試験ではChild-Pugh Bの肝機能低下例での安全性と有効性は検証されていない。今後本研究により、Child-Pugh Bを含めた症例での有用性を明らかにすることで、一般臨床での適正使用の確立に大きな貢献ができるものとする。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Furuse J, Nagashima F. Inhibitor of MEK1/2, selumetinib, for biliary tract cancer. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;5(5):579-81.
- 2) Okusaka T, Furuse J, Funakoshi A, Ioka T, Yamao K, Ohkawa S, Boku N, Komatsu Y, Nakamori S, Iguchi H, Ito T, Nakagawa K, Nakachi K. Phase II study of erlotinib plus gemcitabine in Japanese patients with unresectable pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2011;102(2):425-31.
- 3) Furuse J, Okusaka T, Bridgewater J, Taketsuna M, Wasan H, Koshiji M, Valle J.

- Lessons from the comparison of two randomized clinical trials using gemcitabine and cisplatin for advanced biliary tract cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;80(1):31-9.
- 4) Suzuki E, Furuse J, Ikeda M, Ishii H, Okusaka T, Nakachi K, Mitsunaga S, Ueno H, Morizane C. A phase I/II study of combined chemotherapy with mitoxantrone and uracil/tegafur for advanced hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2011;41(3):328-33.
- 5) 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 Dec;101(12):2606-11.
- 6) 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 Nov;30(10):1427-38.
- 7) Sato K, Sato T, Furuse J, Kasugai H, Konishi M, Kosuge T, Saito A, Sasaki Y, Takasaki K, Okusaka T. A conundrum for randomized controlled trials: experience from a small hepatocellular carcinoma trial. *Jpn J Clin Oncol*. 2010 Oct;40(10):949-53.
- 8) Furuse J. Targeted therapy for biliary-tract cancer. *Lancet Oncol*. 2010 Jan;11(1):5-6.
- 9) Nakachi K, Furuse J, Kinoshita T, Kawashima M, Ishii H, Ikeda M, Mitsunaga S, Shimizu S. A phase II study of induction chemotherapy with gemcitabine plus S-1 followed by chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 Aug;66(3):527-34.
- 10) Furuse J, Okusaka T, Ohkawa S, Nagase M, Funakoshi A, Boku N, Yamao K, Yamaguchi T, Sato T. A phase II study of uracil-tegafur plus doxorubicin and prognostic factors in patients with unresectable biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009 Dec;65(1):113-20.
- 11) Morizane C, Okusaka T, Furuse J, Ishii H, Ueno H, Ikeda M, Nakachi K, Najima M, Ogura T, Suzuki E. A phase II study of S-1 in gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 Jan;63(2):313-9.
2. 学会発表
- 1) 古瀬純司：肝細胞癌治療におけるソラフェニブの役割とその適正使用について。第47回日本癌治療学会学術集会，横浜市，2009年10月23日
- 2) 古瀬純司：日本から発信するエビデンス～TS-1トライアル。第47回日本癌治療学会学術集会，横浜市，2009年10月24日
- 3) Furuse J：Future perspective; Sorafenib and beyond. Sorafenib. Working Report-Hepatic Cancer. The 20th Asia Pacific Cancer Conference, Tsukuba, 13 November, 2009
- 4) 鈴木英一郎, 古瀬純司, 長島文夫. 消化器がん化学療法における Oncologic emergency の検討. 第107回日本内科学会講演会, 東京, 2010年4月9日

- 5) 古瀬純司. 教育講演. 肝・胆道・膵癌の標準治療－化学療法的位置づけ. 19回日本癌病態治療研究会, 東京, 2010年7月1日
- 6) 古瀬純司. 肝細胞がんにおける分子標的治療の新たな展開. 第48回日本癌治療学会学術集会, 京都市, 2010年10月28日
- 7) 古瀬純司. 肝・胆道・膵がんにおける分子標的治療. 第43回日本内科学会中国地方会生涯教育講演会, 岡山市, 2010年11月14日
- 8) 古瀬純司, 廣川智, 北村浩, 高須充子, 長島文夫: 肝癌の薬物療法の現状と今後の展望. シンポジウム: 肝癌治療の最前線. 第28回日本医学会総会第28回日本医学会総会 学術講演. 2011年4月, 東京
- 9) Furuse J, Ikeda M: Controversies in the treatment indication of TACE and sorafenib for advanced HCC. ASCO/JSMO joint symposium. 第9回日本臨床腫瘍学会学術集会. 2011年7月21日, 横浜市
- 10) Furuse J, Sasaki Y, Okusaka T, Ikeda M, Nagashima F, Sunakawa Y, Ueno H, Nakachi K, Hashizume K, Ito Y. Phase I study to assess the safety, tolerability and pharmacokinetics of the multikinase inhibitor regorafenib (BAY 73-4506) in Japanese patients with advanced solid tumors. European Society of Medical Oncology 36th Annual Meeting (Abstract #1236), 2011年9月26日, Stockholm.
- 11) 野村久祥, 臼井浩明, 吉田正, 北村浩, 廣川智, 高須充子, 長島文夫, 篠原高雄, 永井茂, 古瀬純司. 高齢者におけるソラフェニブ投与症例の臨床的検討. 口演. 第49回日本癌治療学会学術集会. 2011年10月28日, 名古屋市
- 12) 古瀬純司. 癌ペプチドワクチン療法ガイドランス. Phase III臨床試験. 特別企画. 第24回日本バイオセラピー学会学術集会総会. 2011年12月2日, 和歌山市
- 13) 古瀬純司. がん分子標的治療の進歩. 分子標的治療と保険診療の問題点 第141回 日本医学会シンポジウム. 2011年12月8日, 東京
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
特になし

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）
分担研究報告書

肝硬変・肝癌患者の免疫機構に關与する遊離アミノ酸の研究

上野 義之 東北大学大学院医学系研究科・消化器病態学 准教授
(山形大学医学部内科学第二講座 教授)

研究要旨：肝硬変・肝癌患者では各種免疫細胞の機能異常が知られている。我々は独自に開発した「肝硬変患者の血漿中アミノ酸と一致した無血清培地」を用いることで肝硬変患者に出現するアミノ酸異常が免疫細胞に与える影響を研究している。今回、肝硬変・肝癌患者の腎機能低下時に出現する血漿L-Cystine (L-Cys) / L-Glutamine (L-Glu) 不均衡が、輸送体xCTを介してL-Cys / L-Glu交換輸送を促進させ単球からのTNF-alphaの産生を増加させることをin vitroで明らかにした。更に、実際の肝硬変・肝癌患者単球をex vivoで解析しても一致した結果であった。この結果は進行した肝硬変・肝癌患者における単球系細胞の機能異常の一つの原因と考えられる。

A. 研究目的

肝硬変・肝癌患者の腎機能低下時に異常を示す血漿アミノ酸を明らかにし、単球に与える影響を解析する。

肝硬変・肝癌患者からの臨床検体を使用する点について東北大学医学部倫理委員会から既に承認を受けている。(2009-209, 2009-535)

B. 研究方法

- ① 肝硬変・肝癌患者 (n=130) のアミノ酸 41 分析の結果と同日の血清クレアチニン値より求めた eGFR を比較統計する。
- ② 肝硬変患者の血漿中アミノ酸濃度に一致した無血清培地 (ACM) 中で①で同定されたアミノ酸濃度を様々に変更し、健常人・肝硬変・肝癌患者の CD14+単球機能 (表現型、サイトカイン産生能、リンパ球刺激能、酸化ストレスマーカーなど) を解析する。更にそのアミノ酸輸送体についても解析する。
(倫理面への配慮)

C. 研究結果

- ① 血漿アミノ酸 41 分析の中で L-Cystine (L-Cys) が同日の eGFR と有意な負の相関関係を認めた。
- ② In vitro において ACM 中の L-Cys 濃度を増加させると LPS 刺激時に単球からの TNF-alpha の産生が増加した。
- ③ L-Cys は L-Glutamate (L-Glu) と輸送体 xCT で交換輸送されることが過去の報告で知られているが、単球系細胞株である THP-1 の細胞内・外の L-Cys / L-Glu の移動を HPLC で測定したところ ACM 中の L-Cys 濃度を高めることで細

胞内の L-Cys が増加し L-Glu の細胞外への流出が増加した。このアミノ酸移動は LPS 刺激時の CD14+単球でも同様であった。一方で細胞外の L-Glu 濃度を過剰にするとこの交換輸送は阻害された。更に、酸化ストレスマーカーの一つである還元型 GSH が L-Cys 濃度を高めることで低下した。

- ④ 非代償性肝硬変患者 (Child-Phgh grade B=10, C=6) から採取した単球の TNF- α , xCT の mRNA 発現は有意に健常人 < Child-B < Child C の順に発現が高値であった。更に、L-Cys / L-Glu 比を高値群 (≥ 1) と低値群 (< 1) で比較すると有意に高値群で単球中の mRNA が高かった。最後に肝硬変患者 (n=40) の血漿中の TNF- α と L-Cys / L-Glu 比に有意な正の相関関係を認めた。

D. 考察

進行した肝硬変・肝がん患者において腎機能が低下すると血漿 L-Cys / L-Glu 不均衡が出現する。更にこの不均衡は CD14+単球に酸化ストレスを与え TNF- α の産生を高めていることが in vitro / ex vivo の検討で明らかとなった。

E. 結論

進行した肝硬変に出現する L-Cys / L-Glu 不均衡は単球の xCT を介した L-Cys / L-Glu 交換輸送を促進し TNF- α の産生を増加させる。この事は進行した肝硬変・肝癌患者では単球系細胞が正常な機能を果たせない一つの原因と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kakazu E, Ueno Y, Kondo Y, Inoue J, Ninomiya M, Kimura O, Wakui Y, Fukushima K, Tamai K, and Shimosegawa T. Plasma L-cystine/L-glutamate imbalance increases tumor necrosis factor- α from CD14+ circulating monocytes in patients with advanced cirrhosis. *PLoS one* 6: e23402, 2011.
- 2) Glaser S, Gaudio E, Renzi A, Mancinelli R, Ueno Y, Venter J, White M, Kopriva S, Chiasson V, DeMorrow S, Francis H, Meng F, Marzioni M, Franchitto A, Alvaro D, Supowit S, DiPette DJ, Onori P, and Alpini G. Knockout of the neurokinin-1 receptor reduces cholangiocyte proliferation in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: G297-305, 2011.
- 3) Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, Fukushima K, Kondo Y, Kakazu E, Ninomiya M, Niitsuma H, and Shimosegawa T. Enhanced replication of hepatitis B virus with frameshift in the precore region found in fulminant hepatitis patients. *J Infect Dis* 204: 1017-1025, 2011.
- 4) 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, Kobayashi T, Niitsuma H, Kon S, and Shimosegawa T. Hepatitis B virus replication could enhance regulatory T cell activity by producing soluble heat shock protein 60 from hepatocytes. *J Infect Dis* 202: 202-213, 2010.

- 5) Glaser S, Wang M, Ueno Y, Venter J, Wang K, Chen H, Alpini G, and Holterman A. Differential transcriptional characteristics of small and large biliary epithelial cells derived from small and large bile ducts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G769-777, 2010.
- 6) Fukushima K, Ueno Y, and Shimosegawa T. Treatment of Primary Biliary Cirrhosis: A new challenge? *Hepatol Res* 40: 61-68, 2010.
- 7) Glaser S, Lam IP, Franchitto A, Gaudio E, Onori P, Chow BK, Wise C, Kopriva S, Venter J, White M, Ueno Y, Dostal D, Carpino G, Mancinelli R, Butler W, Chiasson V, DeMorrow S, Francis H, and Alpini G. Knockout of secretin receptor reduces large cholangiocyte hyperplasia in mice with extrahepatic cholestasis induced by bile duct ligation. *Hepatology* 52: 204-214, 2010.
- 8) Obara N, Fukushima K, Ueno Y, Wakui Y, Kimura O, Tamai K, Kakazu E, Inoue J, Kondo Y, Ogawa N, Sato K, Tsuduki T, Ishida K, and Shimosegawa T. Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice. *J Hepatol* 53: 326-334, 2010.
- 9) Woo K, Sathe M, Kresge C, Esser V, Ueno Y, Venter J, Glaser SS, Alpini G, and Feranchak AP. Adenosine triphosphate release and purinergic (P2) receptor-mediated secretion in small and large mouse cholangiocytes. *Hepatology* 52: 1819-1828, 2010.
- 10) 嘉数英二、上野義之、下瀬川徹 肝硬変に出現する血漿アミノ酸不均衡が免疫機構に与える影響 **肝胆膵** 63 (3): 375-382, 2011
2. 学会発表
- 1) 上野義之 L-CystineはLPS刺激時の単球からのTNF- α 産生を高め、非代償性肝硬変の腎機能低下に関与する JDDW2010/横浜
- 2) 上野義之 非代償性肝硬変で出現するL-Cystine / L-Glutamic acid不均衡はLPS刺激時の単球からのTNF- α 産生を高め、腎機能低下に関与する 第97回日本消化器病学会総会・東京
- 3) 上野義之 非代償性肝硬変に出現する血漿中L-Cystine / L-Glutamate不均衡は交換輸送体xCTを介してCD14+単球からの炎症性サイトカイン産生を増加させる 第47回日本肝臓学会総会・東京
- 4) 上野義之 非代償性肝硬変に出現する血漿L-Cystine / L-Glutamate不均衡はCD14+単球内の還元型グルタチオンを低下させ炎症性サイトカインを増加させる JDDW2011 福岡
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

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）
分担研究報告書

肝臓における細胞性免疫応答の検討

広石 和正 昭和大学医学部消化器内科 准教授

研究要旨：肝細胞癌で高頻度に発現するMAGE-1抗原、Glypican-3抗原、NY-ESO-1抗原に対する腫瘍特異性T細胞応答と臨床経過との関連を検討することを目的に、3種の腫瘍抗原由来の合成ペプチドに対する患者末梢CD8陽性細胞のIFN- γ 産生能をELISpot法で評価し、肝臓治療経過中の免疫応答を測定した。80%の症例で癌抗原特異的なELISpot陽性の免疫応答が認められた。多変量解析の結果、治療後の癌抗原に対する免疫応答だけが無再発期間と関連が認められた。強い免疫応答がみられても、治療後も癌が残存している場合は予後不良であった。治療の前後で免疫応答がみられるペプチドはほとんどの症例で異なっており、肝臓治療が患者の免疫応答に影響を与えることが示唆された。また、肝臓癌が再発すると、免疫応答が減弱する例がみられた。さらに、ELISpot法でGlypican-3抗原内に、臨床経過に関連するHLA-B35拘束性の新規CTLエピトープを同定した。今回の検討から、特定の肝臓癌特異的細胞障害性T細胞応答が、肝臓癌再発を抑制できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝細胞癌は局所療法や集学的治療の発展により、制御可能な症例が増加してはいるがまだ治療困難な症例も多く、副作用が少なくかつ効果的な新規治療の開発が急務である。その点で免疫療法が期待されているが、これまでには優れた治療効果を示すものは報告されていない。本研究は、肝細胞癌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T細胞応答と患者の臨床経過との関連を検討して肝臓癌に対する免疫応答が臨床経過に及ぼす影響を考察し、肝細胞癌特異的CTLが認識する癌抗原エピトープを同定することで、将来的な肝臓癌免疫治療の確

立を目指すことを目的に行った。

B. 研究方法

MAGE-1抗原、Glypican-3抗原、NY-ESO-1抗原、それぞれの全長を網羅し、10アミノ酸ずつオーバーラップする20アミノ酸のペプチドを作成した。27例の肝臓癌患者を対象に、3種の腫瘍抗原由来の合成ペプチドに対する患者末梢CD8陽性細胞のIFN- γ 産生能を、ELISpot法で評価した。そして、腫瘍抗原特異的免疫応答と臨床経過とを比較検討した。また、強い免疫応答を認めたペプチドをもとに、エピトープとなり得る10-merペプチドを作製し、患者またはHLAの一致した健常者のCD8陽性細

胞を利用して抗原エピトープの同定を試みた。

(倫理面への配慮)

昭和大学倫理委員会に研究実施申請書を提出し、倫理規定と照合された結果、研究実施の承認を得た。肝癌患者に研究内容を説明し、研究への参加同意書を書面で取得した。

C. 研究結果

- 80%の症例で癌抗原特異的な ELISpot 陽性 (SFC \geq 10) の免疫応答が認められた。
- 単変量解析により、血小板数、プロトロンビン時間、治療後の癌特異的 CD8 陽性細胞の免疫応答が、無再発期間に関連していた。
- 多変量解析の結果、治療後の癌抗原に対する免疫応答だけが無再発期間と関連することがわかった。
- 治療前の SFC 数や肝癌の大きさ、個数などと無再発期間に関連は認められなかった。
- 腫瘍抗原ペプチドに対し強い免疫応答を示した症例は、治療前 22%、治療後 33%だった。
- CD8 陽性細胞が反応する癌抗原ペプチドには、治療前後で差異がみられた。
- 肝癌多発例や治療が不完全な症例では、腫瘍抗原特異的 IFN- γ 産生がみられても予後は不良であった。
- 肝癌治療後無再発期間は腫瘍抗原特異的免疫応答が強くみられ、肝癌が再発を繰り返すようになると、免疫応答が減弱する症例がみられた。

- 強い免疫応答を認めた患者の末梢 CD8 陽性 T 細胞を利用して抗原エピトープの同定を試みたところ、Glypican-3 について HLA-B35 拘束性の新規抗原エピトープ GPC3₂₈₆₋₂₉₅ (MAGVVEIDKY) が存在することが確認された。

D. 考察

肝癌局所治療後に癌抗原に対し強く免疫応答が認められる症例では、再発までの期間が長いことがわかった。また、症例によっては、腫瘍特異的免疫応答が肝癌再発を抑制することも示唆され、免疫応答を増強させるような治療の有効性が考えられた。ペプチドワクチン免疫療法を行う際には、個々に適切なペプチドを選択することが重要であると考えられ、そのためにも、肝細胞癌特異的 CTL が認識する癌抗原エピトープの解析、同定が必要であると考えられた。

E. 結論

肝癌局所治療が免疫応答に影響を及ぼしていることが示唆された。ある特定の腫瘍特異的 CTL が肝癌再発を抑制する可能性があると考えられ、応答のみられた癌抗原ワクチン投与の臨床応用が十分期待できるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kajiwara A, Doi H, Eguchi J, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Omori R, Hiroishi K, Imawari M. IL-4 and CpG therapy suppresses the outgrowth of tumors by activating tumor-specific Th1-Type immune

- responses. *Oncology Reports* (in press)
- 2) Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H, Imawari M. Genetic polymorphism in cyclooxygenase-2 promoter affects hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis* (in press)
 - 3) Inokuchi M, Ito T, Nozawa H, Miyashita M, Morikawa K, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Arai J, Shimazaki T, Hiroishi K, Imawari M. Lymphotropic Hepatitis C Virus Has an Interferon-Resistant Phenotype. *Journal of Viral Hepatitis* (in press)
 - 4) 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. Strong CD8+ T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*, 2010; 45 (4): 451-458.
 - 5) Hiroishi K, Eguchi J, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Omori R, Imawari M. Immune response of cytotoxic T lymphocytes and possibility of vaccine development for hepatitis C virus infection. *J Biomed Biotech*. 2010:263810.
 - 6) Shimozuma Y, Ito T, Inokuchi M, Uchikoshi M, Miyashita M, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K, Imawari M. Reactivation of Epstein-Barr virus in B cells of patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*, 2010; 82 (12): 2064-2072.
 - 7) Sakaki M, Makino R, Hiroishi K, Ueda K, Eguchi J, Hiraide A, Doi H, Omori R, Imawari M. Cyclooxygenase-2 gene promoter haplotypes affect susceptibility to hepatitis C virus infection and disease progression. *Hepatol Res*, 2010; 40 (12):1219-26.
 - 8) Inokuchi M, Ito T, Uchikoshi M, Shimozuma Y, Morikawa K, Nozawa H, Shimazaki T, Hiroishi K, Miyakawa Y, Imawari M. Infection of B cells with hepatitis C virus for the development of lymphoproliferative disorders in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 2009; 81(4): 619-27.
2. 学会発表
- 1) Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Omori R, Kajiwara A, Imawari M. Efficacy and mechanism of Dendritic cell based immunotherapy in combination with Programmed cell death 1 blockade on murine hepatocellular carcinoma model. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.
 - 2) Sasagawa A, Kajiwara A, Ohmori R, Ishii S, Eguchi J, Hiroishi K, Imawari M. Expression of inhibitory molecules on peripheral blood lymphocytes are up-regulated in autoimmune hepatitis. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.
 - 3) Uchikoshi M, Ito T, Shimozuma Y, Inokuchi M, Miyashita M, Arai J, Hiroishi K, Imawari M. Fluctuation pattern of serum

- complement levels during pegylated interferon and ribavirin therapy is closely associated with the outcome in patients with chronic hepatitis C. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.
- 4) Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H, Imawari M. The -1195 G>A cyclooxygenase-2 promoter polymorphism is associated with hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.
- 5) 江口潤一、広石和正、井廻道夫. 消化器癌に対する免疫療法の検討. 第 53 回日本消化器病学会大会. 福岡. 2011.
- 6) 大森里紗、江口潤一、梶原敦、土肥弘義、坂木理、平出綾子、石井成明 広石和正、井廻道夫. 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. 第 53 回日本消化器病学会大会. 福岡. 2011.
- 7) 平出綾子、広石和正、井廻道夫. 自己免疫性肝炎患者における末梢リンパ球抑制性マーカーの検討. 第 15 回日本肝臓学会大会. 福岡. 2011.
- 8) 石井成明、広石和正、江口潤一、平出綾子、大森里紗、梶原敦、井廻道夫. マウス肝癌に対するサイトカイン遺伝子導入 allogenic 癌細胞による免疫療法. 第 47 回日本肝臓学会総会. 東京. 2011.
- 9) 宮下みゆき、伊藤敬義、坂木理、梶原敦、広石和正、小林万里子、熊田博光、井廻道夫. C 型慢性肝炎活動性及び線維化への COX-2 プロモーター領域(-1195G>A)遺伝子多型の関与. 第 47 回日本肝臓学会総会. 東京. 2011.
- 10) 打越学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫. PEG-IFN、リバビリン療法中の治療前血清補体値および治療中補体値動態による治療効果予測. 第 47 回日本肝臓学会総会. 東京. 2011.
- 11) 井口桃子、伊藤敬義、打越学、下間祐、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫. B 型慢性肝炎患者におけるリンパ増殖性疾患関連マーカー異常. 第 47 回日本肝臓学会総会. 東京. 2011.
- 12) Miyashita M, Ito T, Sakaki M, Atsushi Kajiwara, Nozawa H, Hiroishi K, Kobayashi M, Kumada H and Imawari M. The -1195 G>A cyclooxygenase-2 promoter polymorphism is associated with hepatic inflammation and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. 46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Berlin. 2011
- 13) 石井成明、広石和正、井廻道夫. HCV 感染における特異的 T 細胞免疫応答の検討. 第 38 回日本肝臓学会東部会. 東京. 2010.
- 14) 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. 2010.
- 15) 広石和正、江口潤一、井廻道夫. 肝細胞癌患者における癌抗原特異的細胞性免疫応答. 第14回日本肝臓学会大会. 横浜. 2010.
- 16) 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. 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. 第52回日本消化器病学会大会. 横浜. 2010.
- 17) 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. 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. 第46回日本肝臓学会総会. 山形. 2010.
- 18) 下間祐、伊藤敬義、井口桃子、打越学、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫. HCV感染が惹起するB細胞におけるEBV再活性化. 第46回日本肝臓学会総会. 山形. 2010.
- 19) 打越学、伊藤敬義、井口桃子、下間祐、宮下みゆき、広石和正、井廻道夫. C型慢性肝炎患者におけるB細胞異常関連マーカーと抗ウイルス療法反応性との関連. 第46回日本肝臓学会総会. 山形. 2010.
- 20) 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. 肝癌におけるHLA拘束性Glypican -3エピトープの同定. 第96回日本消化器病学会総会. 新潟. 2010.
- 21) Tumor associated antigen-specific CD8+ T-cell responses would suppress recurrence of hepatocellular carcinoma. Hiroishi, K., Doi, H., Baba, T., Eguchi, J., Ishii, S., Hiraide, A., Sakaki, M., Uchikoshi, M., Shimozuma, Y., Ohmori, R., Ito, T., Imawari, M. The Liver Meeting 2009, The 60th Annual Meeting of The American Association for The Study of Liver Diseases. Boston. 2009.
- 22) 肝細胞癌患者の腫瘍抗原特異的細胞性免疫応答と治療後肝癌再発に関する検討. 広石和正、土肥弘義、江口潤一、石井成明、平出綾子、坂木理、大森里紗、伊藤敬義、馬場俊之、井廻道夫. 第13回日本肝臓学会大会. 京都. 2009.
- 23) C型肝炎におけるCTLエピトープの同定とCTL応答の解析. 広石和正、江口潤一、石井成明、平出綾子、土肥弘義、井廻道夫. 第45回日本肝臓学会総会. 神戸. 2009.
- 24) インターロイキン - 4とCpGを用いた消化器癌に対する免疫療法の検討. 土肥弘義、広石和正、江口潤一、石井成明、平出綾子、坂木理、井廻道夫. 第95回日本消化器病学会総会. 札幌. 2009.
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
特になし

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）
分担研究報告書

インターフェロンによる血管新生抑制を介した抗腫瘍効果発現の基礎的検討

西口 修平 兵庫医科大学内科学肝胆膵科 教授

研究要旨： インターフェロン（IFN） α/β は抗ウイルス作用に加えて抗腫瘍効果を有しており、われわれは肝癌局所治療後のIFN治療が、有意に再発を抑制することを報告している。

本研究ではまずIFNの肝癌に対する抗腫瘍効果について検討し、IFNは血管内皮細胞および肝癌細胞に対して増殖抑制能とアポトーシス誘導能を有することを明らかにした。また血管新生を主要なターゲットとする分子標的薬SorafenibとIFNをマウス担癌モデルに対して単独あるいは併用投与し、SorafenibとIFNはいずれも単剤投与でも*in vivo*において血管新生の抑制効果と腫瘍壊死効果を示したが、両者の併用投与によってさらにこれらの効果が増強されることを見出した。また*in vivo*におけるIFNによるSorafenibの抗腫瘍効果増強の機序についての機序に関する検討を行い、Sorafenib単独の場合に比して、IFNの併用によってアポトーシス関連遺伝子群の発現増強と、同時に血管新生や細胞増殖シグナル関連遺伝子群の発現低下を生じることが明らかとなった。以上の結果から、肝癌に対する両薬剤の併用療法はSorafenibの効果を増強させ、有効な新規治療となることが示唆された。

共同研究者

榎本平之 兵庫医科大学肝胆膵科 講師

辻村 亨 兵庫医科大学分子病理部門 教授

A. 研究目的

癌組織の形成・増大には癌細胞の増殖のみならず周囲組織との相互作用が必要であり、特に血管新生の誘導は重要と考えられている。インターフェロン（IFN） α/β は抗ウイルス作用に加えて抗腫瘍効果を有しており、肝細胞癌においても抗癌剤との併用や根治治療後の再発予防における有効性が報告されている。したがって分子標的薬

SorafenibとIFNの併用療法は、肝癌に対する新たな有効性の高い治療となることが期待される。

そこで本研究では、SorafenibとIFNの併用が肝癌に対する新規治療となりうるかを明らかにすることを目標として研究を行った。

B. 研究方法

まずIFNの血管新生抑制作用に関し、コラーゲンゲルを用いた tube formation assayによりIFNの血管新生抑制効果を検討し、更にIFN投与による血管内皮細胞

(HUVEC) の増殖とアポトーシスへの影響を検討した。またヒト肝癌細胞株 Hep3B を培養し、マウスインターフェロン (mIFN) とヒトインターフェロン (hIFN) による細胞増殖抑制効果を *in vitro* で比較した。Hep3B 細胞を SCID マウス皮下に移植することで形成される腫瘍に対しても mIFN と hIFN を投与し、*in vivo* における腫瘍増殖抑制効果を比較した。

次いでヒト肝癌細胞株 Hep3B を SCID マウス皮下に移植することで形成される腫瘍に対して、移植 5 週間後から 2 週間連続で Sorafenib (経口投与) あるいは IFN (腫瘍近傍へ注入) を単剤であるいは併用投与して、*in vivo* における腫瘍増殖抑制効果を比較した。またその後腫瘍を摘出して total RNA を抽出し、発現遺伝子の差異について発現アレイによる検討を行った。

IFN の肝癌細胞に対する抗腫瘍効果の機序について、Sorafenib の作用との関連を含め *in vitro* で検討を行った。Hep3B 細胞に *in vitro* で Sorafenib または IFN を作用させ、24 時間後に total RNA を抽出してこれらの薬剤によって発現が変動する遺伝子について発現アレイによって検討した。なお本研究は兵庫医科大学の遺伝子実験および動物実験委員会の審査と承認を受けて行われている。

C. 研究結果

コラーゲンをを用いた tube formation assay により IFN の *in vitro* での血管新生抑制作用が確認された (図 1)。

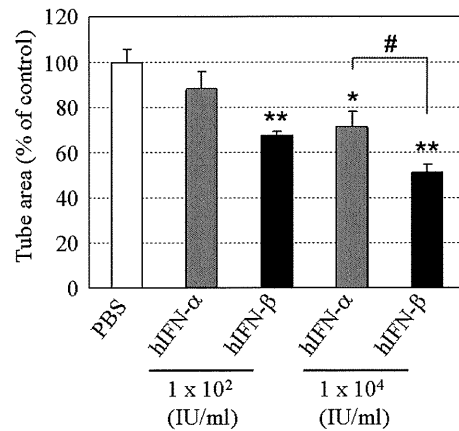


図 1 IFN による tube formation 抑制効果

また IFN の HUVEC に対する *in vitro* での増殖抑制効果、およびアポトーシス誘導効果が認められた (図 2 および図 3)。すなわち、IFN による血管新生抑制の機序として血管内皮細胞の増殖抑制とアポトーシス誘導があることが確認された。

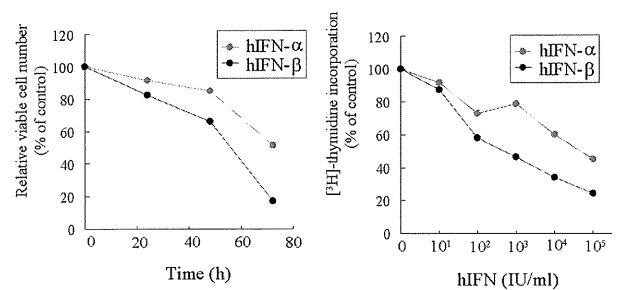


図 2 IFN による HUVEC の増殖抑制効果

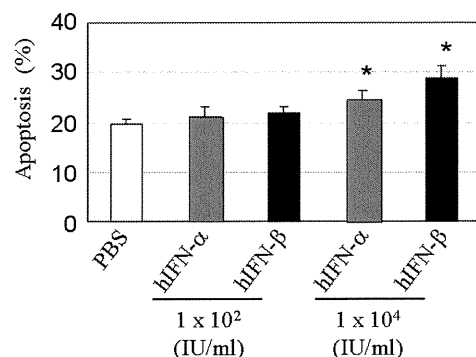


図 3 IFN による HUVEC のアポトーシス誘

導

一方肝癌細胞株 Hep3B を用いた検討から、IFN の肝癌細胞に対する *in vitro* での増殖抑制効果、およびアポトーシス誘導効果も認められた。またこの Hep3B 細胞に対する効果は mIFN よりも hIFN で強く認められた (図 4 および図 5)。

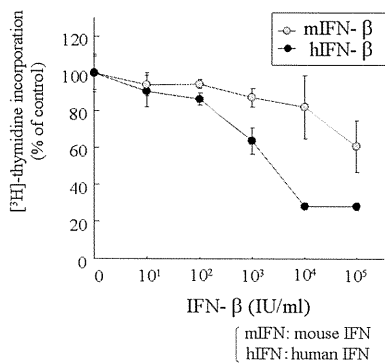


図 4 IFN による Hep3B 細胞の増殖抑制効果

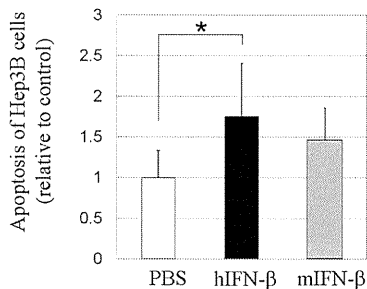


図 5 IFN による Hep3B 細胞のアポトーシス誘導効果

以上の *in vitro* での検討結果から肝癌に対する IFN の抗腫瘍効果の機序として、癌細胞の増殖抑制作用と血管新生抑制作用の両者が存在すると考えられた。

次いで Hep3B 細胞を SCID マウス皮下に移植することで腫瘍を形成させ、IFN の *in*

vivo における抗腫瘍効果を検討した。すると組織学的検討では、mIFN 投与では hIFN 投与に比較して広範な壊死が認められ (図 6)、また新生血管形成も mIFN によって強く抑制されていた (図 7)。

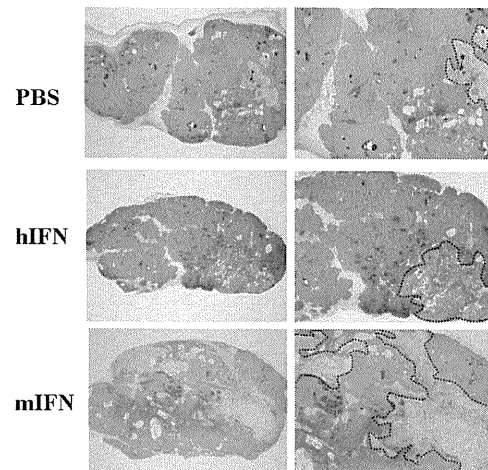


図 6 IFN による腫瘍壊死効果 (点線で囲った部位が壊死部分)

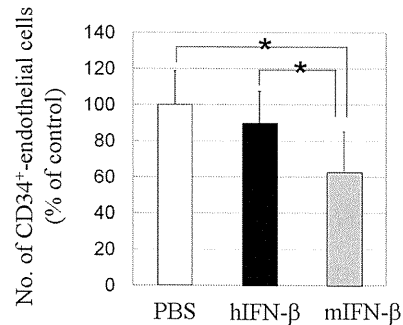


図 7 IFN による *in vivo* 血管新生抑制効果

以上の結果から IFN の作用機序として血管新生抑制を中心とした間質への作用の重要性が示唆されたため、次いで Sorafenib と IFN の併用による抗腫瘍効果に関して検討を行った。

肝癌由来 Hep3B 細胞を培養し、SCID マウスの皮下に移植して腫瘍を形成させ、移植 5 週間後から 2 週間連続で Sorafenib と

IFN を単剤あるいは併用投与を行った。投与終了時点で①対象群、②Sorafenib 投与群、③IFN 投与群、④Sorafenib+IFN 併用投与群、これら4群間では腫瘍サイズには有意な差は認められなかった (図8)。

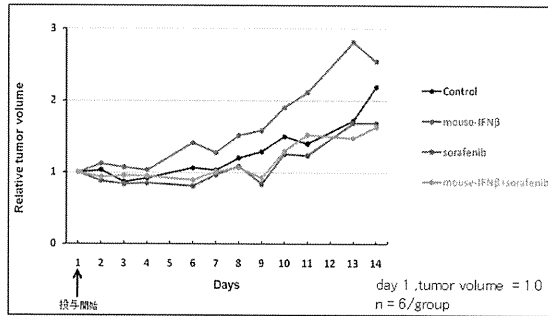


図8 Sorafenib および IFN 投与の腫瘍サイズへ及ぼす効果

しかしながらパラフィン切片を薄切し、HE 染色を行ったところ、①対照群に比して②Sorafenib 投与群、あるいは③IFN 投与群では腫瘍内の壊死範囲が広く認められ、④Sorafenib+IFN 併用投与群では更に著明であった (図9)。

また顕微鏡観察によって壊死領域を定量化することで、Sorafenib, IFN 単剤投与群に比して Sorafenib+IFN 併用投与群でのより強い腫瘍壊死効果が確認された (図10)。

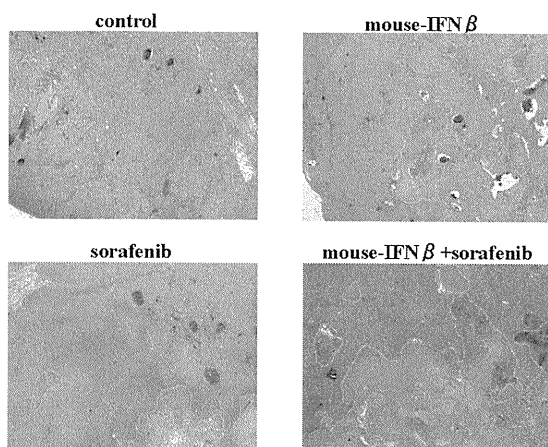


図9 Sorafenib および IFN による腫瘍壊死効果

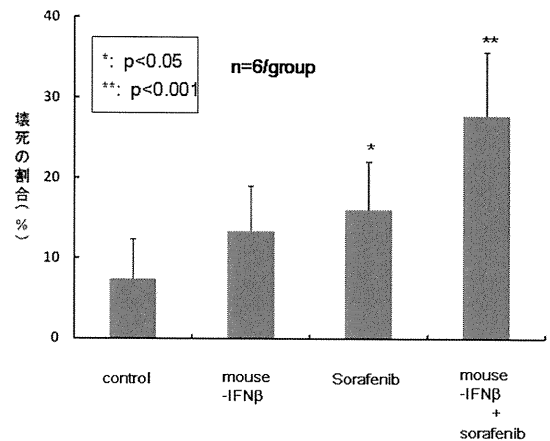


図10 Sorafenib と IFN の腫瘍壊死効果の定量的評価

さらに凍結切片を作成して免疫染色を行い、腫瘍血管を同定したところ、①対照群に比して②Sorafenib 投与群、③IFN 投与群では腫瘍血管は減少しており、この傾向は④Sorafenib+IFN 併用投与群ではより著明であった (図11)。

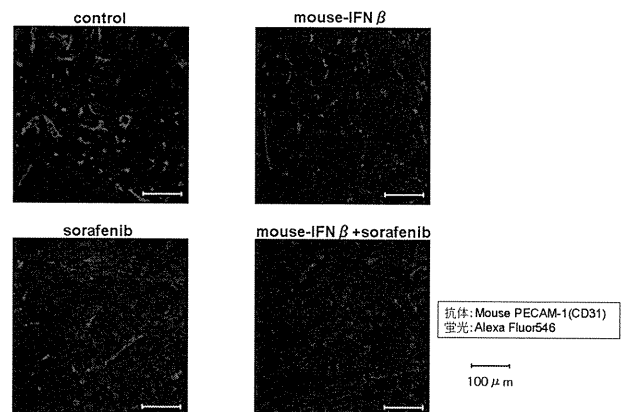


図11 Sorafenib および IFN による腫瘍血管抑制効果

また血管内皮細胞を計測することで、Sorafenib, IFN 単剤投与群に比して Sorafenib+IFN 併用投与群でのより強い

血管新生抑制効果が確認された (図 12)。

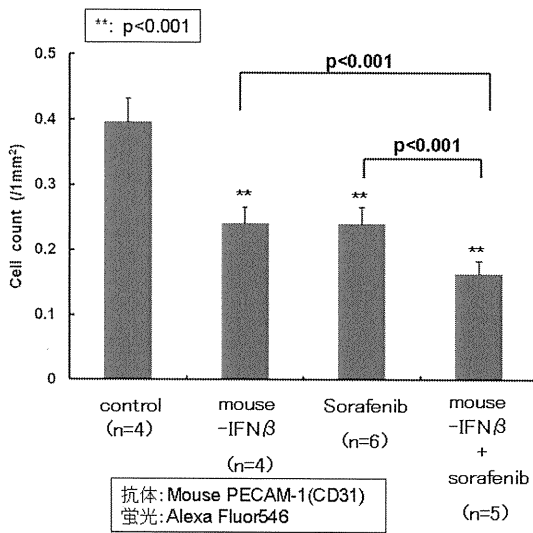


図 12 Sorafenib と IFN による腫瘍血管抑制効果の定量的評価

以上の *in vivo* での検討結果から、肝癌モデルに対して Sorafenib と IFN は各々単剤でも腫瘍壊死効果と血管新生の抑制作用を有するが、両者の併用によってその効果が増強されることが判明した。

そこで Sorafenib・IFN 併用による抗腫瘍効果増強の機序を明らかとするために、Sorafenib 単剤投与と Sorafenib+IFN の併用投与を行った各々の腫瘍組織を摘出し、BRB-Array Tools Version: 4.1.0167 を用いて発現遺伝子の解析を行った。合計 167 のシグナル伝達経路における遺伝子群の発現について Pathway 解析を行ったところ、そのうち 22 の経路において発現遺伝子群の有意な差が認められた。

図 13 に主な増強あるいは減弱するシグナル伝達経路を示すが、Sorafenib + IFN 併用群では、Sorafenib 単剤投与群に比してアポトーシス関連遺伝子群の発現亢進が認められ、一方で細胞増殖関連遺伝子群や

VEGF の血管新生関連遺伝子群の減弱が認められた。したがって *in vivo* の xenograft モデルに対する腫瘍間質・血管新生を標的とした IFN の作用は、アポトーシス誘導や VEGF シグナルの抑制によって Sorafenib の抗腫瘍効果を高めることが考えられた。

Pathway 名称	遺伝子数	シグナル	P値
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	57	増強	< 0.005
Apoptosis	81	増強	< 0.005
Cytokine-cytokine receptor interaction	175	減弱	< 0.005
Streptomycin biosynthesis	10	減弱	< 0.005
2,4-Dichlorobenzoate degradation	5	減弱	< 0.005
Type II diabetes mellitus	43	減弱	< 0.005
Insulin signaling pathway	136	減弱	< 0.005
Colorectal cancer	84	減弱	< 0.005
Inositol phosphate metabolism	46	減弱	< 0.005
Fc epsilon RI signaling pathway	70	減弱	< 0.005
Adherens junction	80	減弱	< 0.005
VEGF signaling pathway	71	減弱	0.035
MAPK signaling pathway	270	減弱	0.035

図 13 Sorafenib の単剤投与と IFN の併用投与の両者において遺伝子群の発現の差が認められる主なシグナル伝達経路

ところで実際のヒト肝癌症例への治療応用を考えると、マウスモデルとは異なり IFN は腫瘍間質の細胞以外に肝癌細胞に対しても作用する。したがって肝癌細胞に対する IFN の作用に関しても検討が必要であるため、Sorafenib の作用との関連を含めて *in vitro* での検討を行った。

Hep3B 細胞を *in vitro* で培養して Sorafenib と IFN を各々 24 時間作用させ、採取した細胞の遺伝子発現パターンを検討したところ、Sorafenib および IFN によって 2 倍以上に発現誘導される遺伝子群が、各々 124 個と 25 個同定された (図 14)。また Sorafenib および IFN によって 2 分の 1 以下に発現抑制される遺伝子群については、各々 80 個と 38 個同定された (図 15)。興味深いことに、IFN で発現誘導される遺

伝子は、Sorafenib で誘導される遺伝子と一つも一致しなかった (図 14)。一方で IFN によって抑制される 38 個の遺伝子のうち、大部分の 30 個については Sorafenib によっても抑制される遺伝子であった (図 15)。

以上の *in vitro* の検討からは、IFN は肝癌細胞に対しては Sorafenib とは異なる遺伝子群の誘導を介した作用を有する一方で、Sorafenib と共通した遺伝子群の抑制作用を示すことも示唆された。

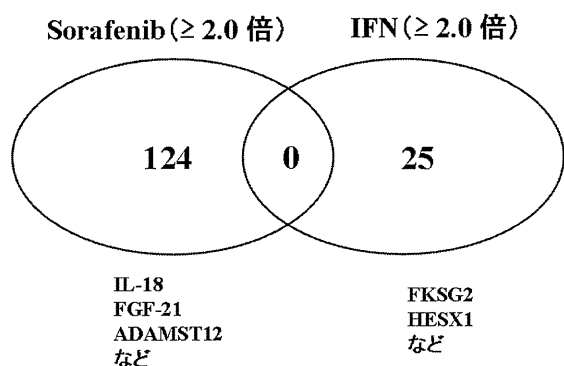


図 14 Sorafenib と IFN によって 2 倍以上の発現が上昇した遺伝子群

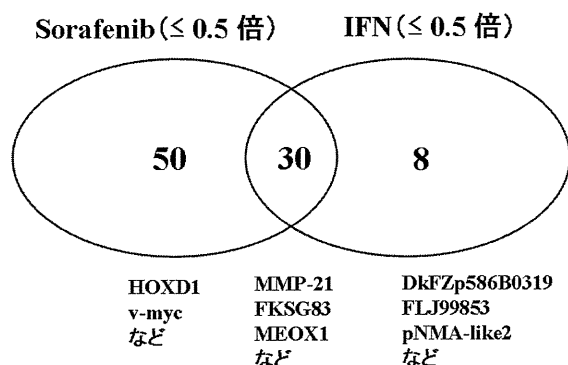


図 15 Sorafenib と IFN によって 0.5 倍以下に発現が低下した遺伝子群

D. 考察

われわれの *in vitro* の検討から、肝癌に対する IFN の抗腫瘍効果の機序には、血

管新生抑制作用と肝癌細胞の増殖抑制作用との両者が存在することが示された。本検討で特徴的なのは *in vitro* と *in vivo* での IFN の効果の違いである。すなわち *in vitro* でのヒト肝癌細胞に対する増殖抑制効果は hIFN が mIFN よりも強い結果であった (図 4)。しかしながら逆に *in vivo* での抗腫瘍効果については、mIFN が hIFN よりも強いという結果が得られた (図 6-7)。われわれの実験で SCID マウスに形成された腫瘍は、ヒト由来の癌細胞とマウス由来の間質細胞から構成される腫瘍である。インターフェロンの作用における種特異性の高さを勘案すれば、腫瘍組織のうちで hIFN は主に肝癌細胞に、一方 mIFN は主に間質組織の細胞に対して作用するものと考えられる。したがって IFN の抗腫瘍効果の機序として、直接的な肝癌細胞の増殖抑制作用のみならず、血管新生抑制を含む間質への作用がより重要であると考えられた。

この結果を受けて分子標的薬 (血管新生阻害剤) である Sorafenib と IFN との併用による抗腫瘍効果増強の可能性の検討を行ったところ、肝癌由来の Hep3B 細胞を移植する Xenograft モデルにおいて Sorafenib, IFN, Sorafenib + IFN いずれの投与群でも腫瘍サイズには有意な差は生じなかった (図 8)。しかしながら腫瘍内部には壊死が誘導され、その効果は Sorafenib, IFN 単剤投与と比較すると両者の併用により増強されていた (図 9 および図 10)。また腫瘍内部での腫瘍血管は Sorafenib, IFN いずれによっても抑制されたが、両薬剤の併用によってより強く抑制された (図 11 および図 12)。したがって Sorafenib と

IFN の併用は *in vivo* モデルに対する抗腫瘍効果の増強をもたらしたと考えられた。

更にこの Sorafenib と IFN の併用で認められた抗腫瘍効果増強の機序を明らかにすることを旨とし、遺伝子発現パターンと比較を行った。すると肝癌由来の Hep3B 細胞を移植する Xenograft モデルにおいて Sorafenib に IFN を併用した場合、血管新生を含む間質への作用としてアポトーシス関連遺伝子の増強や血管新生シグナル・細胞増殖シグナルの抑制が認められた。すなわち IFN は Sorafenib の有する抗腫瘍効果機序を増強させる薬剤であることが考えられた (図 13)。

実際の臨床症例においても腫瘍血管をターゲットとする Sorafenib の有効症例では、しばしば腫瘍の縮小に先立ち血流の低下によると思われる腫瘍内部の壊死がもたらされている。本検討において Sorafenib と IFN の併用投与によって、腫瘍壊死効果が増強されたことは、これらの薬剤の併用療法が臨床的に有用である可能性を示唆している。

肝細胞癌と同じく多血性の腫瘍である腎癌においては、肝癌に先行して Sorafenib の有効性が確立され、更に Sorafenib+IFN による臨床効果の有効性・安全性も既に報告されている。われわれの検討からは、Sorafenib と IFN 両者の併用療法の肝癌に対する有効性が示唆されたため、腎癌症例と同様の臨床応用を目指したいと考えている。また IFN による抗腫瘍効果について更に詳細な機序の解明を進めていきたい。

E. 結論

肝癌に対する IFN の抗腫瘍効果の機序を検討した。IFN は *in vitro* で血管新生と肝癌細胞増殖抑制作用を示し、xenograft モデルを用いた *in vivo* での検討では Sorafenib の抗腫瘍効果を増強させた。またその作用機序としては、アポトーシス関連遺伝子の発現増強や血管新生関連遺伝子・細胞増殖関連遺伝子の発現抑制により Sorafenib の作用を増強させることが考えられた。以上の結果から、IFN の併用は Sorafenib の作用を増強させて抗腫瘍効果を高めることと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto T, Nakamura H, Liu W, Cao K, Yoshikawa S, Enomoto H, Iwata Y, Koh N, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Iijima H, Hada T, Nishiguchi S. Involvement of hepatoma-derived growth factor in the growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells by vitamin K2. *J. Gastroenterol*, 44, 228-235, 2009.
- 2) Enomoto H, Nakamura H, Liu W, Yoshida K, Okuda Y, Imanishi H, Saito M, Shimomura S, Hada T, Nishiguchi S. Hepatoma-derived growth factor is induced in liver regeneration. *Hepatol. Res.* 39, 988-997, 2009.
- 3) Cao K, Liu W, Nakamura H, Enomoto H, Yamamoto T, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Cao P, Nishiguchi S. Vitamin K2 down-regulates the expression of fibroblast growth factor receptor 3 in human

- hepatocellular carcinoma cells. *Hepatol. Res.* 39, 1108-17, 2009.
- 4) Enomoto H, Nakamura H, Komatsu-Kanatani N, Liu Y, Yoshida K, Okuda Y, Yamamoto T, Liu W., Nishiguchi S. Partial blockage of hepatocyte maturation in hepatoma-derived growth factor transgenic mice. *World J Hepatol*, 1: 98-102, 2009.
 - 5) Liu W, Nakamura H, Deng H, Enomoto H, Yamamoto T, Iwata Y, Koh N, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Nishiguchi S. A higher expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma cells and more tumor growth *in vivo*. *Trends in Cancer Research*, 5, 29-36, 2009.
 - 6) Enomoto H., Nakamura H., Nishiguchi S., Involvement of Hepatoma-derived Growth Factor in the growth of hepatocytes during liver development and regeneration. *Current Research in Hepatology*, 3, 27-35, 2009.
 - 7) Enomoto H, Nakamura H, Nishiguchi S. Role of Hepatoma-derived Growth Factor in hepatocyte proliferation and differentiation. *Current Research in Gastroenterology & Hepatology*, 4, 79-88, 2010.
 - 8) Shimomura S, Ikeda N, Saito M, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Yoshikawa S, Aizawa N, Tanaka H, Imanishi H, Iwata Y, Enomoto H, Nishiguchi S. Long-term interferon therapy after radiofrequency ablation is effective in treating patients with HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*, 5, 559-66, 2011.
 - 9) Enomoto H, Nakamura H, Nishiguchi S. Role of Hepatoma-derived Growth Factor(HDGF) in Hepatocellular carcinoma. *Current Research in Gastroenterology & Hepatology*, 5, 19-26, 2011.
 - 10) Enomoto H, Nakamura H, Nishiguchi S. The Role of Hepatoma-derived Growth Factor(HDGF) in cancer development and progression. *Current Research in Cancer*, 5, 11-25, 2011.
 - 11) Shimomura S, Nishiguchi S. Anticarcinogenic impact of interferon therapy on the progression of hepatocellular carcinoma in patients with chronic viral infection. *Hepatol Res.* 5:559-566, 2012.
 - 12) Tanaka H, Iijima H, Nouse K, Aoki N, Iwai T, Takashima T, Sakai Y, Aizawa N, Iwata K, Ikeda N, Iwata Y, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Nishiguchi S. Cost-effectiveness analysis on the surveillance for hepatocellular carcinoma in liver cirrhosis patients using contrast-enhanced ultrasonography. *Hepatol Res.* (*in press*)
- ## 2. 学会発表
- 1) Enomoto H, Tsujimura T, Nakamura H, Imanishi H, Saito M, Yamamoto T, Iwata Y, Tanaka H, Shimomura S, Iijima H, Nishiguchi S. Analyses of the antiangiogenic and antitumor effects of interferons. The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2009) 2009. 11 Boston.
 - 2) Iijima H, Tanaka H, Aizawa N, Ikeda N, Enomoto H, Saito M, Imanishi H, Shimomura S, Iimuro Y, Fujimoto J, Nishiguchi S. Malignant grading system using the contrast enhanced agent

- “Sonazoid” could predict portal venous invasion by Hepatocellular carcinoma? The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2010) 2010. Oct. Boston.
- 3) Enomoto H, Nakamura H, Imanishi H, Iwai T, Takashima T, Aizawa N, Sakai Y, Iwata K, Ikeda N, Tanaka H, Iwata Y, Saito M, Iijima H, Nishiguchi S. Hepatoma-derived growth factor as a potential target molecule for the treatment of hepatocellular carcinoma. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2011) 2011. Nov. San Francisco.
- 4) 榎本平之, 辻村亨, 今西宏安, 齋藤正紀, 康典利, 田中弘教, 岩田恵典, 山田大輔, 石井昭生, 坂井良行, 吉川昌平, 會澤信弘, 山本晃久, 下村壯治, 中村秀次, 飯島尋子, 西口修平. インターフェロンによる肝癌増殖抑制機序の検討. 第45回日本肝臓学会総会2009.6 神戸.
- 5) 榎本平之, 西口修平, 中村秀次. 肝癌症例におけるHepatoma-derived growth factor(HDGF)の血中濃度測定に関する検討. 第96回日本消化器病学会総会 2010.4 新潟.
- 6) 田中弘教, 飯島尋子, 岩井孝史, 楊和典, 石井昭生, 高嶋智之, 坂井良行, 會澤信弘, 山本晃久, 池田直人, 岩田恵典, 榎本平之, 齋藤正紀, 今西宏安, 下村壯治, 西口修平. 肝癌診断におけるEOB MRIと造影超音波検査の位置づけ. 第46回日本肝臓学会総会 2010.5山形.
- 7) 山本晃久, 高嶋智之, 會澤信弘, 飯島尋子, 金守良, 城村尚登, 奥新浩晃, 菅野雅彦, 二宮俊明, 大岡照二, 瀬尾靖, 廣田誠一, 西口修平. Peg-IFN + RBV併用療法後の天然型IFN α 少量長期投与によるHCV再燃と肝発癌の抑制効果に関する検討. 第46回日本肝臓学会総会 2010.5山形.
- 8) 田中弘教, 飯島尋子, 東浦晶子, 會澤信弘, 西上隆之, 辻村亨, 廣田誠一, 山中潤一, 藤元治朗, 西口修平. 造影超音波検査を用いた肝細胞癌の悪性度評価および分子標的薬治療効果判定. 日本超音波医学会第83回学術集会 2010.5 京都.
- 9) 田中弘教, 飯島尋子, 東浦晶子, 會澤信弘, 西上隆之, 辻村亨, 廣田誠一, 山中潤一, 藤元治朗, 西口修平. 造影超音波検査による肝癌悪性グレード分類を用いた門脈侵襲予測. 日本超音波医学会第83回学術集会 2010.5 京都.
- 10) 會澤信弘, 藤元治朗, 西口修平. 慢性肝疾患組織におけるミトコンドリア遺伝子異常と肝発癌. 第14回日本肝臓学会大会(JDDW2010) 2010.10 横浜.
- 11) 榎本平之, 中村秀次, 今西宏安, 齋藤正紀, 岩田恵典, 池田直人, 會澤信弘, 岩井孝史, 楊和典, 石井昭生, 高嶋智之, 坂井良行, 山本晃久, 田中弘教, 下村壯治, 飯島尋子, 西口修平. 未分化肝細胞の増殖因子Hepatoma-derived growth factorの腫瘍間質非上皮細胞への作用に関する検討. 第14回日本肝臓学会大会 (JDDW2010) 2010.10 横浜.
- 12) 榎本平之, 會澤信弘, 西口修平. C型慢性肝炎組織におけるミトコンドリア遺伝子異常と発癌についての検討. 第14回