

- 意義. 第15回日本肝臓学会大会、福岡市、2011年10月.
- 5) 宇都浩文、指宿りえ、坪内博仁. ヒト好中球ペプチド-1はNASH動物モデルの肝線維化を促進する. 第15回日本肝臓学会大会、福岡市、2011年10月.
- 6) 大野香織、森内昭博、小田耕平、橋口正史、最勝寺晶子、熊谷公太郎、呉 建、馬渡誠一、玉井 努、宇都浩文、桶谷眞、井戸章雄、坪内博仁. 当科におけるC型慢性肝炎に対するテラプレビルの使用経験. 第97回日本消化器病学会九州支部例会、久留米市、2011年6月.
- 7) 玉井 努、宇都浩文、小田耕平、最勝寺晶子、橋口正史、熊谷公太郎、呉 建、馬渡誠一、森内昭博、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁. 血清 MnSOD と Thioredoxin はHCV関連肝癌の予後を予測する. 第47回日本肝臓学会総会、東京都、2011年6月.
- 8) 熊谷公太郎、井戸章雄、呉 建、高見陽一郎、佐々木文郷、小田耕平、最勝寺晶子、橋口正史、馬渡誠一、玉井 努、森内昭博、宇都浩文、桶谷 眞、坪内博仁. 肝炎の進展過程における炎症の調節因子オステオアクチビンの役割. 第47回日本肝臓学会総会、東京都、2011年6月.
- 9) 馬渡誠一、玉井 努、小田耕平、最勝寺晶子、橋口正史、呉 建、熊谷公太郎、森内昭博、宇都浩文、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁. 新たな白金製剤ミリプラチンによるTACEの初期経験（従来法との比較）. 第47回日本肝臓学会総会、東京都、2011年6月.
- 10) 稲田由紀子、宇都浩文、岩満章浩、坂本秀壮、村田光宏、村山貴信、高橋将史、児玉眞由美、白土明美、熊谷公太郎、堀剛、下田一哉、坪内博仁. 65歳以上のC型慢性肝疾患患者に対するIFN治療の有用性の検討. 第47回日本肝臓学会総会東京都、2011年6月.
- 11) 平峯靖也、宇都浩文、坪内博仁. 進行肝細胞癌に対するソラフェニブ治療と肝動脈化学療法の効果比較. 第97回日本消化器病学会総会、東京都、2011年5月.

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

血清RANTES濃度とHaplotypingを用いたC型肝炎治療反応性の検討

前川 伸哉 山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：我々はGenotype 1b型のC型肝炎に対するPEG-interferon（PEG-IFN）+tribavirin（RBV）併用療法における治療効果に関連する宿主因子として血清中のサイトカインに着目し、Sandwich ELISA法を用いた網羅的半定量解析、ならびにBeads Array法を用いた精密定量によって、治療開始前血清中RANTES濃度がPEG-IFN+RBV併用療法の反応性に関連することを報告してきた。本年度は症例数を増やしてこれまでの結果を検証するとともに、RANTESプロモーター部分を含むRANTESゲノムのSNPとPEG-IFN+RBV併用療法の反応性について検討し、治療反応性はRANTESゲノムのハプロタイプによっても規定されることを明らかとした。

A. 研究目的

C型肝炎に対する薬剤治療は、従来のペグインターフェロンとリバビリン2剤の上にテラプレビルが加わった3剤併用療法が2011年末から開始されることとなり、治療成績は大きく向上した。しかしながら、この新しい治療においても、治療反応性に乏しい症例が存在し、これらの症例は実は従来のペグインターフェロンとリバビリンの無効例であることが明らかとなりつつある。すなわち従来の2剤療法における難治症例を正確に予測することが、新しい3剤療法においても重要な課題となっている。

これらの治療の中心に存在するI型インターフェロンは、細胞膜のレセプターを介してシグナルが伝達され、多様な分子との相互作用において総体としての抗ウイルス効果を発現することが考えられる。我々は

この効果発現の過程において様々なサイトカイン/ケモカインが関与する可能性を想定し、網羅的解析、および精密定量からRANTESの血中濃度と治療効果が密接に関連することを明らかとしてきた。

本年度は昨年までの解析結果を踏まえた上で、RANTES遺伝子のSNPに注目し、RANTES遺伝子の多型と治療反応性について検討を行った。

B. 研究方法

2004年から2010年の間にペグインターフェロンとリバビリン治療を行ったゲノタイプ1b・高ウイルス量HCV症例185例を対象として、治療前の血中RANTES濃度と治療効果の関連を検討した。一方、RANTES遺伝子領域のハプロタイプ解析を行い、治療反応性、あるいは血中RANTES濃度との関連を検討し

た。

(倫理面への配慮)

本研究は山梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

対象症例を 185 例と増やした中での検討においても血清 RANTES 濃度は治療反応性と関連し、治療前 RANTES 高値群では治療効果が有意に高かった。またウイルス因子や宿主因子を含めた多変量解析による検討にても RANTES はペグインターフェロン・リバビリン治療効果に関連する独立した因子として抽出された。(odds ratio 24.8, 95%CI 1.07-578, $p = 0.046$) 血清 RANTES 濃度と各臨床パラメーターとの関連に関しても検討したところ、RANTES 高値群では AST は低い傾向が見られ ($p = 0.059$)、血小板数は有意に多かった。 ($p = 0.009$) 次に RANTES gene に関して International HapMap Project (<http://snp.cshl.org>) を参考に日本人に見られる 5 つの SNP(rs2107538, rs2280788, rs2280789, rs4796120, rs3817655) 解析を行ったところ、R1-haplotype (rs2107538G / rs2280788C / rs2280789T / rs4796120A / rs3817655A で定義される) を持たない方が著効率が有意に高かった。 ($p = 0.019$) 血清濃度と遺伝子の haplotype の間に有意な関連は見られなかった。

D. 考察と結論

HCV genotype 1bにおけるPEG-IFN+RBV併

用療法において、血清RANTES濃度が高値であるとPEG-IFN+RBV療法においてSVR率が有意に高くなること、RANTES gene のR1-haplotypeを持たない場合、SVR率が高いことが明らかとなった。

特に血清 RANTES 濃度は他の治療抵抗因子である HCV NS5A や core のアミノ酸変異、IL-28B SNP などを入れて多変量解析を行っても独立した因子として抽出され、従来知られている治療関連因子とは異なる機序で治療反応性を規定している可能性が考えられた。この事実は HCV 感染における肝病態形成に RANTES が重要な役割を果たすことを示唆しているが、より臨床的な応用として、治療開始前 RANTES を調べることで、治療反応性をより正確に予測できることが考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis. *Hepatol Int*. 2011 August 17.
- 2) Shindo H, Maekawa S, Komase K, Kadokura M, Sueki R, Miura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N. Characterization of naturally

- occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatology Int.* 2011 August 17.
- 3) Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy. *PLoS One.* 2011;6(9):e24514. Epub 2011 Sep 15.
- 4) Takaya D, Yamashita A, Kamijo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S. A new method for induced fit docking (genius) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2011 Nov 15;19(22):6892-905. Epub 2011 Sep 16.
- 5) Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatology Int.* 2011 Mar 20.
- 6) Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol.* 2011 Mar;54(3):439-48.
2. 学会発表
- 1) 小馬瀬一樹、前川伸哉、進藤浩子、門倉信、末木良太、三浦美香、進藤邦明、雨宮史武、井上泰輔、中山康弘、坂本穰、榎本信幸。口演：Cytokine Array解析を用いたHCVのPEG-IFN + ribavirin治療効果と関連する宿主因子の同定 第47回 日本肝臓学会大会。東京。平成23年6月2日 - 6月3日
- 2) 小馬瀬一樹、前川伸哉、進藤浩子、三浦美香、雨宮史武、井上泰輔、中山康弘、坂本穰、榎本信幸。ポスター：HCVのPEG-IFN + RBV治療効果と関連する宿主免疫としてのcytokineの同定 第15回 日本肝臓学会大会。福岡。平成23年10月20日 - 10月21日
- 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

B型肝炎ウイルス感染系を用いた抗線維化薬物の研究

村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科 助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）感染による肝線維化発症メカニズムの解析を目的として、HBVを感染させたヒト肝細胞置換キメラマウスを用いた検討を行っている。キメラマウス（10週齢以上）にHBV genotype C（HBV/C, 10^5 copies）を接種した。感染確認後、ヒト型またはマウス型 PEG-IFN β 、あるいは抗 TLR4 抗体をそれぞれ投与し、現在も試験継続中である。今後、これらの薬剤による抗ウイルス効果や線維化抑止の可能性について検討を予定している。

共同研究者氏名

杉山真也、田中靖人

名古屋市立大学大学院医学研究科

化薬物を投与し、線維化に与える影響について検討を試みる。

A. 研究目的

本研究班において、分担研究者はキメラマウスを用いて、HBVを感染させることで、HBVが肝組織に与える傷害性、特に肝線維化に関して検討している。昨年までに我々は、キメラマウスにHBVを接種後3ヶ月で活性酸素種の産生が亢進すること、感染6ヶ月で肝線維化が進行し、強い肝傷害が見られることを確認している。

また、感染期間が6ヶ月経過した群において線維化進展群では線維化関連遺伝子の発現亢進が認められた。マイクロアレイによる解析を実施したところTLR4に関わる経路の活性が示され、自然免疫との関連が考えられた。

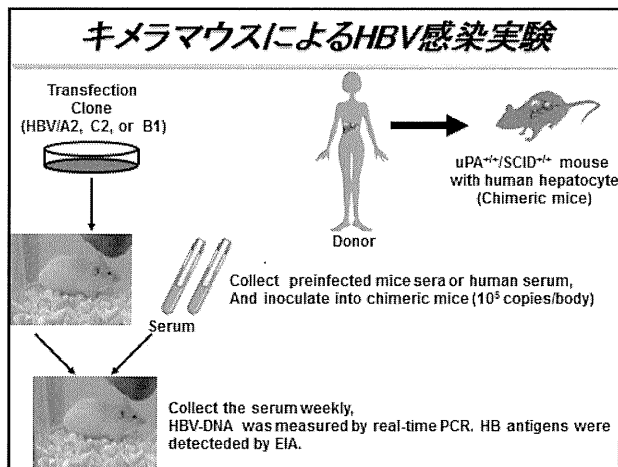
そこで、HBV感染キメラマウスに抗線維

B. 研究方法

HBV 感染血清から得られたウイルス（HBV/C）をクローニングしキメラマウスへの感染源とした。HBV/C を 1 匹あたり 10^5 copies 接種し、接種後 1 週目から週ごとに血清中のヒトアルブミン値、ウイルス量を測定した。感染確認後、抗線維化薬物として、ヒト型またはマウス型 PEG-IFN β 、および抗 TLR4 抗体を投与した。

（倫理面への配慮）

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。



C. 研究結果

現在も試験継続中である。HBV 感染 3 ヶ月後の肝組織像において、線維化は認められなかったが、細胞浸潤が観察された。この時点では炎症の継続期間が線維化の進展に必要な不十分であるため、抗線維化薬物の与える影響も含めて、線維化像の観察にはさらに試験期間を必要とする。

D. 考察

これまでの検討により、HBV 感染による肝線維化には、遺伝子型、ウイルス量、抗原量に加え、持続的な炎症期間が必要であることが示唆され、本 HBV 感染マウスモデルにおいて、その期間は最低 6 ヶ月間と考えられる。また、キメラマウスを用いた HBV 肝線維化誘発モデルは、このマウスが免疫不全であることから免疫抑制下での肝線維化メカニズムの解明につながる。今回、薬剤による長期間での試験を行うことで、線維化に与える因子や、関連する経路を同定し、病因の解明をめざす。

E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスに HBV を感染させた肝線維化誘発モデルを約 6 ヶ月の長期間で観察し、薬剤投与による線維化の抑制をめざすとともに、線維化に関わる因子を明らかにしてゆく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sa-nguanmoo P, Tanaka Y, Sugiyama M, Murakami S et al. Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. *Virus Res.*, 158 (1-2): 209-15, 2011.
- 2) Maeda M, Murakami S, et al. Decreased CXCR3 expression in CD4+ T cells exposed to asbestos or derived from asbestos-exposed patients. *Am J Res Cell Mol Biol.*, 45 (4): 795-3, 2011.

2. 学会発表

- 1) Tanaka Y. Direct cytopathic effects by hepatitis B virus in the urokinase-type plasminogen activator (uPA)-Severe combined immunodeficiency (SCID) chimeric mouse model. Hepatitis B virus genotypes global diversity & evolution. 平成23年9月28日—30日. ヨハネスブルグ. Session 6.

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

分子標的創薬に向けた細胞内活性化ネットワークの推定研究

堀本 勝久 産業技術総合研究所 研究チーム長

研究要旨： 予後データや検体サンプル背景などの表現型データから分子機能を推定する新規方法のプロトタイプを開発し、新規診断および治療薬開発により直接的に関連する分子機能の特定を試みた。新規開発法は、表現型を重視した方法であると共に、様々なオミクスデータの解析（トランスオミクス解析）が可能であるという特徴もある。本年度は、遺伝子発現データのみ解析により、解析における表現型指向の性能についてテストを行った。具体的には、非環式レチノイド投与に関する遺伝子発現サンプル24サンプル（臨床背景：再発有12サンプル、無12サンプル）の8516プローブについて表現型指向解析法を適用し、非環式レチノイド投与後の再発に関与する37遺伝子セット及びそのセットに含まれる主要47遺伝子を同定した。ただし、これら候補遺伝子の検証は最終的には実験検証が必要である。しかしながら、分子機能分類により3遺伝子のみが“cytokines and growth factors”であるなど、既知の知識を利用した絞り込みによって少数実験検証候補の提案の可能性を示すことができた。

A. 研究目的

これまで特異的条件下活性化遺伝子制御ネットワーク（有向グラフ）を推定する方法を開発・適用し、肝炎特異的活性化分子ネットワークの同定を試みた。分子レベルからの探索に加え、さらに表現型（予後データ等）の情報を積極的に活用するために、予後データから分子機能を推定する方法を開発・適用し、より直接疾患に関与する分子の推定を試みる。

B. 研究方法

新規解析法では、分子データを予め分子機能によって分類し（現在、887 の機能グ

ループに分類）、それぞれの分子群についてクラスタリングを行い、さらに分子特性に基づいて分類されたサンプルについて生存解析等の予後データの解析を行い、有意な差の検出された分子機能を特定する。このように新規方法は、従来の分子分類に基づいて予後データを解析するアプローチを異なり、予後データの有意な差を指標にして分子群を探索する方法である。

（倫理面への配慮）

当機関においては、数理研究のみを実施するため、動物実験等の該当は無い。

C. 研究結果

非環式レチノイド投与に関する遺伝子発現サンプル 24 サンプル（臨床背景：再発有 12 サンプル、無 12 サンプル）の 8516 プローブについて表現型指向解析法を適用し、非環式レチノイド投与後の再発に関与する 37 遺伝子セット及びそのセットに含まれる 47 遺伝子を同定した。さらに、これら候補遺伝子を GSEA の MSigDB に収納される Gene Family (http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/gene_families.jsp) に基づき特徴づけた。

D. 考察

表現型から分子機能を推定する新規方法によって探索された候補遺伝子の検証は最終的には実験検証が必要であるが、分子機能分類により 3 遺伝子のみが“cytokines and growth factors”であるなど、既知の知識を利用した絞り込みによって、実験検証可能な少数分子候補への絞り込みの可能性を示すことができた。

E. 結論

高精度の細胞内活性化ネットワーク推定システムを補填するため、表現型指向分子機能推定法を開発し有用な絞り込みアプローチである可能性を示すことができた。今後、ボトムアップのネットワーク推定システムとトップダウンの表現型指向推定法の連携を図り、より頑強な実験計測データからの標的候補の絞り込みシステムを完成させることで、新規マーカー及び創薬ターゲットの探索が加速されることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyagi, Y., Higashiyama, M., Gochi, A., Akaike, M., Ishikawa, T., Miura, T., Saruki, N., Bando, E., Kimura, H., Imamura, F., Moriyama, M., Ikeda, I., Chiba, A., Oshita, F., Imaizumi, A., Yamamoto, H., Miyano, H., Horimoto, K., Tochikubo, O., Mitsushima, T., Yamakado, M., and Okamoto, N.: Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. PLoS One, 6(9): e24143, 2011.
- 2) Zhou, H., Saito, S., Hu, R., Piao, G., Wang, J., Liu, Z., Horimoto, K. and Chen, L.: Network Screening of Goto-Kakizaki Rat Liver Microarray Data during Diabetic Progression. BMC Sys. Biol. 5(Suppl 1), S16, 2011.
- 3) Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Tateno, H., Toyoda, M., Akutsu, H., Nishino, K., Chikazawa, E., Fukawatase, Y., Miyagawa, Y., Okita, H., Kiyokawa, N., Shimma, Y., Umezawa, A., Hirabayashi, J., Horimoto, K. and Asashima, M.: Possible linkages between the inner and outer cellular states of human induced pluripotent stem cells. BMC Sys. Biol. 5(Suppl 1), S17, 2011.
- 4) Tateno, H., Toyota, M., Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Fukumura, M., Matsushima, A., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Akutsu, H., Umezawa, A., Horimoto, K., Hirabayashi, J. and Asashima, M.: Glycome Diagnosis of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Lectin Microarray. J. Biol. Chem., 286, 20345–20353, 2011.

5) Saito, S., Hirokawa, T. and Horimoto, K.:
Discovery of Chemical Compound Groups
with Common Structures by a Network
Analysis Approach. J. Chem. Inf. Model. 51,
61-68, 2011.

2. 学会発表

1) Horimoto, K.: Network Screening,
Workshop on Network Systems Biology,
July 2, 2011, Suzhou, China.

2) Horimoto, K.: A practical approach to
define the candidates of key molecules
responsible for biological phenomena: in the
cases of iPS cell and a few disease studies.
Key Laboratory of Systems Biology, SIBS,
CAS - International Outstanding Scientist
Lecture Series, August, 12, Shanghai, China.

3) Horimoto, K.: On Two Issues of Molecular
Network Models in Systems Biology – A
Review, The 10th International Symposium
on Operations Research and its Applications
in engineering, technology and management
(ISORA 2011), August 28, 2011, Dunhang,
China.

4) Horimoto, K.: A Constraint for Optimal
Parameter Estimation to Solve an Issue of
Molecular Network Models in Systems
Biology. MACIS2011, Oct. 20, 2011,
Beijing, China

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yamashita T, (金子)	Differentiation of Cancer Stem Cells	Stanley Shostak	Cancer Stem Cells - The Cutting Edge	InTech	Croatia	2011	337-350

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamashita T, (金子)	Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection.	J Gastroenterol Hepatol	26(6)	960-964	2011
Sunagozaka H, (金子)	Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma.	Int J Cancer	129(7)	1576-1585	2011
Nakamoto Y, (金子)	Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization.	Clin Exp Immunol	163(2)	165-177	2011
Saito M, (小原)	Hepatitis C virus induces overexpression of 3 β -hydroxysterol Δ 24-reductase through Sp1.	J Med Virol	-	-	(in press)
Weng L, (小原)	Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase.	Gene	-	-	(in press)
Konishi H, (小原)	An orally available, small-molecule interferon inhibits hepatitis C virus replication.	Sci Comm	-	-	(in press)
Kasama Y, (小原)	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 induces interferon response and is impaired by hepatitis C virus NS3.	Virus Res	163	405-409	2012
Yoshikawa K, (小原)	Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance.	Bioconjugate Chemistry	22	42-49	2011
Arai M, (小原)	Establishment of infectious HCV virion-producing cells with newly designed full-genome replicon RNA.	Arch Virol	156	295-304	2011

Kimura K, (小原)	Role of interleukin-18 in intrahepatic inflammatory cell recruitment in acute liver injury.	Journal of Leukocyte Biology	89	433-442	2011
Takano T, (小原)	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 is induced by hepatitis C virus and is related to the apoptotic response.	J Med Virol	83	801-809	2011
Kimura K, (小原)	Frontiers of Model Animals for Human Diseases.	Experimental Animals	60(2)	93-100	2011
Takano T, (小原)	Augmentation of DHCR24 expression by hepatitis C virus infection facilitates viral replication in hepatocytes.	J Hepatology	55	512-521	2011
Chiyo T, (小原)	Conditional hepatitis C virus gene expression without induction of severe inflammatory responses through the use of a Cre-expressing recombinant adenovirus in mice.	Virus Res	160	89-97	2011
Satoh M, (小原)	Monoclonal antibody 2-152a suppresses hepatitis C virus infection through betaine/GABA transporter-1.	J Infect Dis	204	1172-1180	2011
Y. Yamagishi, (菅)	Natural product-like macrocyclic N-methyl-peptide inhibitors against a ubiquitin ligase uncovered from a ribosome-expressed de novo library.	Chemistry&Biology	18	1562-1570	2011
T. Katoh, (菅)	Ribosomal synthesis of backbone macrocyclic peptides.	Chemical Communication	47	9946-9958	2011
J. Morimoto, (菅)	Flexizymes: Their evolutionary history and the origin of catalytic function.	Accounts of Chemical Research	44(12)	1359-1368	2011
K. Öjemalm, (菅)	Apolar surface area determines the efficiency of translocon-mediated membrane-protein integration into the endoplasmic reticulum.	Pro Nat Acad Sci	108(31)	E359-364	2011
J. Chung, (菅)	Small-molecule inhibitor binding to an N-acyl-homoserine lactone synthase.	Pro Nat Acad Sci	108(29)	12089-12094	2011
Y. Ohshiro, (菅)	Ribosomal synthesis of backbone-macrocyclic peptides containing γ -amino acids.	ChemBioChem	12	1183-1187	2011

Yamamoto M, (深澤)	The structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus.	J Gen Virol	92(8)	2082-2087	2011
Arnaud N, (深澤)	Hepatitis C Virus Reveals a Novel Early Control in Acute Immune Response.	PLoS Pathogens	7(10)	e1002289, 1-17	2011
Hikita H, (竹原)	Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice.	Hepatology	54(1)	240-251	2011
Hikita H, (竹原)	The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib.	Hepatology	52(4)	1310-1321	2010
Tamai T, (宇都)	Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential prognostic markers for HCV-related hepatocellular carcinoma.	World J Gastroenterol	17(44)	4890-4898	2011
Oda K, (宇都)	Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease.	Oncol Rep	26(5)	1227-1233	2011
Miura M, (前川)	Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis.	Hepatol Int	-	-	(in press)
Shindo H, (前川)	Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients.	Hepatol Int	-	-	(in press)
Kadokura M, (前川)	Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy.	PLoS On	6(9)	e24514	2011
Kadokura M, (前川)	Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy.	Hepatol Int	5(3)	789-799	2011
Takaya D, (前川)	A new method for induced fit docking (genius) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors.	Bioorg Med Chem	19(22)	6892-6905	2011

Kurosaki M, (前川)	Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors.	J Hepatol	54(3)	439-448	2011
Sa-nguanmoo P, (村上)	Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes.	Virus Research	158 (1-2)	209-215	2011
Miyagi Y, (堀本)	Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection.	PLoS One	6(9)	e24143	2011.
Zhou H, (堀本)	Network Screening of Goto-Kakizaki Rat Liver Microarray Data during Diabetic Progression.	BMC Sys. Biol	5(Suppl 1)	S16	2011
Saito S, (堀本)	Possible linkages between the inner and outer cellular states of human induced pluripotent stem cells.	BMC Sys. Biol	5(Suppl 1)	S17	2011
Tateno H, (堀本)	Glycome Diagnosis of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Lectin Microarray.	J. Biol. Chem	286	20345–20353	2011
Saito S, (堀本)	Discovery of Chemical Compound Groups with Common Structures by a Network Analysis Approach.	J. Chem. Inf. Model	51	61-68	2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Differentiation of Cancer Stem Cells

Taro Yamashita, Masao Honda and Shuichi Kaneko

*Department of Gastroenterology,
Kanazawa University Hospital Kanazawa, Ishikawa,
Japan*

1. Introduction

Tumors originally develop from normal cells that acquire the ability to grow aberrantly and metastasize to distant organs (Hanahan and Weinberg, 2000). These malignant transformations are considered to be induced by the accumulation of multiple genetic/epigenetic changes (Yamashita et al., 2008b). Although considered monoclonal in origin, cancer is composed of heterogeneous cell populations. This heterogeneity is traditionally explained by the clonal evolution of cancer cells through a series of stochastic genetic events (clonal evolution model) (Fialkow, 1976; Nowell, 1976). In contrast, cancer cells and stem cells have similar capabilities with respect to self-renewal, limitless division, and the generation of heterogeneous cell populations. Recent evidence suggests that tumor cells possess stem cell features (cancer stem cells) to self-renew and give rise to relatively differentiated cells through asymmetric division, thereby forming heterogeneous populations (cancer stem cell model) (Clarke et al., 2006; Jordan et al., 2006). Accumulating evidence supports the notion that cancer stem cells can generate tumors more efficiently in immunodeficient mice than non-cancer stem cells in hematological malignancies and in various solid tumors (Al-Hajj et al., 2003; Bonnet and Dick, 1997; O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Singh et al., 2004).

Cancer stem cells are considered to be resistant to chemotherapy and radiotherapy, which might be associated with the recurrence of the tumor after treatment (Boman and Huang, 2008; Dean et al., 2005; Diehn et al., 2009; Zou, 2008). These findings have led to the proposal of “destemming” cancer stem cells (Hill and Perris, 2007) in order to induce their differentiation into non-cancer stem cells or to eradicate cancer stem cells by inhibiting the signaling pathways responsible for their self-renewal. Recent studies have supported this proposal and suggest the utility of several factors to induce the differentiation of cancer stem cells and facilitate tumor eradication; however, it is still debatable whether the simple differentiation of cancer stem cells effectively eradicates tumors. Here, we summarize current knowledge on the differentiation of cancer stem cells and discuss the utility and limitation of differentiation therapy to eliminate cancer.

2. Cancer stem cell system

The consensus definition of a cancer stem cell is a cell within a tumor that possesses the capacity to self-renew and to generate the heterogeneous lineages of cancer cells that

comprise the tumor, as proposed by the AACR workshop in 2006 (Clarke et al., 2006). Thus, cancer stem cells can only be defined experimentally and their self-renewal ability is generally evaluated by the capacity of serially transplanted cells in immunodeficient mice. A cancer stem cell may give rise to one or two daughter cells that have essentially the same ability to replicate and generate differentiated non-cancer stem cells (Fig. 1 upper and lower left panels).

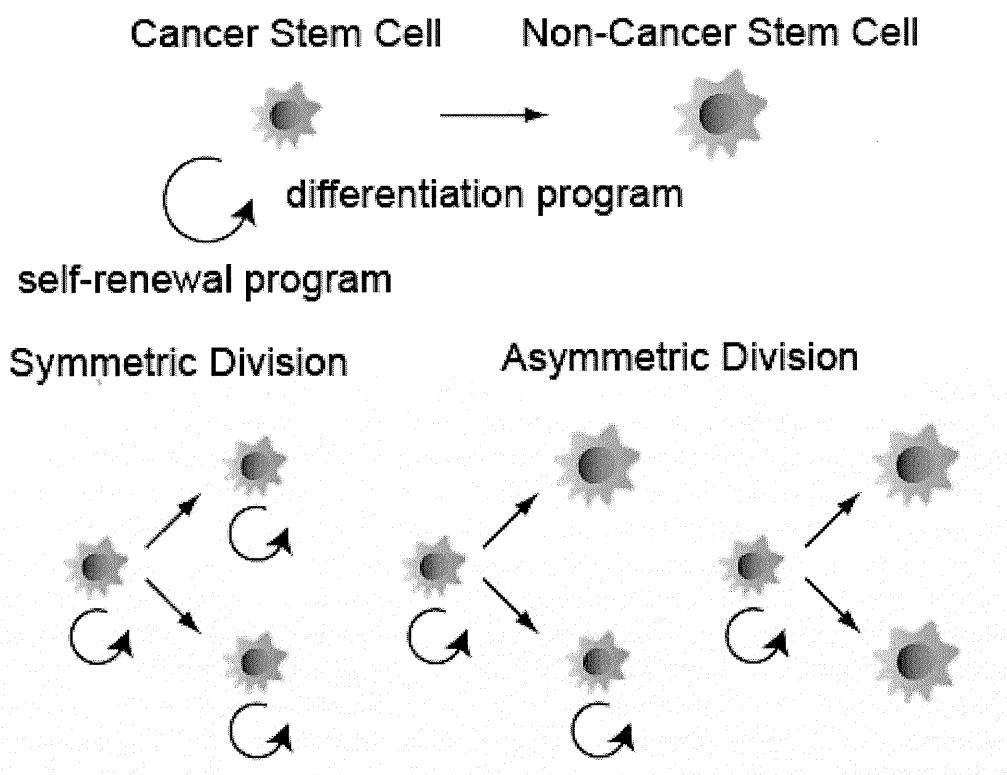


Fig. 1. Symmetric/asymmetric division of a cancer stem cell

Asymmetric cell division could be defined by the generation of one cancer stem cell and one progenitor cell with the loss of self-renewal capacity (Fig. 1 lower right panel). If both progenitors derived from a cancer stem cell lose the capacity of self-renewal by the induction of differentiation, the cancer stem cell population would be depleted and the tumor would subsequently shrink, according to the conventional cancer stem cell model.

2.1 Signaling pathways responsible for the self-renewal of cancer stem cells

A growing body of evidence suggests the similarities of normal stem cells and cancer stem cells in terms of their self-renewal and differentiation programs. Indeed, the self-renewal and differentiation programs in cancer stem cells are considered to be regulated by several signaling pathways that are activated in normal stem cells (Lobo et al., 2007). These signaling pathways seem to be activated during the process of normal organogenesis as well as carcinogenesis in a tissue-dependent manner (Pardal et al., 2003). Therefore, underscoring the significance of these signaling pathways on self-renewal and differentiation is critical for the development of treatment strategies specifically targeting cancer stem cells.

2.1.1 Wnt/ β -catenin signaling

Wnt/ β -catenin signaling has been studied primarily in developing embryos and was demonstrated to modulate cell proliferation, migration, and differentiation in a cellular context-dependent manner (Decaens et al., 2008; Giles et al., 2003; Moon et al., 2004; Ober et al., 2006). Wnt signaling is involved in the decision of stem cells to self-renew or differentiate during organogenesis, involving, for example, skin, intestine, bone marrow, kidney, and liver development (Moon et al., 2004; Thompson and Monga, 2007). Moreover, mutations of genes involved in Wnt/ β -catenin signaling have been reported in a wide variety of human cancers including colorectal cancer, gastric cancer, skin cancer, ovarian cancer, liver cancer, and leukemia (Giles et al., 2003; Merle et al., 2005; Takebe et al., 2010; Tan et al., 2008; Vermeulen et al., 2010; Woodward et al., 2007; Zhao et al., 2007).

Wnt signaling is mediated through a core set of proteins to activate the transcriptional programs responsible for cell proliferation and development (Fig. 2). In the absence of Wnt proteins, β -catenin is phosphorylated and degraded by the Axin-APC-GSK3 β complex. Once Wnt proteins bind to their receptor, Frizzled, the degradation complex is inactivated to stabilize β -catenin, which leads to its accumulation in the nucleus and interaction with T-cell factor (TCF) to activate the transcription of target genes (Moon et al., 2004).

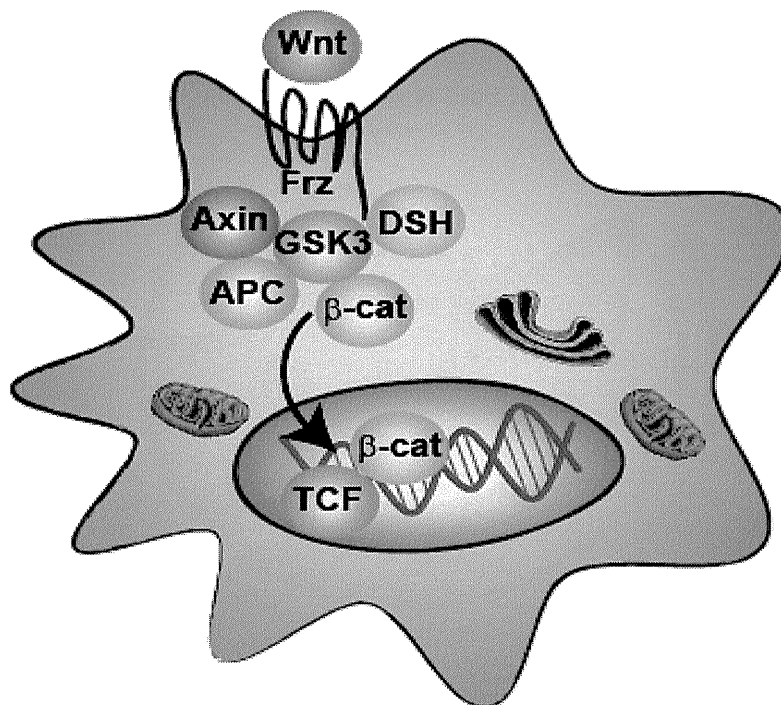


Fig. 2. Wnt/ β -catenin signaling. APC, adenomatous polyposis coli; β -cat, β -catenin; DSH, Dishevelled; Frz, Frizzled; GSK3, glycogen synthase kinase 3; TCF, T-cell factor

Recent studies have demonstrated that Wnt/ β -catenin signaling also plays a role in the maintenance of cancer stem cells, including colorectal cancer (Vermeulen et al., 2010), breast cancer (Li et al., 2003; Woodward et al., 2007), and liver cancer (Yang et al., 2008). We have recently demonstrated that Wnt/ β -catenin signaling augments self-renewal and inhibits the differentiation of liver cancer stem cells by the expression of the stem cell marker EpCAM, which results in the enrichment of the tumor-initiating cell population (Yamashita et al.,

2008a; Yamashita et al., 2009). We have further demonstrated that small molecules, which specifically inhibit the transcriptional activity of the TCF/ β -catenin complex, can suppress the cell proliferation of EpCAM-positive liver cancer cell lines, suggesting the utility of these compounds for the eradication of cancers via the inactivation of Wnt/ β -catenin signaling (Yamashita et al., 2007).

2.1.2 Hedgehog signaling

The Hedgehog signaling pathway was initially identified as a regulator of segmental patterning in *Drosophila* (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Hedgehog signaling is activated in developing embryos, especially in the skeleton and neural tube, and regulates the cell proliferation, migration, and differentiation of stem cells (Varjosalo and Taipale, 2008). Several types of cancers are reported to have an activated hedgehog signaling pathway, including glioma (Clement et al., 2007), prostate cancer (Sanchez et al., 2005), breast cancer (Liu et al., 2006), pancreatic cancer (Li et al., 2007), and hematological malignancies (Zhao et al., 2009).

Hedgehog signaling is regulated by several proteins, including ligands (Sonic Hedgehog, Desert Hedgehog, and Indian Hedgehog), the Patched (Ptch) receptor, the Smoothened (Smo) transmembrane protein, and the zinc finger transcription factor Gli (Merchant and Matsui, 2010) (Fig. 3). In the absence of ligands, Ptch represses the activity of Smo and the Gli-mediated transcriptional program is constitutively suppressed (Gli-suppressed). Once ligands bind to Ptch, the repression of Smo is released and the Gli-mediated transcriptional program is activated (Gli-activated).

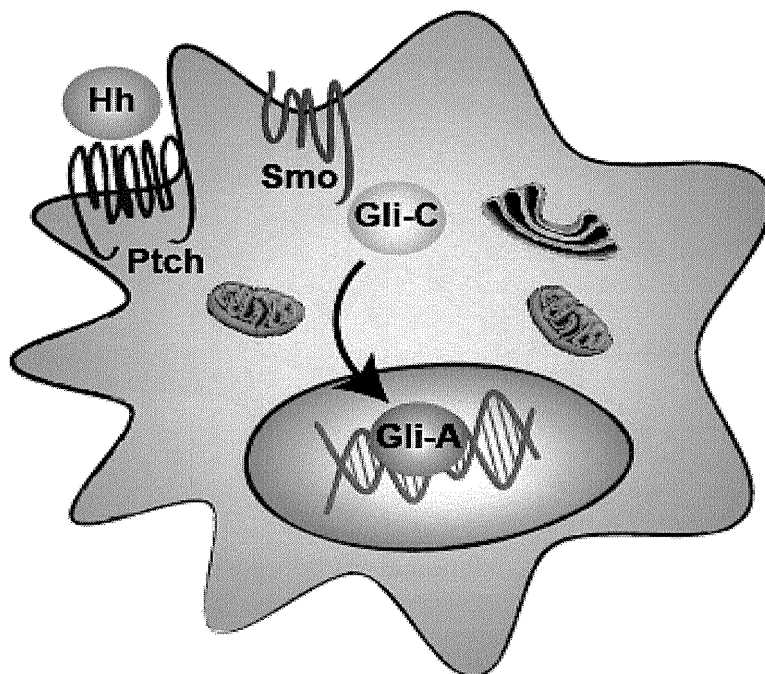


Fig. 3. Hedgehog signaling. Gli-C, Gli complex; Gli-A, Gli-activated; Hh, Hedgehog; Ptch, Patched; Smo, Smoothened

Accumulating evidence suggests that Hedgehog signaling regulates the self-renewal of cancer stem cells in several types of cancer, including glioblastoma and leukemia (Clement