

69. Okita K, Kurokawa F, Yamasaki T, Sakaida I. Screening of hepatocellular cancer: Japanese strategy. *Hepatol Res.* 37(Suppl 2):S142–S145, 2007.
70. Jin H, Terai S, Sakaida I. The iron chelator deferoxamine causes activated hepatic stellate cells to become quiescent and to undergo apoptosis. *J Gastroenterol.* 42(6):475–484, 2007.
71. Hidaka I, Hino K, Korenaga M, Gondo T, Nishina S, Ando M, Okuda M, Sakaida I. Stronger Neo–Minophagen C, a glycyrrhizin–containing preparation, protects liver against carbon tetrachloride–induced oxidative stress in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Liver Int.* 27(6):845–853, 2007.
72. Tajima K, Terai S, Takami T, Kawaguchi K, Okita K, Sakaida I. Importance of inhibitor of DNA binding/differentiation 2 in hepatic stellate cell differentiation and proliferation. *Hepatol Res.* 37(8):647–655, 2007.
73. Satake M, Nishikawa J, Fukagawa Y, Akashi K, Okamoto T, Yoshida T, Hirano A, Maetani N, Iida Y, Sakaida I. The long–term efficacy of *Helicobacter pylori* eradication therapy in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Gastroenterol Hepatol.* 22(12):2233–2237, 2007.
74. Urata Y, Okita K, Korenaga K, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I. The effect of supplementation with branched–chain amino acids in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 37(7):510–516, 2007.
75. Isobe Y, Yamasaki T, Yokoyama Y, Kurokawa F, Hino K, Sakaida I. Hepatocellular carcinoma developing six and a half years after a diagnosis of idiopathic portal hypertension. *J Gastroenterol.* 42(5):407–409, 2007.
76. Aoyama K, Tsuchiya M, Mori K, Kubo Y, Shiraishi K, Sakaguchi E, Yamashita S, Sakaida I. Effect of a late evening snack on outpatients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 37(8):608–614, 2007.
77. Harada K, Higaki S, Amano A, Hashimoto K, Hashimoto S, Gondo T, Sakaida I. A reduced COX–2 expression and a reduced number of pericryptal myofibroblasts are associated with depressed adenoma of the colon. *Oncol Rep.* 17(6):1353–1358, 2007.
78. Hashimoto S, Higaki S, Amano A, Harada K, Nishikawa J, Yoshida T, Okita K, Sakaida I. Relationship between molecular markers and endoscopic findings in laterally spreading tumors. *J Gastroenterol Hepatol.* 22(1):30–36, 2007.
79. Mikuriya K, Kuramitsu Y, Ryoza S, Fujimoto M, Mori S, Oka M, Hamano K, Okita K, Sakaida I, Nakamura K. Expression of glycolytic enzymes is increased in pancreatic cancerous tissues as evidenced by proteomic profiling by two–dimensional electrophoresis and liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. *Int J Oncol.* 30(4):849–855, 2007.
80. Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Murata T, Mizunaga Y, Yamamoto N, Nishina H, Shinoda K, Sakaida I. Administration of fibroblast growth factor 2 in combination with bone marrow transplantation synergistically improves carbon–tetrachloride–induced liver fibrosis in mice. *Cell Tissue Res.* 327(3):463–470, 2007.

81. Iizuka N, Sakaida I, Moribe T, Fujita N, Miura T, Stark M, Tamatsukuri S, Ishitsuka H, Uchida K, Terai S, Sakamoto K, Tamesa T, Oka M. Elevated levels of circulating cell-free DNA in the blood of patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 26(6C):4713-4179, 2006
82. Akashi K, Yanai H, Nishikawa J, Satake M, Fukagawa Y, Okamoto T, Sakaida I. Ulcerous change decreases the accuracy of endoscopic ultrasonography diagnosis for the invasive depth of early gastric cancer. *Int J Gastrointest Cancer.* 37(4):133-138, 2006.
83. Higaki S, Nakano K, Onaka S, Amano A, Tanioka Y, Harada K, Hashimoto S, Sakaida I, Okita K. Clinical significance of measuring blood coagulation factor XIIIa regularly and continuously in patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 21(9):1407-1411, 2006.
84. Akashi K, Yanai H, Nishikawa J, Satake M, Fukagawa Y, Okamoto T, Sakaida I. Ulcerous change decreases the accuracy of endoscopic ultrasonography diagnosis for the invasive depth of early gastric cancer. *Int J Gastrointest Cancer.* 37(4):133-138, 2006.
85. Sakaida I, Terai S, Okita K. Use of bone marrow cells for the development of cellular therapy in liver diseases. *Hepatol Res.* 31(4):195-196, 2005.
86. Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells.* 24(10):2292-2298, 2006.
87. Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Harada T, Fujimoto M, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Proteomic analysis of autoantibodies in patients with hepatocellular carcinoma. *Proteomics.* 6(13):3894-3900, 2006.
88. Furutani T, Hino K, Okuda M, Gondo T, Nishina S, Kitase A, Korenaga M, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM, Sakaida I, Okita K. Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology.* 130(7):2087-2098, 2006.
89. Kuramitsu Y, Harada T, Takashima M, Yokoyama Y, Hidaka I, Iizuka N, Toda T, Fujimoto M, Zhang X, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. Increased expression and phosphorylation of liver glutamine synthetase in well-differentiated hepatocellular carcinoma tissues from patients infected with hepatitis C virus. *Electrophoresis.* 27(8):1651-1658, 2006.
90. Yokoyama Y, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Urata Y, Marumoto Y, Nishina H, Nakamura K, Okita K, Sakaida I. Proteomic analysis of serum marker proteins in recipient mice with liver cirrhosis after bone marrow cell transplantation. *Proteomics.* 6(8):2564-2570, 2006.
91. Sakaida I. Clinical application of bone marrow cell transplantation for liver diseases. *J Gastroenterol.* 41(1):93-94, 2006.
92. Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Terai S, Oka M, Nakamura K, Okita K, Sakaida I. Protein level of apolipoprotein E increased in human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 28(3):625-631, 2006.

93. Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. (Review) Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis. *Med Mol Morphol.* 38(4):197–202, 2005.
94. Ishikawa T, Terai S, Urata Y, Marumoto Y, Aoyama K, Sakaida I, Murata T, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Fibroblast growth factor 2 facilitates the differentiation of transplanted bone marrow cells into hepatocytes. *Cell Tissue Res.* 323(2):221–231, 2006.
95. Sakaida I, Okita K. The role of oxidative stress in NASH and fatty liver model. *Hepatol Res.* 33(2):128–131, 2005.
96. Sakaida I, Kawaguchi K, Kimura T, Tamura F, Okita K. D-Penicillamine improved laparoscopic and histological findings of the liver in a patient with Wilson's disease: 3-year follow-up after diagnosis of Coombs-negative hemolytic anemia of Wilson's disease. *J Gastroenterol.* 40(6):646–651, 2005.
97. Terai S, Sakaida I, Nishina H, Okita K. Lesson from the GFP/CCl4 model—translational research project: the development of cell therapy using autologous bone marrow cells in patients with liver cirrhosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 12(3):203–207, 2005.
98. Shen J, Sakaida I, Uchida K, Terai S, Okita K. Leptin enhances TNF- α production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci.* 2005;77(13):1502–15.
99. Ishikawa T, Yamasaki T, Isobe Y, Sakaida I, Kurokawa F, Okita K, Kimura T. Rupture of peritoneal metastatic tumor that developed due to needle-tract implantation of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 40(5):547–548, 2005.
100. Takami T, Terai S, Yokoyama Y, Tanimoto H, Tajima K, Uchida K, Yamasaki T, Sakaida I, Nishina H, Thorgeirsson SS, Okita K. Human homologue of maid is a useful marker protein in hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology.* 128(5):1369–1380, 2005.
101. Jin H, Sakaida I, Tsuchiya M, Okita K. Herbal medicine Rhei rhizome prevents liver fibrosis in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Life Sci.* 76(24):2805–2816, 2005.
102. Sakaida I, Kimura T, Yamasaki T, Fukumoto Y, Watanabe K, Aoyama M, Okita K. Cytochrome c is a possible new marker for fulminant hepatitis in humans. *J Gastroenterol.* 2005;40(2):179–185, 2005.
103. Yamasaki T, Kimura T, Kurokawa F, Aoyama K, Ishikawa T, Tajima K, Yokoyama Y, Takami T, Omori K, Kawaguchi K, Tsuchiya M, Terai S, Sakaida I, Okita K. Percutaneous radiofrequency ablation with cooled electrodes combined with hepatic arterial balloon occlusion in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 40(2):171–178, 2005.
104. Tsuchiya M, Sakaida I, Okamoto M, Okita K. The effect of a late evening snack in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 31(2):95–103, 2005.
105. Yamasaki T, Kimura T, Kurokawa F, Aoyama K, Ishikawa T, Tajima K, Yokoyama Y, Takami T, Omori K, Kawaguchi K, Tsuchiya M, Terai S, Sakaida I, Okita K. Prognostic factors in patients with advanced hepatocellular carcinoma receiving hepatic arterial infusion chemotherapy. *J Gastroenterol.* 40(1):70–78, 2005.

106. Sakaida I, Tsuchiya M, Okamoto M, Okita K. Late evening snack and the change of blood glucose level in patients with liver cirrhosis. *Hepatol Res.* 30S:67–72, 2004.
107. Omori K, Terai S, Ishikawa T, Aoyama K, Sakaida I, Nishina H, Shinoda K, Uchimura S, Hamamoto Y, Okita K. Molecular signature associated with plasticity of bone marrow cell under persistent liver damage by self-organizing-map-based gene expression. *FEBS Lett.* 578(1–2):10–20, 2004.
108. Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology.* 40(6):1304–1311, 2004.
109. Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, Terai S, Sakaida I, Oka M, Nakamura K, Okita K. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics.* 4(7):2111–2116, 2004.
110. Sakaida I, Murakami F, Okita K. Acute iron intoxication. *Vet Hum Toxicol.* 46(3):158–159, 2004.
111. Mori S, Yamasaki T, Sakaida I, Takami T, Sakaguchi E, Kimura T, Kurokawa F, Maeyama S, Okita K. (Review) Hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol.* 39(4):391–396, 2004.
112. Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun.* 315(1):187–195, 2004.
113. Sakaida I, Hironaka K, Kimura T, Terai S, Yamasaki T, Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) increases expression matrix metalloproteinases (MMPs) with reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in rat stellate cell. *Life Sci.* 74(18):2251–2263, 2004.
114. Yamamoto N, Terai S, Ohata S, Watanabe T, Omori K, Shinoda K, Miyamoto K, Katada T, Sakaida I, Nishina H, Okita K. A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 313(4):1110–1108, 2004.

(特許関連)

115. 寺井 崇二、坂井田 功

特許 4752058 (平成 23 年 6 月 3 日)「肝再生骨髄細胞画分」ABM / 療法の開発に伴い取得した特許である。

116. 寺井 崇二、高見 太郎、坂井田 功、沖田 極

特許第 4465467 号 (平成 22 年 3 月 5 日)「新規肝細胞癌の腫瘍マーカー抗 HHM IgG の発見」肝細胞癌の新規腫瘍マーカーとしての機能を有する抗 HHM IgG 抗体、肝癌のスクリーニング法および肝癌進行マーカーとしての利用特許である。

・平成 24 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

「肝硬変に対する細胞治療法の臨床的確立とそのメカニズムの解明」(申請者: 坂井田 功)

YAMAGUCHI UNIVERSITY
H21-23年度 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)

骨髄および脂肪由来細胞を用いた 次世代型肝臓再生・修復(抗線維化)療法 の開発研究 (H21-肝炎-一般-014)

坂井田 功
山口大学大学院医学系研究科 消化器病態内科学

Yamaguchi University Graduate School of Medicine
Department of Gastroenterology & Hepatology

骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復(抗線維化)療法

現状: 肝硬変患者から入院・全身麻酔下に400mlの骨髄液を採取
100mlの単核球分画を末梢血管から点滴静注(治療半日・1回のみ)

問題点: 患者負担がやや大きい=適応患者が限定される

主要特許 特許第4752058号 (H23年6月3日登録) Stem Cells, 2006; 24:2292-8.

ex vivo expansionによる次世代型細胞療法の開発

少量骨髄液または脂肪組織採取 局所麻酔・外来処置 → 患者負担軽減 → 適応患者の大幅な拡大 複数回の治療が可能

体外で培養増幅 安全性・有効性評価

骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代肝再生・修復療法へ

現状: ABM/療法の推進
・症例蓄積とランダム化比較試験の実施準備
・ABM/骨髄細胞中の肝炎ウイルス存在評価 → **メカニズム解明**

次世代型開発研究

肝再生・修復に有効な細胞の効率的な分離・培養技術の確立

肝再生・修復(抗線維化)に有効な細胞分画の同定

骨髄由来細胞 生着細胞

FACS → CD45陽性細胞
Thy1陽性細胞

GFP陽性骨髄細胞投与肝

ヒト骨髄由来培養細胞 (間葉系細胞・マクロファージ) 免疫不全肝硬変マウス

脂肪組織由来細胞 肝硬変改善効果

骨髄および脂肪組織由来細胞培養法の開発

マウス骨髄由来細胞 無血清培養法

肝再生・修復(抗線維化)のメカニズム解明

肝線維化関連因子の評価

MMP9i

HTVI法による遺伝子導入

新規NASHモデル

マクロファージ機能異常?

高脂肪食負荷MC4R-KOマウス

動脈硬化・高脂肪食投与マウス

メカニズム解析

ヒトNASH模倣メダカ変異体

自己骨髄細胞投与 (ABMi) 療法の実績

主要論文 (臨床)

- Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. Terai S, et al., *Stem Cells*, 24:2292-2298, 2006 (山口大学: 世界初のABM/療法の実施報告)
- Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. Kim JK, et al., *Cell Transplant*, 19:1237-1246, 2010 (韓国延世大学・山口大学: B型肝炎変症に対するABM/療法の実施報告)
- Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. Saito T, et al., *Stem Cells Dev*, 2011 May 11. (山形大学・山口大学: アルコール性肝硬変症に対するABM/療法)

○肝硬変を有するHIV感染者に対する自己骨髄細胞投与療法の実施と安全性と有効性に関する研究 (国立国際医療研究センター・山口大学: H23年3月より症例実施)

特許 「肝再生骨髄細胞画分」 特許第4752058号 (平成23年6月3日登録)

ヒト肝組織幹/前駆細胞活性化

前 1ヶ月

3ヶ月 6ヶ月

Indium-111 シンチグラフィー: 骨髄・肝活性化

ABM前 ABM後

YAMAGUCHI UNIVERSITY ABM/療法メカニズム解析

間葉系

GFP陽性骨髄細胞投与 (血球系・間葉系細胞含む) (1x10⁷ cells)

肝硬変

生着した細胞を FACS解析

マクロファージ系

非実質細胞分画 120,000 counts

MMP-9 (Red)

・間葉系マーカー(Thy1, Vimentin)陽性細胞が認められた
・マクロファージ系マーカー(F4/80など)陽性細胞が認められた

YAMAGUCHI UNIVERSITY ABM/療法における肝機能改善メカニズム(仮説)

肝内浸潤骨髄細胞

Nicheの改善

サイトカイン・増殖因子(FGF2)放出

線維溶解 (血流増加)

肝細胞への分化 ← 肝幹細胞活性化 → 残存肝細胞増殖

肝機能改善 (肝再生・修復)

平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題：肝がんの新規治療法に関する研究課題番号：H21-肝炎-一般-015予定期間：H21 年度から H23 年度まで研究代表者：本多 政夫所属研究機関：金沢大学所属部局：医薬保健研究域保健学系職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：

1 年目 68,640,000 円 2 年目 68,640,000 円 3 年目 63,149,000 円 計 200,429,000 円**I. 研究の意義**

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

II. 研究の目的、期待される成果

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

III. 3 年間の研究成果

•研究代表者(本多政夫)

全体研究として新規抗がん剤治療効果ならびに安全性調査を行った。新規分子標的薬ソラフェニブ投与症例 264 例、経皮的肝動脈塞栓新規抗がん剤であるミプラチン 535 例の治療効果並びに安全性調査を行った。「肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針 2010 年」を発行し、我が国における治療成績と副作用対策の指針を示した。現在さらに症例が追加され、ソラフェニブ投与症例 500 例、ミプラチン投与 1000 例のコホートが集積中であり、コホートの充実化と共に副作用・長期予後も含めた詳細な解析を進行中である。

個別研究として肝特異的血小板由来増殖因子(PDGF-C)過剰発現マウス及び高脂肪動脈硬化食非アルコール性脂肪性肝炎マウスモデルに対する非環式レチノイドの肝線維化抑制機序・肝がん抑制機序の解析を行った。非環式レチノイドによる肝線維化抑制効果・発がん抑制効果を確認した。

また非環式レチノイドの肝がん二次発がん抑制を目的とした国内第Ⅱ/Ⅲ相試験における薬物動態試験において、投与前と投与8週後の肝生検組織の遺伝子発現プロファイリングを行い投与8週後では再発群と非再発群では遺伝子発現パターンが異なることが明らかとなった。非環式レチノイドの治療反応性を分ける遺伝子が明らかとなった。

•研究分担者(金子周一)

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

•研究分担者(中本安成)

肝がんの局所療法と併用して二次発がん(再発)を抑制する治療法として、肝動脈塞栓療法(TAE)と同時に各種

の樹状細胞を投与する安全性臨床研究を行った。治療後12カ月以内の再発率は、OK-432刺激群において有意に低下した。Th1 サイトカイン(IL-9, IL-15, TNF α)の産生や骨髄由来抑制細胞(MDSC)の減弱作用によって二次発がんの抑制効果が発揮される可能性が示唆された。また、OK-432 と同時に亜鉛(Zn)を用いることによって、樹状細胞の活性化(CD83, CD86)、所属リンパ節への移動(CCR7)、貪食能が亢進することを見出した。

・研究分担者(恩地森一)

愛媛大学医学部附属病院に設立された GMP レベル細胞プロセッシングセンターを利用して、新たな第 I/II 相の臨床研究を開始した。進行肝がん症例5例から DC を誘導した。その後、腫瘍抗原パルス DC を作成して患者の皮下に投与した。全例で重篤な副作用はみられず、安全性が確認された。WT1 ペプチドを GMP グレードで合成し、肝がん患者 18 例に投与し、その安全性、治療効果について評価した。

・研究分担者(汐田剛史)

hTERT mRNA 高発現株として HepG2 を、低発現株として Hep3B 及び PLC/PRF/5 を決定した。転写開始点より上流 5 kbp のゲノム DNA を含む hTERT プロモーター下に EGFP を安定に発現する Hep3B 及び HepG2 由来細胞株を作成した。5043 種の mRNA を標的とするプール型 shRNA レンチウイルスライブラリーを用い hTERT 発現制御遺伝子の同定を行った。

・研究分担者(横須賀収)

ソラフェニブは肝機能良好な進行肝細胞がん患者の標準治療であるが、効果は限定的で強力な治療法開発が望まれている。S-1+ソラフェニブ併用療法の最大耐用量と用量制限毒性を決定した。推奨用量は S-1 64 mg/m² /day ソラフェニブ 400 mg bid であった。治療効果は SD が多くを占めた。

・研究分担者(寺井崇二)

肝細胞の発生を制御する HHM(Human Homologue of Maid, HHM)をクローニングし Maid 分子の肝発生、分化の重要性を明らかにしてきた。Maid を過剰発現させたトランスジェニックメダカでは DEN 処理後の BrdU の取り込み率が低下し、Maid が増殖抑制に働いていると考えられた。Maid KO マウスでは肝線維化がより誘導されることが明らかになった。Maid が肝線維化進展、肝発がんの両方を制御する分子である可能性が明らかになった。

・研究分担者(竹原徹郎)

マウスに α -GalCer を投与することにより、肝臓内の樹状細胞(DC)が効率的に活性化され、高い獲得免疫応答が誘導されることを示した。また肝がんを高発現する Bcl-xL に対する特異的阻害剤 ABT-737 を用いた研究を行った。肝がん細胞株にアポトーシスを誘導するためには高濃度の ABT-737 が必要であり、この治療抵抗性に Mcl-1 の誘導的発現が関与していた。ソラフェニブは Mcl-1 発現抑制効果があり、ソラフェニブと ABT-737 を併用することにより、腫瘍が退縮することを培養細胞および xenograft モデルで明らかにした。

・研究分担者(古瀬純司)

ソラフェニブの使用に際し、実際の臨床では Child-Pugh B の軽度肝機能低下例も適応となる症例も多く、Child-Pugh A および B を含めた患者でのソラフェニブの安全性や有効性を多数例で評価する必要がある。Child-Pugh score 5-8 点の肝がん患者を対象とし、試験を実施し、現在 14 施設が登録可能となった。平成 22 年 4 月から登録が開始され、現在、Child-Pugh A 40 例、B 9 例が登録され、試験を継続中である。

・研究分担者(上野義之)

肝硬変で出現するアミノ酸不均衡が免疫機構に与える影響について解析し、進行した肝硬変患者に出現する L-シスチン(L-Cys) / L-グルタミン酸(L-Glu) 不均衡に注目し免疫細胞(単球)に与える影響を解析した。肝がん・肝硬変患者に出現する L-Cys / L-Glu 不均衡は単球に酸化ストレスを与え TNF- α の産生異常を起こす可能性が示唆された。

・研究分担者(廣石和正)

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

・研究分担者(西口修平)

インターフェロンの抗腫瘍効果に関して *in vitro* および *in vivo* で検討を行った。インターフェロンは血管新生抑制とアポトーシス誘導増強を介してソラフェニブの抗腫瘍効果を高める可能性を明らかにした。

・研究分担者(工藤正俊)

ソラフェニブがシグナル伝達経路阻害によって「Anti-EMT」作用を有することを初めて報告した。また新規

VEGFR2 チロシナーゼ阻害剤である BIBF1120 が肝がんで有効であること、VEGFR2 陽性末梢血白血球のリン酸化抑制が薬力学的な効果を反映するバイオマーカーとして有用であることを報告した。

•研究分担者(森脇久隆)

非環式レチノイドがリン酸化 RXR α を分子標的とすることで、マウスの肥満関連肝発がんを抑制することを明らかにした。また、脂質や糖代謝を制御する核内受容体 FXR の合成リガンドや、分岐鎖アミノ酸と非環式レチノイドを併用することで、肝がん細胞に相乗的な増殖抑制が起きることを確認した。

•研究分担者(山本和秀)

肝がん患者での糖鎖パターンの変化による、診断・肝癌化学療法効果予測について解析を行った。血清中の糖鎖を網羅的に解析するスイートプロットを用い、肝がん患者で糖鎖発現パターンが変化していることを明らかとした。皮膚合併症等を事前に予測できる可能性のある糖鎖を見出し、今後の前向き試験の基礎となるデータを得た。

•研究分担者(池田健次)

肝がん患者における血液中循環がん細胞 (CTC) 検出の有効性を検討した。転移群検出としての感度は 53%、特異度 100%であった。また、新規抗がん剤ミプラチンの治療効果を検討した。動注治療 3 ヶ月後の効果判定 (N=206) では TE4 が 49 例、TE3 が 50 例 (奏効率 48%) で、重大な副作用はなかった。ミプラチンは新規動注用抗がん剤として安全に使用可能な薬剤であった。

•研究分担者(佐田通夫)

単施設におけるリピオドール混和シスプラチンと 5-FU 併用動注化学療法 (NFP) の治療効果を評価し、51 例の切除不能肝がん症例に対する治療成績は CR 10 例、PR 34 例で、平均生存期間は 33 カ月であった。また、多施設間における NFP 療法の治療効果を検討し、52 例の切除不能肝がん症例に対する治療成績は CR 10 例、PR 29 例、SD 11 例、PD 2 例、平均生存期間は 27 カ月、腫瘍の無増悪期間は 8.5 カ月であった。重篤な副作用は少なく、NFP 療法の高度進行肝がんに対する有効性が示唆された。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1)平成21年から23年の成果を基に「肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針2010年」を発行した。今後、新たな課題として、これらのコホートの充実化をはかり、副作用・長期予後も含めた更なる詳細な解析を行う。
- (2)新規抗がん剤使用の問題点、開始投与量、投与期間、治療効果の判定、投与中止基準などこれまでの3年間の班研究で示されなかった課題について明らかにする。また随時ガイドラインの更新を行い、肝がん診療の指針を示す。
- (3) ゲノミクスの技術を導入しゲノムワイド関連解析 (GWAS) から、重篤な副作用と関連する SNP を同定し、最適な治療法の選択に有用なマーカーの検索を行う。
- (4)次世代シーケンサー解析を導入した治療標的遺伝子の同定、レチノイドの 2 次発がん予防の解析、安全性・有効性が確認されつつあるペプチドワクチン・樹状細胞療法を含む免疫療法の開発、がん幹細胞を標的とした治療法の確立に関わる研究を推進する。

V. 行政施策への貢献の可能性

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

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等) (論文 149 編より抜粋)

研究代表者: 本多 政夫

1. [Honda M](#), Takehana K, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group, et al. Malnutrition Impairs Interferon Signaling Through mTOR and FoxO Pathways in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011 141(1):128-140.
2. [Honda M](#), Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2010 53(5):817-26.
3. [Honda M](#), Sakai A, Yamashita T, et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010 139(2):499-509.
4. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, [Honda M](#), et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009 41(10):1105-9
5. Ura S, [Honda M](#), et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009 49(4):1098-112.
6. 金子周一, 古瀬純司, 工藤正俊, 池田健次, 本多政夫, 他. 肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針 2010 年度版 平成 22 年度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). *肝臓* 52 巻 8 号 532-551 2011.

研究分担者: 金子 周一

1. Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, [Kaneko S](#). Identification of a Secretory Protein

- c19orf10 Activated in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Cancer*. 2011 129(7):1576-85.
2. T Yamashita, M Honda and S Kaneko. Differentiation of Cancer Stem Cells. In Stanley Shostak (eds): *Cancer Stem Cells - The Cutting Edge* InTech pp337-350, 2011.
 3. T Yamashita, M Honda, K Nio, Y Nakamoto, T Yamashita, H Takamura, T Tani, Y Zen, S Kaneko. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res* 70(11):4687-4697, 2010.
 4. H Misu, T Takamura, H Takayama, H Hayashi, N Matsuzawa-Nagata, S Kurita, K Ishikura, H Ando, Y Takeshita, T Ota, M Sakurai, T Yamashita, E Mizukoshi, T Yamashita, M Honda, K Miyamoto, T Kubota, N Kubota, T Kadowaki, HJ Kim, IK Lee, Y Minokoshi, Y Saito, K Takahashi, Y Yamada, N Takakura, S Kaneko. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab* 12(5):483-95, 2010 .
 5. T Yamashita, J Ji, A Budhu, M Forgues, W Yang, HY Wang, H Jia, Q Ye, LX Qin, E Wauthier, LM Reid, H Minato, M Honda, S Kaneko, et al. EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features. *Gastroenterology* 136(3):1012-1024, 2009.

研究分担者: 中本 安成

1. Mizukoshi E, Nakamoto Y, et al. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 53: 1206-1216, 2011.
2. Iida N, Nakamoto Y, et al. Antitumor effect after radio-frequency ablation of murine hepatoma is augmented by an active variant of cc chemokine ligand 3/macrophage inflammatory protein-1alpha. *Cancer Res*. 70: 6556-6565, 2010.
3. Wu Y, Wang YY, Nakamoto Y, et al. Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in the liver. *Oncogene* 29: 2228-2237, 2010.
4. Baba T, Nakamoto Y and Mukaida N. Crucial contribution of thymic Sirp alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J. Immunol*. 183: 3053-3063, 2009.

研究分担者: 恩地 森一

1. Chen S, Onji M. et al. Immune suppressive functions of hepatic myeloid-derived suppressor cells of normal mice and in a murine model of chronic hepatitis B virus. *Clin Exp Immunol* 166:134-142, 2011.
2. Akbar SMF, Onji M. et al. Immune modulator and antiviral potential of dendritic cells pulsed with both hepatitis B surface antigen and core antigen for treating chronic HBV infection. *Antivir Ther* 15: 887-895, 2010.
3. Yoshida O, Onji M. et al. Regulatory natural killer cells in murine liver and their immunosuppressive capacity. *Liver Int* 30: 906-912, 2010.

研究分担者: 横須賀 収

1. Chiba T, Suzuki E, Negishi M, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Tanaka S, Tada M, Kanai F, Imazeki F, Iwama A, Yokosuka O. 3-Deazaneplanocin A is a promising therapeutic agent for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2011 Jun 29. [Epub ahead of print]
2. Ogasawara S, Kanai F, Obi S, Sato S, Yamaguchi T, Azemoto R, Mizumoto H, Koushima Y, Morimoto N, Hirata N, Toriyabe T, Shinozaki Y, Ooka Y, Mikata R, Chiba T, Okabe S, Imazeki F, Yoshikawa M, Yokosuka O. Safety and tolerance of sorafenib in Japanese patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int*. 2011 5(3):850-6.
3. Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. *J Hepatol*. 2010 52(1):72-8.
4. Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, Iwama A. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective. *Cancer Lett*. 2009 286(2):145-53.

研究分担者: 寺井 崇二

1. Fujisawa K, Terai S, et al. Senescence marker protein 30 (SMP30)/regucalcin (RGN) expression decreases with aging, acute liver injuries and tumors in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Oct 22;414(2):331-6.
2. Itoh M, Suganami T, Nakagawa N, Tanaka M, Yamamoto Y, Kamei Y, Terai S, et al. Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol*. 2011 Nov;179(5):2454-63.
3. Yamasaki T, Terai S, Sakaida I. Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2011 Aug 11;365(6):576-8.
4. Negishi T, Nagai Y, Asaoka Y, Ohno M, Namae M, Mitani H, Sasaki T, Shimizu N, Terai S, et al. Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka. *Hepatology*. 2010 Mar;51(3):1037-45.

研究分担者: 竹原 徹郎

1. Hikita H, Takehara T, et al. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 52: 1310-1321, 2010.
2. Shimizu S, Takehara T, et al. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 52: 698-704, 2010.
3. Kohga K, Takehara T, et al. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. *Hepatology* 51: 1264-1273, 2010.
4. Hikita H, Takehara T et al. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology* 50: 1217-1226, 2009.

研究分担者: 古瀬 純司

1. Furuse J, et al. Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and efficacy of S-1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2010;101(12):2606-2611.
2. Furuse J, et al. Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and efficacy of S-1 in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2010;101(12):2606-2611.
3. Chen PJ, Furuse J, et al. Issues and controversies of hepatocellular carcinoma-targeted therapy clinical trials in Asia: experts' opinion. *Liver Int*. 2010;30(10):1427-1438.

研究分担者: 上野 義之

1. Kakazu E, Ueno Y, et al. Plasma L-cystine/L-glutamate imbalance increases tumor necrosis factor-alpha from CD14+ circulating monocytes in patients with advanced cirrhosis. *PloS one* 6: e23402, 2011.
2. Kondo Y, Ueno Y, et al. 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.
3. Obara N, Fukushima K, Ueno Y, et al. Possible involvement and the mechanisms of excess trans-fatty acid consumption in severe NAFLD in mice. *J Hepatol* 53: 326-334, 2010.

研究分担者: 廣石 和正

1. 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, 2010.
2. Hiroishi K, et al. Strong CD8+ T-cell responses against tumor-associated antigens prolong the recurrence-free interval after tumor treatment in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 45 (4): 451-458, 2010.
3. Doi H, Hiroishi K, et al. Magnitude of CD8+ T-cell responses against hepatitis C virus and severity of hepatitis do not necessarily determine outcomes in acute hepatitis C virus infection. *Hepatol Res* 39 (3): 256-265, 2009.

研究分担者: 西口 修平

1. Shimomura S, Ikeda N, Saito M, Ishii A, Takashima T, Sakai Y, Yoshikawa S, Aizawa N, Tanaka H, Iwata Y, Enomoto H., Imanishi H, Yamamoto T, Jomura H, Nakamura H, Iijima H, Nishiguchi S. Long-term interferon therapy after radiofrequency ablation is effective in treating patients with HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatol. Int.*, 5:559-566, 2011.
2. 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.
3. 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.

研究分担者: 工藤 正俊

1. Sakamoto H, Kimura H, Sekijima M, Matsumoto K, Arai T, Chikugo T, Yamada Y, Kitano M, Ito A, Takeyama Y, Kudo M, Nishio K. Plasma concentrations of angiogenesis-related molecules in patients with pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol.* (in press).
2. Nagai T, Arai T, Furuta K, Sakai K, Kudo K, Kaneda H, Tamura D, Aomatsu K, Kimura H, Fujita Y, Matsumoto K, Saijo N, Kudo M, Nishio K. Sorafenib inhibits the hepatocyte growth factor-mediated epithelial mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(1):169-77.
3. Kudo K, Arai T, Tanaka K, Nagai T, Furuta K, Sakai K, Kaneda H, Matsumoto K, Tamura D, Aomatsu K, Marco A. De Velasco, Fujita Y, Saijo N, Kudo M, Nishio K. Antitumor Activity of BIBF 1120, a Triple Angiokinase Inhibitor, and Use of VEGFR2+pTyr+ Peripheral Blood Leukocytes as a Pharmacodynamic Biomarker. *Clin Cancer Res.* 2011 17(6):1373-81.

研究分担者: 森脇 久隆

1. Ninomiya S, Shimizu M, Imai K, Takai K, Shiraki M, Hara T, Tsurumi H, Ishizaki S, Moriwaki H. Possible Role of Visfatin in Hepatoma Progression and the Effects of Branched-Chain Amino Acids on Visfatin-Induced Proliferation in Human Hepatoma Cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011 Nov 8. [Epub ahead of print]
2. Shimizu M, Yasuda Y, Sakai H, Kubota M, Terakura D, Baba A, Ohno T, Kochi T, Tsurumi H, Tanaka T, Moriwaki H. Pitavastatin suppresses diethylnitrosamine-induced liver preneoplasms in male C57BL/KsJ-db/db obese mice. *BMC Cancer* 2011;11:281.
3. Shimizu M, Sakai H, Shirakami Y, Yasuda Y, Kubota M, Terakura D, Baba A, Ohno T, Hara Y, Tanaka T, Moriwaki H. Preventive effects of (-)-epigallocatechin gallate on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in obese and diabetic C57BL/KsJ-db/db Mice. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4(3):396-403.

研究分担者: 山本 和秀

1. Kinugasa H, Nouse K, Takeuchi Y, Yasunaka T, Onishi H, Nakamura S, Shiraha H, Kuwaki K, Hagihara H, Ikeda F, Miyake Y, Takaki A, Yamamoto K. Risk factors for recurrence after transarterial chemoembolization for early-stage hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2011 Nov 3. [Epub ahead of print].
2. Miyahara K, Nouse K, Tomoda T, Kobayashi S, Hagihara H, Kuwaki K, Toshimori J, Onishi H, Ikeda F, Miyake Y, Nakamura S, Shiraha H, Takaki A, Yamamoto K. Predicting the treatment effect of sorafenib using serum angiogenesis markers in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(11):1604-11.
3. Nakanishi Y, Shiraha H, Nishina SI, Tanaka S, Matsubara M, Horiguchi S, Iwamuro M, Takaoka N, Uemura M, Kuwaki K, Hagihara H, Toshimori J, Ohnishi H, Takaki A, Nakamura S, Kobayashi Y, Nouse K, Yagi T, Yamamoto K. Loss of runt-related transcription factor 3 expression leads hepatocellular carcinoma cells to escape apoptosis. *BMC Cancer.* 11(1):3, 2011

研究分担者: 池田 健次

1. Imai N, Ikeda K, et al. Previous chemoembolization response after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) can predict the anti-tumor effect of subsequent TACE with miriplatin in patients with recurrent hepatocellular carcinoma. *Oncology* 2011; 80: 188-94.
2. Ikeda K, et al. Stage progression of small hepatocellular carcinoma after radical therapy: comparisons of radiofrequency ablation and surgery using the Markov model. *Liver Int* 2011; 31: 692-9.
3. Ikeda K, et al. Administration of interferon for two or more years decreases early stage hepatocellular carcinoma recurrence rate after radical ablation: A retrospective study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatol Res*, 2010; 40: 1168-1175.

研究分担者: 佐田 通夫

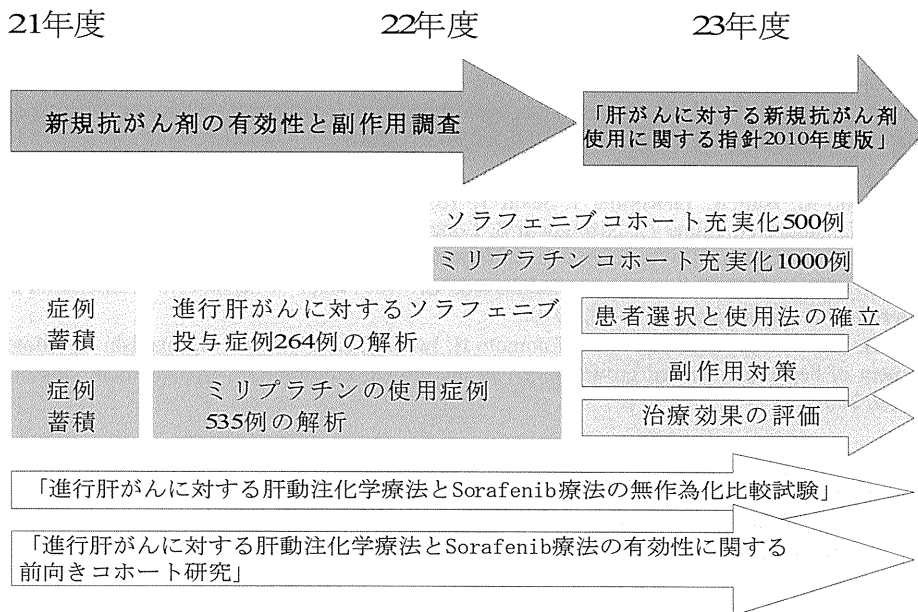
1. Iwamoto H, Torimura T, Nakamura T, Sata M, et al. Metronomic S-1 chemotherapy and vandetanib; an efficacious and nontoxic treatment for hepatocellular carcinoma. *Neoplasia*, 2011; 13: 187-197.
2. Nagamatsu H, Hiraki M, Torimura T, Sata M, et al. Intra-arterial therapy with cisplatin suspension in lipiodol and 5-fluorouracil for hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010; 32: 543-550.
3. Nagaoka S, Yoshida T, Torimura T, Sata M et al. The ratio of serum placenta growth factor to soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 predicts the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2010; 23: 1647-1654.

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

全体研究

● 新規抗がん剤の適正使用に関する研究



個別研究

● 新規抗がん剤の研究

がん幹細胞に対する治療法の確立

肝幹細胞マーカーであるEpCAMとAFPを用いた新たな肝細胞癌分類システムの構築 (金子)。

EpCAM陽性癌幹細胞では5-FU耐性に関連する dUTPaseが高発現する (金子)。

Oncostatin M (OSM) 投与と肝がん幹細胞の分化誘導を阻害し5-FUの感受性を *in vitro* 及び *in vivo* で高める (金子)。

セラサーチンシステムによる血液中の循環がん細胞 (CTC) 検出の有効性の検証 (池田)。

2次発がん予防 レチノイド

非環式レチノイドはPDGF-Cマウス及び高脂肪動脈硬化NASHマウスの肝線維化・肝発がんを抑制する (本多)。

非環式レチノイドとHER2抗体やHDAC阻害剤と併用は、肝がん細胞の増殖を相乗的に抑制する (森脇)。

非環式レチノイドはob/obマウスのDEN肝発がんを抑制し、脂質代謝・インスリン抵抗性を改善する (森脇)。

C型肝がんの根治的治療後に非環式レチノイドを投与し投与前、投与2ヶ月後の肝組織の遺伝子発現から肝がん再発に関わる遺伝子発現を同定した (本多)。

新規分子標的薬の開発

hTERT発現抑制剤遺伝子の同定 (沙田)。

Human Homologue of Mtdの肝がん肝前癌に対する機能発現 (坂井田)。

hTERTに対する特異的阻害剤ABT-737を用いた臨床研究 ABT-737とMtd阻害剤の併用効果 (竹原)。

IFNとSorafenibの併用効果の可能性 (西口)。

肝がん患者での糖鎖パターンの変化による、診断・肝がん化学療法効果予測 (山本)。

肝がんの免疫療法の確立

肝動注免疫療法 (TAE) と同時に樹状細胞投与する安全性臨床研究の実施 二次発がんの抑制効果を評価する可能性が示唆された (中森)。

進行肝がん症例5例から腫瘍抗原パルスDCを作成して患者の皮下に投与。重篤な副作用はみられず、安全性が確認された。WT1ペプチドワクチンの安全性を確認 (恩地)。

α-GalCer投与は、マウス肝臓内の樹状細胞 (DC) を効率的に活性化、高い獲得免疫応答を誘導する。Bcl-2に対する特異的阻害剤ABT-737とソラフェニブ併用効果の検討 (竹原)。

肝前癌で出現するアミノ酸不均衡と単糖を中心とする免疫調節機構について解析 (上野)。

MAGE-1抗原 Cyti can-3抗原 NY-ESO-1抗原に対する腫瘍特異性細胞応答と患者の臨床経過との関連の検証 (廣石)。

新規抗がん剤の開発・臨床試験

進行肝がん患者を対象としたTS1+ソラフェニブ併用療法の第一相臨床試験の実施 (横須賀)。

Child-Pugh AおよびBを含めた患者でのソラフェニブの安全性や有効性を多発例で評価 (吉野)。

新規抗がん剤ミリプラチンの治療効果の検証 (池田)。

リビドール阻害剤ミリプラチンと5-FU併用動注化学療法 (NF) の治療効果の評価 (佐田)。

●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

・過去に所属した研究機関の履歴

平成2年～平成3年 金沢大学がん研究所生物物理部

平成6年～平成9年 米国ノースカロライナ大学チャペルヒル校

平成11年 米国スタンフォード大学消化器・生化学部門短期留学
(ウイルス肝炎財団海外派遣助成)

平成13年～平成19年 金沢大学大学院医学系研究科 助教授

平成19年～現在 金沢大学医薬保健学域・先端医療技術学 教授

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

平成2年～平成3年 金沢大学がん研究所生物物理部 村上清史 教授

平成6年～平成9年 米国ノースカロライナ大学チャペルヒル校 Stanley M Lemon 教授

平成13年～現在 金沢大学大学院医学系研究科 小林健一教授・金子周一教授

・主な研究課題

- 慢性C型肝炎の治療抵抗性獲得機序の解明
- 肝発癌の解析と、肝癌診断および治療に関する研究
- Genomics技術を用いた肝臓病学、および血液を用いた診断学の研究

・これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、**太字・斜体**文字で記載してください)

※発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

過去5年間39編より抜粋

- Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada SI, 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. *Hepatol Int*. 2011 Aug 18. [Epub ahead of print]
- Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S. Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncology*. 2011 81(5-6):281-290.***
- Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Identification of a Secretory Protein c19orf10 Activated in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Cancer*. 2011 129(7):1576-85.***
- Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet*. 2011 20(17):3507-16.
- Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition Impairs Interferon Signaling Through mTOR and FoxO Pathways in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011 141(1):128-140.***
- Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T-cell responses in patients with hepatocellular

- carcinoma. *Hepatology*. 2011 53(4):1206-16.
7. 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 54(3):439-48.
 8. 金子周一, 古瀬純司, 工藤正俊, 池田健次, 本多政夫, 中本安成, 恩地森一, 汐田剛史, 横須賀收, 坂井田功, 竹原徹郎, 上野義之, 廣石和正, 西口修平, 森脇久隆, 山本和秀, 佐田通夫, 小尾俊太郎, 宮山士朗, 今井幸紀, 新規抗がん剤使用ガイド作成委員会. 肝がんに対する新規抗がん剤使用に関する指針 2010 年度版 平成 22 年度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). *肝臓* 52 巻 8 号 532-551 2011.
 9. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. *Cell Metab*. 2010 12(5):483-95.
 10. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. Honda M, Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. *J Hepatol*. 2010 53(5):817-26.
 11. Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 400(1):7-15.
 12. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. *Gastroenterology*. 2010 139(2):499-509.
 13. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. *J Infect Dis*. 2010 202(1):75-85.
 14. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. *Cancer Res*. 2010 70(11):4687-97.
 15. CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under ER stress in patients with type 2 diabetes. Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S. *Diabetes*. 2010 59(3):634-43.
 16. Altered hepatic gene expression profiles associated with myocardial ischemia. Ootsuji H, Honda M, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 3(1):68-77.
 17. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. *Nat Genet*. 2009 41(10):1105-9.
 18. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. *Hepatology*. 2009 49(4):1098-112.
 19. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. *Gastroenterology*. 2009 136(3):1012-24.
 20. Activation of Lipogenic Pathway Correlates with Cell Proliferation and Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Kaneko S. *J Hepatol*. 2009 50(1):100-10.
 21. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the human hepatocellular carcinoma. Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Teramoto R, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Ueda T, Kamijo K, Kaneko S. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 366(1):186-92.
 22. Protein expression profile characteristic to hepatocellular carcinoma revealed by 2D-DIGE with supervised learning. Teramoto R, Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Kamijo K, Ueda T, Kaneko S. *Biochim Biophys Acta*. 2008 1784(5):764-72.
 23. Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma. Nishino R, Honda M, Yamashita T, Takatori H, Minato H, Zen Y, Sasaki M, Takamura H, Horimoto K, Ohta T, Nakanuma Y, Kaneko S. *J Hepatol*. 2008 49(2):207-16.
 24. Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S. *J Hepatol*. 2008 49(6):946-54.

25. Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S. Cancer Res. 2008 68(24):10267-79.
26. Expression profiling of peripheral-blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C undergoing interferon therapy. Tateno M, Honda M, Kawamura T, Honda H, Kaneko S. J Infect Dis. 2007 195(2):255-67.

・ 平成 24 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

※申請している場合は、申請課題名を記載して下さい。

肝がんの新規治療法に関する研究 (24190601)

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

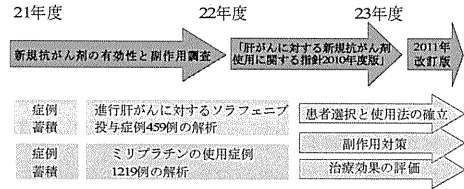
研究課題:

肝がんの新規治療法に関する研究
(H21-肝炎一般-015)

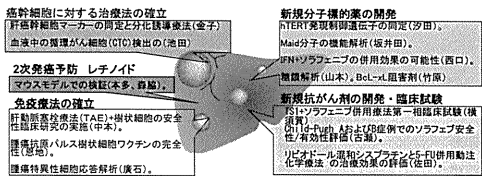
研究代表者 本多政夫

班研究の流れ

● 全体研究 新規抗がん剤の適正使用に関する研究



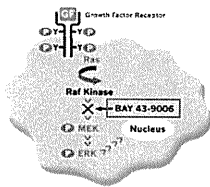
● 個別研究 肝がんの新規治療法の開発



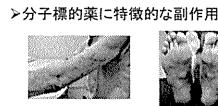
肝がんに対する新規抗がん剤に関する日本国内の状況

- ソラフェニブ (2009年5月)
- ミリプラチン (2010年1月)

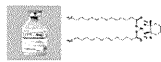
> 肝がん初の分子標的薬 (Ras, VEGF etc)



腫瘍細胞/血管新生の抑制

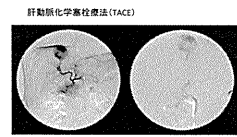


> 分子標的薬に特徴的な副作用



> 第2世代の白金製剤であり、リビオドールと感濁して肝動脈塞栓療法に使用可能

> 肝動脈塞栓剤を併用することの有効性と安全性はRCT進行中

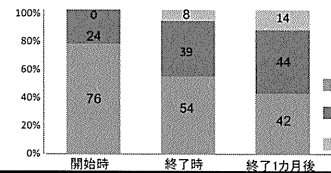


肝動脈化学塞栓療法 (TACE)

肝がんに対する新規抗がん剤の有効性と安全性評価
副作用—ソラフェニブ—

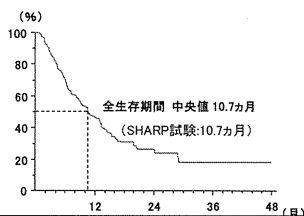
副作用	班研究 (n=382)		市販後調査 (n=777)		SHARP試験 (n=287)		Asian-Pacific試験 (n=149)	
	全(%)	G3/4(%)	全(%)	重篤(%)	全(%)	G3/4(%)	全(%)	G3/4(%)
手足皮膚反応	49	10	47.9	2.8	21.2	7.7	45.0	10.7
皮疹・落屑	24	3	20.7	3.1	15.8	1.0	21.1	0.7
下痢	34	1	21.9	1.4	39.1	8.4	25.5	6.0
食欲不振	27	4	13.8	1.9	13.8	0.3	12.8	0
高血圧	30	6	19.2	0.6	5.1	1.7	18.8	2.0
疲労	23	2	4.6	0.6	—	—	20.1	3.4
脱毛	18	—	11.4	—	13.8	—	24.8	—

Child-Pugh分類の推移



肝がんに対する新規抗がん剤の有効性と安全性評価
腫瘍制御率—ソラフェニブ—

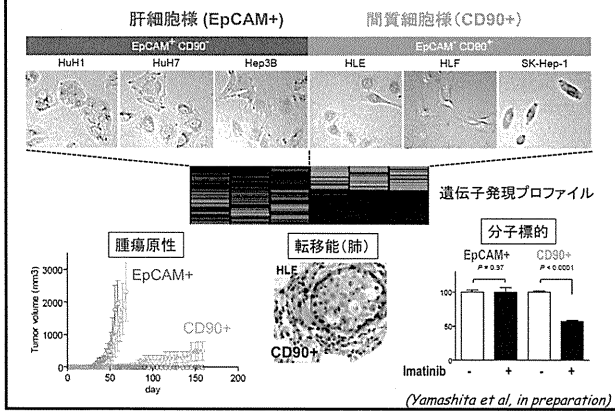
	班研究 (n=361)	開始量		SHARP試験 (n=299)	Asia-Pacific試験 (n=150)
		800mg開始群 (n=250)	減量開始群 (n=110)		
完全奏効 (%)	0	0	0	0	0
部分奏効 (%)	7	8	5	2	5
安定 (%)	42	43	38	71	46
増悪 (%)	39	38	40	—	—
奏効率 (%)	7	8	5	2	5
腫瘍制御率 (%)	48	51	43	73	51



肝がんに対する新規抗がん剤の有効性と安全性評価
治療効果関連因子—ソラフェニブ—

	n	腫瘍制御率 (%)	p 値
年齢	70歳以上	195	50
	70歳未満	166	46
性別	男性	279	49
	女性	78	45
HBs抗原	陽性	78	53
	陰性	278	47
HCV抗体	陽性	209	46
	陰性	147	52
開始量	通常量	110	43
	減量	250	51
最大腫瘍径	30mm以上	179	44
	30mm未満	152	55
治療前Alb値	3.5以上	178	56
	3.5未満	159	40
治療前AFP値	100以上	187	41
	100未満	145	59
治療前PIVKA II値	400以上	184	43
	400未満	142	56

EpCAM+とCD90+癌幹細胞は腫瘍原性、転移能、薬剤感受性が異なる



研究成果のまとめ

全体研究

- 新規抗がん剤であるソラフェニブ及びミリプラチンの我が国における有効性と副作用の現状を明らかにし、「肝がんの新規抗がん剤の適正使用に関するガイドライン」を作成した。

個別研究

- 非環式レチノイドの作用機序の解明や、肝がん幹細胞マーカーの研究、及び肝がん幹細胞を標的とした治療法の開発を行い、新規肝がん治療の開発に関わる研究を行った。

平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題：膜蛋白質発現系を利用した C 型肝炎ウイルス感染受容体の生化学的・疫学的解析及び感染阻害剤の開発

課題番号：H21-肝炎-若手-016

予定期間：H21 年度から H23 年度まで

研究代表者：阿部 康弘

所属研究機関：独立行政法人医薬基盤研究所

所属部局：創薬基盤研究部

職名：プロジェクト研究員

年次別研究費(交付決定額)：

1 年目 4,835,000 円 2 年目 4,835,000 円 3 年目 4,714,000 円 計 14,384,000 円

I. 研究の意義

- (1) 近年の C 型肝炎ウイルス (HCV) 排除活性を有するインターフェロン療法の進歩に伴い、C 型肝炎の奏効率は 50% まで改善されているものの、重篤な副作用や、耐性ウイルスの出現、高ウイルス量患者には効果が乏しいことから、HCV 感染阻害薬、感染受容体アンタゴニストの創出が急務である。
- (2) HCV 感染受容体を intact な状態で精製するのが困難なこと、抗原性が低く細胞外領域に対する抗体の作製に成功例が少ないため、HCV 感染機構の生化学的解析は遅々として進展していない。
- (3) 本研究は、独自の基盤技術を駆使することで、HCV 感染受容体の生化学的解析を基に HCV 感染阻害薬の創出を試みるものであり、独創性・優位性を兼ね備えたテーマである。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 出芽バキュロウイルス (BV) 膜蛋白質発現系を利用した生化学的解析による HCV 感染機構の解明。
- (2) 独自のアンタゴニスト創出技術を活用して作製した HCV 感染受容体アンタゴニストを出発材料として、生体内安定性、阻害域を改変した感染阻害薬の創出。
- (3) 本研究成果は、患者のみならず医療従事者等のハイリスクグループに対して感染予防法を提供できる可能性がある。

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者(阿部康弘)

受容体発現出芽バキュロウイルス (BV) を用いたウイルス感染評価系を構築するとともに、さらに HCV 感染受容体アンタゴニストの創製に着手し、以下の成果を得た。

- (1) 受容体発現 BV によるウイルス感染評価系の構築：Bac-to-Bac Expression System を用いて、アデノウイルス (Ad) の感染受容体 CAR を BV 膜上に提示している CAR 提示 BV を作製した。さらに CAR 発現 B16 細胞に対する 5 型 Ad ベクターの遺伝子導入活性を指標に、CAR 提示 BV の Ad 感染阻害効果を解析したところ、CAR 提示 BV は添加濃度依存的に Ad ベクターの感染を抑制できることが判明した。以上の結果より、受容体発現 BV はウイルスの感染評価系として応用可能であると考えられた。
- (2) 一本鎖抗体 (scFv) ライブラリの作製：研究分担者近藤が調整した occludin 提示 BV、CL-1 提示 BV を

免疫した自己免疫疾患マウスの脾臓、CL-2 提示 BV を免疫した CL-2 欠損マウスの脾臓、CL-3 提示 BV を免疫した CL-3 欠損マウスの脾臓を用いて、scFv ライブラリを新たに構築した。

(3) CL-1 結合性 scFv の取得：CL-1 提示 BV を用いたスクリーニングにより、CL-1 に親和性を有する scFv の取得に成功した。一方で、他の CL-4 提示 BV にも結合性を示したことから、現在、研究分担者近藤が作製した CL-1、CL-4、CL-5 発現細胞を用いて scFv の CL 特異性を比較解析している。

・研究分担者(近藤昌夫)

HCV 感染受容体発現 BV を作製し、感染阻害効果の解析を通じて、以下の成果を得た。

(1) HCV 感染受容体発現 BV の作製：Bac-to-Bac Expression System を用いて、HCV 感染受容体として同定されている CD81、CL-1、occludin、SR-BI をそれぞれ提示している BV を作製した。さらに、CL-1 および occludin を同時に発現した double 受容体提示 BV の作製にも成功している。

(2) HCV 感染受容体群の解析：各種 single 感染受容体提示 BV の HCV 感染阻害活性を HCVpp (ルシフェラーゼ発現により HCV 感染を評価可能) により解析したところ、いずれの single 感染受容体提示 BV 処理でも HCV 感染阻害活性が認められないことを明らかとした。

(3) iPS 由来肝様細胞を用いた解析：HCV 感染受容体の発現を比較解析したところ、ヒト iPS 細胞では CD81、occludin のみ発現していたのに対して、ヒト iPS 由来肝様細胞では 4 受容体全てが発現していた。HCV シュードウイルスを用いて感染能を評価したところ、ヒト iPS 細胞には感染は認められずヒト iPS 由来肝様細胞でのみ感染が観察された。本成果および Evans らの報告 (Nature, 446, 801, 2007) を踏まえると、HCV 感染には CL-1 が重要な役割を担っている可能性が示唆される。

(4) CL-1 免疫ライブラリの構築：CL-1 親和性に優れた scFv の創製を図るため、細胞外領域のみ human 型に置換したキメラ CL-1 提示 BV を作製した。さらに、DNA 免疫法での CL-1 免疫を開始すると同時に、BV エンベロープである gp64 トランスジェニックマウスに CL-1 提示 BV を免疫することで質の高い CL-1 免疫 scFv ライブラリの構築に着手している (抗体価の上昇を確認済み)。

IV. 今後考えられる新たな課題

本研究成果や過去の報告を考え合わせると、CL-1 は HCV 感染阻害法開発に向けた優れた標的分子となり得る可能性が示された。今後は、より CL-1 結合性に優れた scFv の創製を図るとともに、HCV 感染阻害薬としての有用性を追求していく予定である。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 患者のみならず医療従事者等のハイリスクグループに対して感染予防法を提供できる可能性がある。
- (2) 国民の健康寿命の増進、完治に伴う医療費の削減に貢献し、厚生労働行政的観点からも多大な社会効果が期待される。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

1. Abe Y, Yoshikawa T, Inoue M, Nomura T, Furuya T, Yamashita T, Nagano K, Nabeshi H, Yoshioka Y, Mukai Y, Nakagawa S, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Fine tuning of receptor-selectivity using a phage display system with one-step competitive panning., *Biomaterials*, 2011, 32(23):5498-504.
2. Imai S, Nagano K, Yoshida Y, Okamura T, Yamashita T, Abe Y, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Kamada H, Mukai Y, Nakagawa S, Tsutsumi Y, Tsunoda S. Development of a novel antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related