

れると発癌率は低下した。血小板数低値例は線維化が進展していると考えられるが、SVR が得られると高齢者においてはより発癌率が低下した。また、全体では再燃例と無効例では発癌率に有意差が見られなかったが、高齢者においては再燃例でも無効例に比し発癌率は有意に抑制されていた。SVR が得られやすいのは、年齢が低く、肝線維化が軽度で、血球数が多く、十分量の治療ができる患者であり、発癌抑制を考えると、早期に IFN 治療を考慮することが望ましいが、忍容性があれば高齢者でも PEGIFN α /RBV 併用療法は試みるべきと考えられた。PEGIFN α /RBV 治療後の経過については、今回は治療終了 24 週後の ALT 値で検討したが、ALT 値が低い方が発癌率は低く、再燃、無効例においても ALT 値を低く維持する必要がある。

一方、SVR が得られても発癌に年齢の因子は大きく関与しており、高齢者においてはよりきめ細かなフォローアップが必要である。また、治療前の値ではあるがフェリチン値が高値であり、酸化ストレスの関与も示唆された。

E. 結論

高齢者の SVR 率は低いが、SVR が得られると有意に発癌率は低下し、忍容性があれば高齢者でも PEGIFN α /RBV 併用療法は試みるべきである。しかし、SVR 例でも高齢者、肝線維化進展例は発癌に十分注意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Honda T., Katano Y., Kuzuya T., Hayashi K., Ishigami M., Itoh A.,

Hirooka Y., Nakano I., Ishikawa T., Toyoda K., Kumada T., Yamamoto K., Matsushita T., Kojima T., Takamatsu J., Goto H. Comparison of the efficacy of ribavirin plus peginterferon alfa-2b for chronic hepatitis C infection in patients with and without coagulation disorders. J Med Virol. 85:228-234.2013

2) Hayashi K, Katano Y., Kuzuya T, Tachi Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Ishikawa T, Nakano I, Urano F, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T, Goto H. Prevalence of hepatitis C virus genotype 1a in Japan and correlation of mutations in the NS5A region and single-nucleotide polymorphism of interleukin-28B with the response to combination therapy with pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin. J Med Virol. 84:438-444.2012.

3) Toyoda H, Kumada T, Tada T, Hayashi K, Honda T, Katano Y., Goto H, Kawaguchi T, Murakami Y, Matsuda F. Predictive value of early viral dynamics during peginterferon and ribavirin combination therapy based on genetic polymorphisms near the IL28B gene in patients infected with HCV genotype 1b. J Med Virol. 84:61-70.2012.

4) Ishizu Y, Katano Y., Honda T, Hayashi K, Ishigami M, Itoh A,

Hirooka Y, Nakano I, Goto H. Clinical impact of HFE mutations in Japanese patients with chronic hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol. 27.1112-1116.2012.

2.学会発表

- 1) 石津洋二、片野義明、中野聡、増田寛子、及部祐加子、葛谷貞二、舘佳彦、本多隆、林和彦、石上雅敏、中野功、後藤秀実:C型慢性肝炎患者に対するペグインターフェロン・リバビリン療法におけるHFE遺伝子変異の影響 第48回日本肝臓学会総会 総会 金沢 2012.6.
- 2) 舘佳彦、片野義明、後藤秀実、中野聡、増田寛子、石津洋二、葛谷貞二、本多隆、林和彦、石上雅敏、小野幸矢、鮫島庸一:C型慢性肝炎患者における肝酸化ストレスの肝発癌に対しての関連性についての検討 第48回日本肝臓学会総会 総会 金沢 2012.6.
- 3) 本多隆、片野義明、中野聡、増田寛子、及部祐加子、石津洋二、葛谷貞二、舘佳彦、林和彦、石上雅敏、中野功、石川哲也、後藤秀実:C型肝炎線維化進展例におけるペグインターフェロン/リバビリン併用療法の発癌抑制効果 ワークショップ 23 C型肝硬変患者に対する治療の現状と展開 第48回日本肝臓学会総会 総会 金沢 2012.6.
- 4) Honda T., Katano Y., Kuzuya T., Hayashi K., Ishigami M., Nakano I., Toyoda H., Kumada T., Yoshioka K., Goto H. Effect of combination therapy peginterferon alfa-2b and ribavirin on prevention of hepatocellular carcinoma in

advanced chronic hepatitis C. The 63rd American Association for the Study of Liver Diseases Boston 2012.11

- 5) Tachi Y., Goto H., Katano Y., Hayashi K. Hepatic oxidative stress is associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C who received peg-interferon plus ribavirin combination therapy. The 63rd American Association for the Study of Liver Diseases Boston 2012.11.
- 6) 片野義明、石上雅敏、後藤秀実:C型慢性肝炎に対する発癌を考慮した治療戦略 第16回日本肝臓学会大会 シンポジウム 2 C型肝炎治療の最前線 神戸 2012.10.
- 7) 本多隆、片野義明、後藤秀実:高齢者C型慢性肝炎におけるペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果と発癌抑制効果 第16回日本肝臓学会大会 ワークショップ 2 高齢者のC型肝炎—どう扱うか? 神戸 2012.10.

H.知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（平成 24 年度肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

樹状細胞と抗 TIM-3 抗体を用いた肝癌に対する免疫療法の検討
研究分担者 江口 潤一 昭和大学医学部消化器内科 助教

研究要旨

肝癌患者は全身状態の悪化により免疫抑制状態に陥っていることが多く、免疫療法で癌を治療するには、より効果的な抗腫瘍免疫を誘導する必要がある。本研究では肝癌に対する樹状細胞療法に抗 TIM-3 抗体を併用する免疫治療について検討した。マウス肝癌細胞株の皮下腫瘍モデルにおいて樹状細胞療法と抗 TIM-3 抗体を併用したところ、樹状細胞単独療法と比較して有意に高い抗腫瘍効果が得られることがわかった。樹状細胞療法に抗 TIM-3 抗体を併用したところ、T 細胞のアポトーシスが抑制されることが証明された。また、樹状細胞と抗 TIM-3 抗体を併用することにより、強い腫瘍特異的細胞傷害活性が誘導された。抗 TIM-3 抗体を併用することにより、樹状細胞の抗腫瘍作用を増強することが可能であり、今後これらの併用療法の臨床への応用が期待できると考えられた。

A. 研究目的

肝細胞癌患者のほとんどが肝硬変あるいは線維化の進行した慢性肝炎を合併しているため、全身状態の悪化している症例をしばしば認める。そのため進行例においては集学的治療を十分に行うことができないことが多く、副作用の少ない有効な治療法の開発が急務である。免疫療法もその一つとして期待されているが、担癌患者では免疫機能が低下しているため、強く効果的な抗腫瘍免疫を誘導する必要がある。今回我々は生体において活性化リンパ球を沈静化する負のシグナルの伝達に参与する TIM-3 を阻害する事により、従来の免疫療法をより効果的にすること

が可能であると考えた。本研究では強い抗腫瘍効果を持つ樹状細胞療法に抗 TIM-3 療法を併用した免疫療法に対する評価を行うことを目的とする。

B. 研究方法

肝癌細胞株として、マウス肝癌細胞株 BNL を用いた。まず、樹状細胞 3×10^6 cells と抗 TIM-3 抗体 (250 μ g/mouse) とを癌予防目的に投与した後、 2×10^5 cells の BNL をマウスに皮下接種して腫瘍の発現を観察した。次に治療モデルとして、 2×10^5 cells の BNL を皮下接種しあらかじめ皮下腫瘍を形成したマウスに、樹状細胞 3×10^6 cells と抗 TIM-3 抗体 (250 μ g/mouse) と

を治療目的に投与した後、腫瘍の大きさを測定した。また、BNLに免疫されたマウス脾細胞を *in-vitro* にて樹状細胞と抗TIM-3抗体にて刺激し、培養された脾細胞の表面マーカーをフローサイトメトリーにて解析を行った。さらに、樹状細胞と抗TIM-3抗体で免疫したマウスの脾細胞を用いて、⁵¹Cr-release法で腫瘍特異的細胞傷害活性を測定した。

(倫理面への配慮)

昭和大学動物実験委員会に動物実験実施申請書を提出し、倫理規定と照合された結果、実験実施の承認を得た。

C. 研究結果

あらかじめ樹状細胞と抗TIM-3抗体をワクチン目的に投与したところ、併用投与群では樹状細胞や抗TIM-3抗体単独投与と比較し、皮下腫瘍の発現が有意に抑制された ($p=0.004$ vs. 抗TIM-3抗体単独治療群、 $p=0.031$ vs. 樹状細胞単独治療群)。治療モデルでは樹状細胞と抗TIM-3抗体を併用して治療したときのみ、コントロール群と比較し皮下腫瘍の増大が有意に抑制された ($p=0.005$ vs. コントロール群)。 *In-vitro* にて抗TIM-3抗体で刺激したBNL免疫マウスの脾細胞より培養されたCD4およびCD8陽性細胞では7AADおよびCaspase8の発現比率が低下しており、抗TIM-3抗体の投与がリンパ球のアポトーシスを阻害している事が証明された。さらに樹状細胞と抗TIM-3抗体で免疫したマウスの脾細胞からは、他の治療

群と比較して、より強力な腫瘍特異的細胞傷害活性を誘導することが可能であった。

D. 考察

抗原提示細胞として、生体内の免疫を誘導する樹状細胞の抗腫瘍作用を、抗TIM-3抗体は増強することが明らかとなった。これらの治療は、今後の臨床への応用も期待できると考えられた。

E. 結論

樹状細胞と抗TIM-3抗体の併用療法は、マウス肝癌に対し抗腫瘍効果が認められ、今後、臨床応用が期待できると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Omori R, Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Kajiwara A, Ito T, Kogo M, Imawari M. Effects of interferon- α -transduced tumor cell vaccines and blockade of programmed cell death-1 on the growth of established tumors. *Cancer Gene Therapy* 19(9): 637-43, 2012.
- 2) 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-Ttype immune responses. *Oncology Reports* 27(6):1765-71, 2012.

2.学会発表

- 1) Miyashita M, Ito T, Uchikoshi M, Shimosuma Y, Arai J, Nozawa H, Shimazaki T, Morikawa K, Eguchi J, Imawari M. Abnormal activation of naïve B cells in patients with chronic hepatitis C. 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. Boston. 2012.
- 2) 林栄一、下間祐、江口潤一、宮下みゆき、川島悠、森川賢一、馬場俊之、伊藤敬義. インターフェロン療法後SVR患者に発症し、原発巣治療後に骨・リンパ節転移再発、乳腺転移を認めた肝細胞癌の1例. 第39回日本肝臓学会東部会. 東京. 2012.
- 3) 大森里紗、江口潤一、広石和正、梶原敦、土肥弘義、坂木理、笹川綾子、石井成明、井廻道夫. IL-4 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54回日本消化器病学会大会. 神戸. 2012.
- 4) 江口潤一、広石和正、井廻道夫. 肝細胞癌における細胞性免疫応答の検討と細胞障害性 T 細胞エピトープの同定. 第48回日本肝臓学会総会. 金沢. 2012.
- 5) 打越学、伊藤敬義、馬場俊之、江口潤一、森川賢一、井廻道夫. 遷延する黄疸で発見され、肝生検で診断された肝アミロイドーシスの2例. 第48回日本肝臓学会総会. 金沢. 2012.
- 6) Ohmori R, Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S, Sasagawa A, Sakaki M, Doi H, Kajiwara A, Imawari M. Effects of Interferon- α transduced tumor cell vaccines and blockade of programmed cell death 1 on the growth of established tumors. AACR Annual Meeting 2012. Chicago. 2012.
- 7) Ishii S, Hiroishi K, Eguchi J, Sakaki M, Doi H, Ohmori R, Kajiwara A, Imawari M. Cytokine therapy by allogenic IFN-alpha expressing murine colorectal cancer cells suppresses outgrowth of established tumors in a murine hepatocellular carcinoma model. AACR Annual Meeting 2012. Chicago. 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得なし
2. 実用新案登録なし
3. その他

ウイルス性肝炎・肝がんにおける抗原特異的な免疫制御に関する研究

研究分担者 中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨： 独自に確立した世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースに基づいて、肝がん特異的な14種類のがん抗原におけるHLA-A24モチーフ拘束性の細胞障害性Tリンパ球（CTL）抗原ペプチド27個を同定してきた。なかでもcyclophilin B, SART2, SART3, p53, MRP3, AFP, hTERTに対する反応が高頻度に認められた。そこで、GMPグレードのAFPペプチドワクチンを作製して進行肝がん20症例に対する臨床研究を実施した。その結果、NCI-CTCグレード3以上の有害事象が出現しないことを確認した。また、病勢コントロール率：45%（CR 1; SD 8; PD 11）の治療効果や、標準治療による制御困難な症例における著効（CR）を認めた。これより、肝がん患者における免疫原性の高い抗原ペプチドが同定されるとともに、ペプチドワクチンの安全性および有効性が示唆された。

A. 研究目的

肝がんの発がんや治療後の再発を制御する戦略として、腫瘍抗原特異的な免疫反応によって抗腫瘍効果を誘導する手法の有用性が示唆されている。我々は世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースに基づいて、肝がん特異的な14種類のがん抗原におけるHLA-A24モチーフ拘束性の細胞障害性Tリンパ球（CTL）抗原ペプチド27個を同定してきた。また、肝がん患者における検討において、特にcyclophilin B, SART2, SART3, p53, MRP3, AFP, hTERTに由来するペプチドに高い反応性を認めた。そこで、まずGMPグレードのAFPペプチドワクチンを作製して進行肝がん症例に対する臨床研究を実施した。

B. 研究方法

対象は標準的治療の効果が望めないと判断されるHLA-A24陽性の肝がん患者20例とした。患者の平均年齢72.5歳、男女比12:8、病因（C型/B型/他）13/3/4、がん臨床病期（III/IVa/IVb）11/2/7、肝予備能（Child-Pugh A/B）8/12、腫瘍マーカーAFP値2,095.5（136-96, 220）であった。AFPペプチドワクチン（GMPグレード）の投与は2週間隔で3回皮下注射（1コース）を行い、投与前、投与終了後4週目の末梢血を用いて免疫学的に検討した。主要評価項目として、有害事象の種類と発現頻度、免疫学的モニタリングによる特異的免疫反応の誘導を観察した。副次評価項目として、がん病変の縮小率、腫瘍マーカーの推移を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたっては、倫理性・安全性の確保に十分配慮した。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従うとともに、実施機関の「医学部倫理審査委員会」の審査体制のもとに行った。また、個人情報保護の観点からすべてのサンプル及び結果は番号化した。

C. 研究結果

1) AFPワクチンの投与に伴う有害事象について、NCI-CTCグレード1（下腿浮腫1例、掻痒症4例、皮下硬結7例、発赤6例、下痢1例）、グレード2（発熱1例）を認めたが、グレード3以上の出現はなかった。
2) 治療効果について、CR 1例、SD 8例、PD 11例であり、病勢コントロール率45%（CR + SD : 9/20）であった。
3) 治療症例における免疫（CTL）反応は、5/20例（CR 1例、SD 3例、PD 1例）に出現したが、治療効果との有意な相関は確認されなかった。
4) CRを認めた1例の経過において、外科的肝切除、ラジオ波焼灼療法、肝動脈塞栓療法、化学療法といった一連の標準治療に抵抗性を示した後に、本ワクチン治療が実施された。その結果、本治療の施行後600日以上にわたってCR状態が維持されており、極めて高い有効性が示された症例と考えられた。

D. 考察

悪性黒色腫をはじめとする多くの癌腫に対するペプチドワクチンについて、有用性を検討する臨床研究が世界中で展開されて

いるが、いずれも未だ発展の途上にある。本研究では、これまで独自に同定してきた肝がんに対する新規の抗原エピトープの中で、AFPに由来するペプチドを用いて臨床的有用性を検討した。

ペプチドワクチンの特長は、非がん組織には認めずに腫瘍細胞に特異的に存在する抗原を標的として、宿主の免疫反応を賦活するという概念である。これより、有害事象が少なく安全性が高いことが予想されており、本研究でもグレード3以上の事象が出現しないことが検証された。

治療効果に関して、ある程度の病勢コントロール率は得られたものの、多くがSDレベルに止まっていた。また、治療効果とCTL反応との関連性は明らかではなかった。これらの結果は本治療の開発における今後の課題であるが、抗原ペプチドの種類に関する検討や免疫賦活作用の高いアジュバントの併用などについて工夫することにより、抗腫瘍効果が発揮される可能性を示唆するものであると考えられた。

E. 結論

肝がん患者に対するAFPペプチドワクチンの臨床研究において、安全性が検証されるとともに、免疫賦活作用や病勢コントロール率が明らかとなり有効性を示すことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuda H, Ito Y, Suto H, Yamakawa A, Satomi S, Ohtani M, Yamazaki Y, Kusaka Y, Shimabukuro Y, Kikuchi K, Keida Y, Azuma T, Nakamoto Y: Clinical relevance and sequence analysis of the Helicobacter pylori dupA region from two areas in Japan with different gastric cancer risks. *Immuno-Gastroenterology* 2012; 1: 127-135.
- 2) Marukawa Y, Nakamoto Y, Kakinoki K, Tsuchiyama T, Iida N, Kagaya T, Sakai Y, Naito M, Mukaida N, Kaneko S: Membrane-bound form of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy in a model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2012; 19: 312-319.
- 3) Shugo H, Ooshio T, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Muraguchi T, Tamase A, Uema N, Yamashita T, Nakamoto Y, Suda T, Kaneko S, Hirao A: Nucleostemin in Injury-Induced Liver Regeneration. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 3044-3054.

- 4) Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, Honda M, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y: Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. *Hepatol. Res.* 2012; 42: 523-542.
- 5) Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takata M, Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Kimura H, Igarashi K, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H: TNF- α and Tumor Lysate Promote the Maturation of Dendritic Cells for Immunotherapy for Advanced Malignant Bone and Soft Tissue Tumors. *PLoS One.* 2012; 7: e52926.
- 6) Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Kondo TH, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S: Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2012 (in press).

2. 学会発表

- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: MicroRNA Dynamics in Precancerous Lesions in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. **第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 56 (4, Suppl.) 315A; 一般; oral: Nov. 13, 2012.
- 2) Naito T, Nemoto T, Matsuda H, Ohtani M, Suto H, Nakamoto Y: High Incidence of HBV Reactivation after R-CHOP and CHOP Regimens among Patients Treated with Six Immunosuppressive Chemotherapies. **第63回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts):** Hepatology 56 (4, Suppl.) 643A; 一般; poster: Nov. 11, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
分担研究報告書

持続性肝障害を基盤とした肝発癌機構

研究分担者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨：肝細胞癌の高リスク群である各種慢性肝疾患では、肝細胞アポトーシスが多数認められる。しかし肝細胞アポトーシスが肝発癌に関与するかは不明である。そこで今回 Bcl-xL もしくは Mcl-1 を欠損させ肝細胞アポトーシスを持続惹起させたマウスを用いて、肝細胞アポトーシスの持続が肝発癌に与える影響を検討した。いずれのマウスモデルでも、酸化ストレスの蓄積を伴って、1年で高率に肝腫瘍の形成を認めた。Mcl-1 欠損マウスで認められた肝細胞アポトーシスは、アポトーシス促進蛋白質である Bak や Bid をさらに欠損させることで著明に抑制された。この Mcl-1/Bak、Mcl-1/Bid ダブル欠損マウスでは、酸化ストレスの蓄積だけでなく、腫瘍形成率も有意に低下した。また Mcl-1 欠損マウスに抗酸化剤である N-アセチルシステインを持続飲水させると、肝細胞アポトーシスは抑制されなかったが、酸化ストレスは減少し、腫瘍形成率も有意に低下した。以上より、肝細胞アポトーシスの持続は酸化ストレスの蓄積を介して肝発癌を誘導することが解明された。

共同研究者

疋田 隼人 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

ウイルス性慢性肝炎のみならず、アルコール性肝障害、非アルコール性脂肪肝炎は肝細胞癌を高頻度に合併する。これらすべての肝疾患には共通して、持続的なアポトーシスによる肝障害が認められる。我々が2004年～2008年までにペグインターフェロン/リバビリン併用治療を行ったC型慢性肝炎2,600例のうちウイルスが排除されな

ったコホートからの解析では、治療終了後の血清ALT値の高値がその後の肝発癌に関連する独立因子であることが示されている。

しかし、肝細胞アポトーシスの指標であるALT値の高値がなぜ肝発癌のリスク因子であるかは未だ明らかでない。そこで今回 Bcl-xL もしくは Mcl-1 を欠損させ肝細胞アポトーシスを持続惹起させたマウスを用いて、肝細胞アポトーシスの持続が肝発癌に与える影響を検討した。

B. 研究方法

肝細胞特異的にアポトーシス抑制蛋白質である Bcl-xL 及び Mcl-1 をそれぞれ欠損させたマウス (*Alb-Cre bcl-x^{fllox/fllox}*, *Alb-Cre mcl-1^{fllox/fllox}*) を作成し、肝細胞アポトーシスと酸化ストレス、肝発癌率を検討した。

また、肝細胞特異的 Mcl-1 欠損マウスと、アポトーシス促進蛋白質である Bak 及び Bid をそれぞれ欠損させたマウス (*Bak^{-/-}*, *Bid^{-/-}*) を交配させることで、Mcl-1/Bak、Mcl-1/Bid ダブル欠損マウスを作成し、肝細胞アポトーシスと酸化ストレス、肝発癌率を検討した。

さらに酸化ストレスの肝発癌に対する関与を検討するために、肝細胞特異的 Mcl-1 欠損マウスに抗酸化剤である N-アセチルシステインを持続飲水させ、肝細胞アポトーシスと肝発癌率を検討した。

C. 研究成果

肝細胞特異的 Bcl-xL 欠損マウス、Mcl-1 欠損マウスは ALT の上昇を伴って持続的な肝細胞アポトーシスを認めた。そこで、長期にわたる持続的な肝細胞アポトーシスが酸化ストレス、肝発癌に与える影響を検討した。両欠損マウスとも、有意な 8-OHdG 陽性肝細胞の増加を認め、肝臓における酸化ストレスの蓄積を認めた。また肝細胞特異的 Bcl-xL 欠損マウスは1年で11匹中3匹 (27%)、1.5年で8匹中7匹 (88%) に肉眼的な肝腫瘍の形成を認め、肝細胞特異的 Mcl-1 KO マウスは1年で22匹中14匹(64%)、1.5年で16匹中すべて (100%) のマウスに肉眼的な肝腫瘍の形成を認めた。これらの肝腫瘍は脂肪滴を豊富に含み、組織学的には中～高分化肝細胞癌を呈しており、AFP の発現増強を認め、ヒトの肝細胞癌に類似し

ていた。

次に、持続的肝細胞アポトーシスの抑制が肝発癌の抑制に繋がるかを検討するため、Mcl-1 欠損マウスの肝細胞アポトーシスを Bak 及び Bid の更なる欠損で抑制できないかと考え、Mcl-1/Bak、Mcl-1/Bid ダブル欠損マウスを作成した。期待されたように、これらのマウスの肝臓では TUNEL 陽性細胞数は減少し、血清 ALT 値の上昇も抑制され Mcl-1 欠損マウスで認められた持続的な肝細胞アポトーシスは著明に抑制された。さらにこれらダブル欠損マウスでは 8-OHdG の増加も抑制されており、1年での腫瘍形成率も Mcl-1/Bak ダブル欠損マウスは 9 匹中 0 匹 (0%)、Mcl-1/Bid ダブル欠損マウスは 7 匹中 1 匹 (14%) と有意に抑制した。

最後に、Mcl-1 欠損マウスに抗酸化剤である N-アセチルシステインを離乳後より持続飲水させたところ、ALT 値や TUNEL 陽性細胞数に変化はなく、肝細胞アポトーシスに影響は与えなかった。しかし 8-OHdG の増加は抑制され、1年での腫瘍形成率も 26 匹中 9 匹 (35%) と有意に抑制した。

D. 考察と結論

今回、肝細胞アポトーシスが持続するだけで酸化ストレスが蓄積し、肝発癌を誘導することが証明された。肝細胞がアポトーシスを起こすことにより ALT 値の上昇が起こることを考えると、アポトーシスの抑制つまり、ALT 値の改善がウイルス性慢性肝疾患のみならず、あらゆる各種慢性肝疾患からの発癌抑制に有効である可能性が示された。

E. 研究発表

論文発表

1. Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. (2012) Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol**. 57: 92-100.
2. Kohga K, Tatsumi T, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Yamamoto M, Oze T, Aketa H, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Interleukin-1 β enhances the production of soluble MICA in human hepatocellular carcinoma. (2012) **Cancer Immunol Immunother**. 61: 1425-1432.
3. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. (2012) Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer**. 131: 548-557.

学会発表

- [1] Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo

Takehara. (2012) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌, 9月19-21日. (oral presentation)

- [2] 疋田隼人, 巽智秀, 竹原徹郎. (2012) 肝細胞障害が誘導する酸化ストレスと肝発癌. 第54回日本消化器病学会総会. 神戸, 10月10-12日. (oral presentation)
- [3] Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Satoshi Tanaka, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Minoru Shigekawa, Wei Li, Takuya Miyagi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2012) Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Boston, USA, November 8 - 12. (oral presentation)
- [4] Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Tsukasa Kawaguchi, Hinako Tsunematsu, Kumiko Nishio, Takatoshi Nawa, Minoru Shigekawa, Satoshi Shimizu, Wei Li, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Tomohide Tatsumi, Tatsuya Kanto, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. (2012) Bid and Bim are essential regulators involving the intrinsic pathway of apoptosis in hepatocytes in the absence of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. The 63rd

Annual Meeting of the American
Association for the study of Liver
Disease. Boston, USA, November 8 - 12.
(oral presentation)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

肝線維化進展 C 型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 併用療法の短期治療効果および
発癌抑制効果について

研究分担者 平松 直樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 講師

研究要旨：Peg-IFN α 2b/RBV 併用療法を施行した C 型肝炎 3541 例を対象とし、肝線維化進展例と考えられる A 群（血小板 10 万未満）における短期治療効果を、B 群（血小板 10-15 万）、C 群（血小板 15 万以上）と比較検討し、さらに A 群における累積発癌率を、Kaplan-Meier 法、Log-rank 検定を用いて検討した。

[成績] 治療中止率は、1H で A/B/C 群:19/16/11% ($p < 0.001$)、Non-1H で A/B/C 群:10/8/7% ($p = 0.43$)と 1H では血小板低値例で中止率が高率となった。治療完遂例における著効率は、1H で A/B/C 群:26/43/58% ($p < 0.001$)、Non-1H で A/B/C 群:68/76/85% ($p < 0.001$)と、特に 1H において血小板低値例での著効率は低率であったが、1H の A 群での著効率は、48 週投与の 18%に比し、72 週投与で 71%と有意に高率であった ($p = 0.004$)。一方、A 群における 5 年累積発癌率は、無効例の 30.6%に比し、再燃例で 13.6%、著効例で 7.9%と有意に発癌が低率であった。また、A 群での非著効例では、治療前の AFP 値が 5ng/ml 未満の症例からは、3 年間発癌を認めず、治療前の AFP 値が 5ng/ml 以上の症例では、治療終了後 24 週の AFP が低値になるにつれて、発癌が低率になる傾向を認めた。

[結論] 肝線維化進展症例に対する Peg-IFN/RBV 併用療法では、治療効果予測を十分に検討する必要があり、治療効果不十分と考えられる症例では、次世代治療も考慮に入れる必要があると考えられた。

A. 研究目的

肝発癌の高リスク群である C 型肝炎硬変においては発癌抑制が重要な課題である。今回、肝線維化進展 C 型肝炎における Peg-IFN/RBV 併用療法の短期治療効果と発癌抑制効果について検討した。

B. 研究方法

大阪大学ならびに関連施設において、2004 年 12 月から 2008 年 12 月に Peg-IFN/RBV 併用療法を施行された

Peg-IFN α 2b/RBV 併用療法を施行した C 型肝炎 3541 例を対象とした。治療前血小板数は、A 群:10 万未満:genotype1 型高ウイルス量症例 (1H) 247 例、genotype1 型高ウイルス量以外の症例(Non-1H) 77 例、B 群:10-15 万:1H 875 例、Non-1H 237 例、C 群:15 万以上:1H 1396 例、Non-1H 709 例であった。肝線維化進展例と考えられる A 群における短期治療効果を、B、C 群と比較検討し、さらに A 群における累積発癌率を、Kaplan-Meier 法、Log-rank 検定を用いて検討した。

C. 研究結果

治療中止率は、1HでA/B/C群:19/16/11% ($p < 0.001$)、Non-1HでA/B/C群:10/8/7% ($p = 0.43$)と1Hでは血小板低値例で中止率が高率となった。治療完遂例における著効率は、1H (response-guided therapy) でA/B/C群:26/43/58% ($p < 0.001$)、Non-1HでA/B/C群:68/76/85% ($p < 0.001$)と、特に1Hにおいて血小板低値例での著効率は低率であったが、1HのA群で治療開始13週以降24週までにHCV-RNA陰性化が得られた症例における著効率は、48週投与の18%に比し、72週投与で71%と有意に高率であった ($p = 0.004$)。一方、A群における3、5年累積発癌率は、無効例の13.3%、30.6%に比し、再燃例で2.0%、13.6%、著効例で3.6%、7.9%と有意に発癌が低率であった(無効 vs. 再燃, $p = 0.03$ 、無効 vs. 著効, $p = 0.01$)。また、A群での非著効例における発癌の検討では、治療前のAFP値が5ng/ml未満の症例からは、3年間発癌を認めなかった。一方、治療前のAFP値が5ng/ml以上の症例における、3、5年累積発癌率は、治療終了後24週時点のAFP値が、10ng/ml以上の症例で16.6%、30.3%に比し、5-10ng/mlの症例で3.3%、22.5%、5ng/ml未満の症例で0%、0%と治療終了後24週のAFPが低値になるにつれて、発癌が低率になる傾向を認めた(10ng/ml以上 vs. 5-10ng/ml, $p = 0.24$ 、10ng/ml以上 vs. 5ng/ml未満, $p = 0.09$)。

D. 考察

肝線維化進展症例に対するPeg-IFN/RBV併用療法では、Non-1Hは中止率が比較的lowで、著効率も高く、全体で約6割に著効を認めた。一方、1Hでは、中止率が高く、全体での著効率は約2割がlowであったが、

HCV-RNA陰性化例においては長期投与において著効率が向上した。また、肝線維化進展症例においても著効例や再燃例、あるいはAFP値が改善する症例では肝発癌が抑制された。したがって、肝線維化進展症例に対するPeg-IFN/RBV併用療法では、Non-1Hが良い適応であり、1Hでは同療法を施行した場合、Stopping ruleを十分に念頭におく必要があると考えられた。

E. 結論

肝線維化進展症例に対するPeg-IFN/RBV併用療法では、治療効果予測を十分に検討する必要があり、治療効果不十分と考えられる症例では、次世代治療も考慮に入れる必要があると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表:

- 1) Oze T, Hiramatsu N, Song C, Yakushijin T, Iio S, Doi Y, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Kato M, Miyazaki M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Hayashi N, Takehara T. Reducing Peg-IFN doses causes later virologic response or no response in HCV genotype 1 patients treated with Peg-IFN alfa-2b plus ribavirin. *J Gastroenterol.* 2012 Mar;47(3):334-42.
- 2) Harada N, Hiramatsu N, Oze T, Yamada R, Kurokawa M, Miyazaki M, Yakusijin T, Miyagi T, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Oshita M, Mita E, Hagiwara

H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Inoue A, Hayashi N, Takehara T. Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels categorized by Japanese treatment guidelines. J Gastroenterol. in press

2. 学会発表：

- 1) 平松直樹、竹原徹郎、林 紀夫. “C型慢性肝炎の新たな治療展開” シンポジウム「C型肝炎に対する第2世代 Protease 阻害剤 (TMC435)の治療効果と現時点での治療待機の妥当性について」第98回日本消化器病学会総会(東京) 2012
- 2) 平松直樹、竹原徹郎、林 紀夫. “C型肝炎に対する第2世代 Protease 阻害剤(TMC435, MK-7009)の治療効果と安全性について” シンポジウム「C型慢性肝炎の最新治療」第48回日本肝臓

学会総会(金沢) 2012

- 3) 平松直樹、林 紀夫、竹原徹郎. “新薬を踏まえたC型肝炎に対する Peg-IFN/RBV 併用療法 - 肝発癌抑制の見地から -” ワークショップ「C型慢性肝炎における臨床背景の違いと治療法選択の現状と展開」第48回日本肝臓学会総会(金沢) 2012
- 4) 平松直樹、竹原徹郎、林 紀夫. “C型肝炎に対する PegIFN/Ribavirin 併用療法における IL28B 遺伝子多型の意義” シンポジウム「C型肝炎治療の最前線」第16回日本肝臓学会大会、第54回日本消化器病学会大会(神戸) 2012

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

原発性肝癌における TIE2 陽性単球の意義

研究分担者 考藤 達哉 大阪大学大学院医学系研究科樹状細胞制御治療学寄附講座准教授

研究の要旨

肝癌は血流の豊富な腫瘍であり、その発生、進展、転移に血管新生が重要な役割を果たしている。TIE2 陽性単球 (TEM) は、種々の癌の血管新生に関わることが報告されている。本研究では、血液中や肝癌組織における TEM を同定し、肝癌患者における TEM と病態との関連性や肝癌による TEM の誘導機序を明らかにすることを目的とした。TEM は肝癌群において、末梢血中、肝癌組織中ともに肝硬変に比べて有意に増加していた。TEM 頻度は、肝癌における血管新生の程度 (micro-vessel) と正相関していた。ROC 解析では、TEM 頻度による肝硬変と肝癌の判別度は既存の腫瘍マーカーより良好であった。in vitro の検討では、M-CSF と IL-1 β 、TNF- α 刺激によって、CD16 陰性 TIE2 陰性単球から TEM が誘導された。以上の結果より、TEM は肝癌の発生、再発と密接に関連しており、血管新生を反映する Biomarker として有用であることが明らかになった。また、TEM 誘導機序の解明は、血管新生制御を目指す治療標的の同定に繋がる可能性がある。

A. 研究目的

肝癌は血流の豊富な腫瘍であり、その発生、進展、転移に血管新生が重要な役割を果たしている。肝癌における腫瘍血管の形成機序に関しては、流血中に存在する血管内皮細胞の前駆細胞が関与するという報告があるが、組織への遊走や浸潤機序、血管への分化過程の詳細は世界的にも明らかではない。また、種々の癌患者において、免疫抑制作用を持つ制御性 T 細胞や骨髄系抑制細胞が増加、活性化しており、癌の増大、転移や治療抵抗性に関与している可能性がある。本研究では、肝癌患者を対象として、血液中や癌組織における血管内皮細胞や免疫細胞の頻度、分布、機能解析を行い、血管新生の前駆細胞の同定やそれらの癌組織への遊走、浸潤の機序、肝癌組織での細胞分化や抗腫瘍免疫細胞の機能低下の機序、免疫抑制細胞の誘導の機序を解明することを目的とする。これによって、血管新生と免疫抑制の制御に基づく肝癌に対する新規治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

肝癌 (HCC) と診断された HCV 陽性患者を対象とした。また慢性肝疾患患者 (慢性肝炎、肝硬変)、健康成人を比較

対照とした。末梢血 PBMC 中、肝癌浸潤リンパ球中の TIE2 陽性単球 (TEM) の頻度を解析した。切除肝癌組織を用いて、TEM の癌組織での局在を検討した。また肝癌部、非癌部組織の血管新生を CD34 陽性細胞の染色で評価し (Microvessel density, MVD)、TEM との関連性を検討した。末梢血、肝癌組織から TIE2 陰性単球をソーティングし、種々の造血因子、サイトカインによる TEM 誘導の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪大学医学部倫理委員会、臨床試験部審査評価委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C. 研究結果

HCC 群において、末梢血中 TIE2 陽性単球 (TEM: CD14+CD16+TIE2+) は他群に比べて有意に増加していた。肝癌組織浸潤リンパ球中の TEM 頻度は、同一患者での末梢血と比べ有意に増加しており、TEM は血中から肝癌組織へ浸潤・集積する可能性が示唆された。また TEM は肝癌部の血管支持組織周囲に集積していた。血中、組織中の TEM 頻度と CD34 陽性

細胞頻度 (MVD) は有意に正相関しており、肝癌における血管新生に TEM が関与する可能性が示唆された。TEM 高頻度群では低頻度群に比べて、PT 値、Alb 値が有意に低く、肝予備能の低下と TEM は関連していた。また RFA や手術前の TEM 頻度が高い群では、有意に再発率が高かった。in vitro の検討では、M-CSF と IL-1 β 、TNF- α 刺激によって、CD16 陰性 TIE2 陰性単球から CD16+TIE2+単球 (TEM) が誘導された。

D. 考察

TEM は肝癌の発症や治療後再発に密接に関連しており、診断と予後を反映する Biomarker となり得る。肝癌患者における TEM の誘導機序として、肝癌由来の造血因子や癌に伴う炎症が関与する可能性が示唆された

E. 結論

TEM 誘導機序の解明は、血管新生制御を目指す新たな治療標的の同定に繋がる可能性がある。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Matsubara, T., Kanto, T., Kuroda, S., Yoshio, S., Higashitani, K., Kakita, N., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Kasahara, A., Tomimaru, Y., Tomokuni, A., Nagano, H., Hayashi, N. and Takehara, T.**, TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlated with angiogenesis. *Hepatology*. 2012 in press
- 2) **Kanto, T., Inoue, M., Oze, T., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Kakita, N., Matsubara, T., Higashitani, K., Hagiwara, H., Iio, S., Katayama, K., Mita, E., Kasahara, A., Hiramatsu, N., Takehara, T. and Hayashi, N.**, Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for

chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 169-178.

- 3) **Kakita, N., Kanto, T., Itose, I., Kuroda, S., Inoue, M., Matsubara, T., Higashitani, K., Miyazaki, M., Sakakibara, M., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N.**, Comparative analyses of regulatory T cell subsets in patients with hepatocellular carcinoma: a crucial role of CD25(-) FOXP3(-) T cells. *Int J Cancer*. 2012; 131: 2573-2583.

- 4) **Kohga, K., Tatsumi, T., Tsunematsu, H., Aono, S., Shimizu, S., Kodama, T., Hikita, H., Yamamoto, M., Oze, T., Aketa, H., Hosui, A., Miyagi, T., Ishida, H., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N. and Takehara, T.**, Interleukin-1beta enhances the production of soluble MICA in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2012; 61: 1425-1432.

- 5) **Hosui, A., Klover, P., Tatsumi, T., Uemura, A., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hennighausen, L., Hayashi, N. and Takehara, T.**, Suppression of signal transducers and activators of transcription 1 in hepatocellular carcinoma is associated with tumor progression. *Int J Cancer*. 2012; 131: 2774-2784

2. 学会発表

- 1) **Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Miyazaki M, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T.** TIE2-expressing monocytes are feasible angiogenesis-related cellular diagnostics for hepatocellular carcinoma: Involvement of inflammatory cytokines in the generation.
The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012

- 2) **Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Mizokami M, Hayashi N, Takehara T.** Human BDCA3+ dendritic cells in blood and in the liver are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012.
- 3) **Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Hiramatsu N, Mita E, Imai Y, Kasahara A, Okuno A, Takikawa O, Hayashi N, Takehara T.** Association of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the generation of regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. The Liver Meeting AASLD 63rd Annual Meeting and Postgraduate Course, Boston, MA, USA, 2012

H.知的財産権の出願・登録状況
特に予定なし

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshio S, (林)	Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus.	Hepatology			in press
Higashitani K, (林)	Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection.	J Gastroenterol			in press
Harada N, (林)	Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels categorized by Japanese treatment guidelines.	J Gastroenterol.			in press
Matsubara T, (林)	TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlated with angiogenesis.	Hepatology			inpress
Nawa T, (林)	Interferon- α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway.	Virology	432	452-459	2012
Kakita N, (林)	Comparative analyses of regulatory T cell subsets in patients with hepatocellular carcinoma: A crucial role of CD25(-) FOXP3(-) T cells.	Int J Cancer	131	2573-2583	2012
Hosui A, (林)	Suppression of signal transducers and activators of transcription 1 in hepatocellular carcinoma is associated with tumor progression.	Int J Cancer	131	2774-2784	2012

Kurokawa M, (林)	Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection.	J Gastroenterol	47	577-585	2012
Hikita H, (林)	Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: A causal link between apoptosis and carcinogenesis.	J Hepatol	57	92-100	2012
Kohga K, (林)	Interleukin-1 β enhances the production of soluble MICA in human hepatocellular carcinoma.	Cancer Immunol Immunother	61	1425-1432	2012
Oze T, (林)	Reducing Peg-IFN doses causes later virologic response or no response in HCV genotype 1 patients treated with Peg-IFN alfa-2b plus ribavirin.	J Gastroenterol	47	334-342	2012
Kanto T, (林)	Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients.	J Gastroenterol	47	169-178	2012
Shimizu S, (林)	Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma.	Int J Cancer	131	548-557	2012
Tsunematsu H, (林)	Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells.	Int J Cancer	130	356-364	2012
Ogawa E, (野村)	Efficacy of pegylated interferon alpha-2b and ribavirin treatment on the risk of hepatocellular carcinoma of patients with chronic hepatitis C: A prospective, multicenter study J	J Hepatol			in press