

201320020A

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

C型肝炎から発がんにいたる病態進展の 解明とその制御に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子周一

平成26(2014)年3月

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

C型肝炎から発がんにいたる病態進展の解明と
その制御に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成26（2014）年 3月

C型肝炎から発がんに至る病態進展の解明とその制御に関する研究

研究組織

<u>研究代表者</u>		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
<u>研究分担者</u>		
本多 政夫	金沢大学医薬保健研究域保健学系	教授
出澤 真理	東北大学大学院医学系研究科	教授
坂元 亨宇	慶應義塾大学医学部	教授
日野 啓輔	川崎医科大学肝胆膵内科学	教授
加藤 宣之	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	教授
堀田 博	神戸大学大学院医学系研究科	教授
杉山 和夫	慶應義塾大学医学部	特任准教授

目 次

I. 総括研究報告

C型肝炎から発がんにいたる病態進展の解明とその制御に関する研究

金子 周一	-----	1
-------	-------	---

II. 分担研究報告

1. 遺伝子改変マウスの作製と病態解析、制御法の開発

金子 周一	-----	7
-------	-------	---

2. 遺伝子改変マウスの作成と病態解析

本多 政夫	-----	12
-------	-------	----

3. 病態進展と幹細胞との関連解析

出澤 真理	-----	16
-------	-------	----

4. 病態進展の病理学的解析と制御法の開発

坂元 亨宇	-----	21
-------	-------	----

5. 卵巣摘出HCVトランスジェニックマウスの肝内酸化ストレス増強機構の解析

日野 啓輔	-----	24
-------	-------	----

6. HCVの長期複製により発現変動した宿主因子の細胞癌化に及ぼす影響

加藤 宣之	-----	27
-------	-------	----

7. HCV NS5Aと宿主因子の相互作用及び細胞癌化に及ぼす影響の解析	
堀田 博	----- 35
8. HCVの長期持続感染により生じた宿主遺伝子異常と 代謝異常の細胞癌化に及ぼす影響	
杉山 和夫	----- 42
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 49
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 55

I. 総括研究報告

C型肝炎から発がんに至る病態進展の解明とその制御に関する研究

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：本研究は慢性C型肝炎から肝細胞がんに至る病態を明らかにし、その進展を阻止する新たな治療法を開発し、実用化を目指す研究を行うことを目的としている。初年度の本年は、HCVの炎症・脂肪化・線維化・発がんの過程がみられるトランスジェニックマウスに、病態の進展に重要と考えられる遺伝子改変マウスを交配する動物実験モデルの作製を開始した。HCVマウスに肝線維化をきたすPDGF-Cトランスジェニックマウス（PDGF-Cマウス）を掛け合わせHCV/PDGF-Cマウスを作成した。掛け合わせによる発癌率の亢進と腫瘍サイズが増大がみられた。動脈硬化高脂肪食NASHマウスモデルを用いて、ペレチノインの脂肪化抑制及び肝発がん抑制効果について検討した。卵巣摘出（ovariectomy, OVX）を行ったHCVトランスジェニックマウスにおいて有意な肝障害の進展がみられた。新規の薬剤による発癌抑制の実験を開始した。これらのモデルの解析をさらに進める計画である。また、これまでに作製し研究をすすめてきたHCV感染培養細胞系を用いて宿主因子との関連を解析した。最新のゲノミクス技術に加え、幹細胞の解析を行なった。研究計画は順調に進捗している。

A. 研究目的

今後、数年のうちに登場するC型肝炎ウイルス（HCV）治療薬は安全性と有効性に優れており、治療によって高率にHCVを排除すると考えられる。しかし、我が国におけるHCV感染患者数は多く、これからも多数のHCV関連肝がんの発生が予想される。

本研究は慢性C型肝炎から肝細胞がんに至る病態を明らかにし、その進展を阻止する新たな治療法を開発し、実用化を目指す研究を行う。

B. 研究方法

本研究では、我々がこれまで解析してき

たHCVの炎症・脂肪化・線維化・発がんの過程がみられるトランスジェニックマウスに、病態の進展に重要と考えられる遺伝子改変マウスを交配し動物実験モデルを作製する。脂肪化・線維化・肝発がんに於けるサイトカイン・増殖因子の役割やインターフェロン応答と肝発がんの関わりなどを解析する。薬物投与による効果を検討する。同時に、これまでに作製し研究をすすめてきたHCV感染培養細胞系を用いて宿主因子との関連を解析するとともに、標的分子に対する薬剤のスクリーニングを行う。最新のゲノミクス技術に加え、幹細胞の解析を行い、感染から発がんがみられるヒト臨床

サンプルを用いて標的分子、および幹細胞の動態を解析し、実験モデルから得られた結果の検証を実施する。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウスを含む実験動物を用いた研究においては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針」に従った。倫理面、実験手技に関して申請し承認を得た。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当該大学の倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果および考察

研究者ごとに記載した。

・研究代表者 (金子周一)

HCV マウスに PDGF-C トランスジェニックマウス (PDGF-C マウス) を掛け合わせ HCV/PDGF-C マウスを作成した。10 週齢マウスでの解析では、腫瘍数、腫瘍径、肝重量共に HCV/PDGF-C マウスに於いて他マウスより有意に上昇していた。腫瘍発生率は HCV マウスでは 10 匹中、肝腫瘍を認めず、PDGF-C マウスでは 10 匹中、腺腫 6 結節、肝がん 0 結節、HCV/PDGF-C マウスでは 10 匹中、腺腫 33 結節、肝がん 10 結節と HCV/PDGF-C マウスに於いて有意に肝腫瘍発生の増加が認められた。興味深いことに、HCV/PDGF-C マウスでは細胞回転の亢進が著明であった。HCV マウスの初代肝細胞で

は TGF- β 1 による p21、p15 の発現誘導が有意に抑制され、TGF- β 1 作用による細胞周期停止・老化促進が回避されている可能性が示唆された。以上より HCV/PDGF-C マウスは、C 型肝炎からの肝発がん機序の解析に有用である他、従来の HCV マウスや PDGF-C マウスよりも短時間で発がんすることから、今後の肝発がん抑制の研究に有用と考えられた。

・分担研究者 (日野啓輔)

卵巣摘出 (ovariectomy, OVX) を行った HCV トランスジェニックマウス (TgM) を用いて、OVX ならびに HCV タンパクが酸化ストレスに及ぼす影響とその機序を検討した。コントロールマウス (C57BL/6) と TgM に Sham 手術あるいは OVX を行う 4 群を設定し比較検討した。57BL/6、TgM に関係なく OVX により血清レプチンの上昇とともに摂餌量が増加し、体重、肝重量が増加する一方、子宮重量は減少した。興味深いことに血清 ALT 値は TgM でのみ OVX で有意に上昇した。OVX により肝内活性酸素 (ROS) の産生は亢進するが、OVX-TgM は他の 3 群に比べて ROS 産生が顕著であった。C57BL/6 では OVX により抗酸化酵素 (SOD2, GPx1) の発現も亢進するが OVX-TgM では亢進せず、その機序として TgM では抗酸化酵素の発現調節の共役因子である PGC1 α の誘導が弱く、さらに PGC1 α を制御する AMPK α の活性化が抑制されていた。

・分担研究者 (本多政夫)

動脈硬化高脂肪食 NASH マウスモデルを用いて、ペレチノインの脂肪化抑制及び肝

発がん抑制効果について検討した。肝腫瘍発生率は68週齢までの解析で、34匹中、腺腫25匹、肝がん6匹、計25匹(73.5%)であった。ペレチノイン0.03%による腫瘍発生率は20匹中、腺腫5匹、肝がん1匹、計6匹(30%)であり、腫瘍発生が有意に抑制されていた。ペレチノインは容量依存性に肝線維化・脂肪化・炎症シグナルを有意に抑制した。ペレチノインはオートファジーを活性化させることで脂肪化を抑制した。また、ペレチノインは培養細胞でのHCVの複製及び感染を容量依存性に抑制した。以上よりペレチノインはC型慢性肝炎から肝がんの発生抑制に極めて有用であることが明らかとなった。

・分担研究者(坂元亨宇)

EVG染色を行った肝生検標本をデジタル化し、コラーゲンとエラスチンの定量的な解析を行った(武蔵野赤十字病院との共同研究)。各線維成分の組織占有率は、Fステージと相関することが示された。さらに、発癌の有無との比較解析を行い、エラスチンが発癌リスクの指標として有用である可能性が示唆された。また、 β -cateninの遺伝子変異は約40%と、C型肝炎を背景とする肝細胞癌で最も高率に見られるが、我々は、 β -cateninの遺伝子変異をもつ肝細胞癌でLGR5/GPR49遺伝子の発現が亢進していることや、これまでに、LGR5が癌細胞の生存能や肝細胞癌に特徴的な形態形成に関与していることを見出し、典型的な肝細胞癌の発生進展に関与している可能性を報告した。その機序をさらに詳細に解析するため、過剰発現系において発現の変

化する遺伝子を、マイクロアレイにて解析を行った。さらに、蛋白レベルでの解析を可能とするため、LGR5特異的なモノクローナル抗体の作成を開始した。

・分担研究者(出澤真理)

SCIDマウス(10-12週齢,雄)の腹腔内に四塩化炭素1.5ml/Kg投与し急性肝障害モデルを作成した。GFP-lentivirusで標識したヒト骨髄間葉系幹細胞をSSEA-3を用いてFACSでMuse細胞とMuse細胞以外の間葉系幹細胞(非Muse細胞)とに分け、四塩化炭素投与後2日の時点で尾静脈から投与した。移植30日後、肝臓内にヒトゴルジ体、およびGFP陽性のMuse細胞がHepparl, human albumin陽性の肝細胞マーカー陽性細胞として肝臓内に生着していた他、Cytokeratin-7陽性の胆管系細胞としても生着していることが確認された。一方非Muse細胞はそもそも、移植初期の1週以降から肝臓内にほとんど残存していなかった。このことからMuse細胞は血管に投与されたのち、傷害された肝組織を認識し、生着の後、胚葉を超えて中胚葉から内胚葉系の自発的分化を行い、肝組織を構成する細胞に分化すると考えられた。

・分担研究者(加藤宣之)

全長HCV-RNAの長期複製による細胞機能の変化を引き続き解析するとともに、同定した9種類の宿主遺伝子のうち顕著な発現抑制が観察された*BASPI*と*CPB2*遺伝子について解析し、以下に示す成果を得た。(1)全長HCV-RNA複製細胞を2年間継代培養すると、アポトーシス感受性になる傾向が認

められた (2) *BASP1*と*CPB2*遺伝子のプロモーターアッセイを行い、プロモーター活性に必要な領域の同定を行った。脱メチル化剤処理による発現変動解析やメチル化配列特異的PCR解析により両遺伝子の発現抑制にメチル化が関与していることが示唆された。

・分担研究者 (堀田 博)

タンデムタグ付加 NS5A 発現細胞の抽出液を用いてアフィニティークロマトグラフィー/質量分析法により新規 NS5A 結合宿主因子候補として同定された SMYD3 が、HCV 感染細胞や HCV レプリコン細胞内で実際に NS5A と結合していることを実証した。マッピング解析により、NS5A のドメイン 2 及び SMYD3 の N 末端 34 アミノ酸領域が、両者の結合に重要であることを明らかにした。NS5A が N 末端 34 アミノ酸領域に結合することによって SMYD3 のメチルトランスフェラーゼ活性にどのような影響を及ぼすかは HCV の病原性を考える上で興味深い。また、BCMP11 遺伝子の転写を NS5A が促進すること、及びその促進効果は SMYD3 との共発現によりさらに増強することが明らかになった。

・分担研究者 (杉山和夫)

メタボロームおよびマイクロアレイによる統合的包括的解析を行った。1年以上感染持続可能な HCV 持続感染培養細胞 (HPI 細胞) を樹立した。HPI 細胞では脂肪滴の著明な蓄積、コレステロールおよびデスモステロールの増加、脂肪酸の増加、ペントースリン酸経路促進による NADPH の増加、

TCA 回路の促進を伴うアミノ酸増加など全体的な代謝亢進状態が認められた。また、HPI 細胞では、糖・脂質代謝に重要な G6PD、MTHFD2、SCD、PCK2、ASNS、GPT2 など、転写因子 nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) の標的遺伝子群を恒常的に活性化させることで代謝亢進状態を維持するとともに、酸化ストレスを抑えることで HCV が持続感染しやすい状態にしていると考えられた。

D. 結論

HCV マウスに PDGF-C トランスジェニックマウス (PDGF-C マウス) を掛け合わせ HCV/PDGF-C マウスが作成され、掛け合わせによる発癌率の亢進、腫瘍サイズの増大がみられた。動脈硬化高脂肪食 NASH マウスモデルを用いて、ペレチノインの脂肪化抑制及び肝発がん抑制効果について検討した。他の掛け合わせマウスの作成を進めた。卵巣摘出 (ovariectomy, OVX) を行った HCV トランスジェニックマウスにおいて肝障害の進展がみられ、エストロゲンの作用が及ぼす発癌への機序の解析を開始した。これまでに作製し研究をすすめてきた HCV 感染培養細胞系を用いて宿主因子との関連を解析し、新規の分子に関する解析を行なった。また、最新のゲノミクス技術に加え、幹細胞の解析を行なった。本年度は研究計画の初年度であったが、計画は順調に進捗した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

各分担研究報告書を参照。

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

特許出願

1) 発明の名称: 免疫原性ポリペプチド表層

発現ビフィズス菌

発明者: 白川利朗、堀田博、片山高嶺

出願人: 国立大学法人神戸大学

出願日: 2013/02/19

出願番号: 特願2013-30477

2) 発明の名称: 抗C型肝炎ウイルス剤

発明者: 堀田博

出願人: 国立大学法人神戸大学

出願日: 2013/09/27

出願番号: 特願2013-200930

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

II. 分担研究報告

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

遺伝子改変マウスの作製と病態解析、制御法の開発

代表研究者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：本研究では、これまで解析してきたHCVトランスジェニックマウス（HCVマウス）に病態の進展に重要と考えられる遺伝子改変マウス（IL28B K/O、Lymphotoxin β K/O、PDGF-C Tg等）を交配する動物実験モデルを作製することによって、脂肪化・線維化・肝発がんと肝発がんの関わりを明らかにすることを目的とした。本年度はHCVマウスにPDGF-Cトランスジェニックマウス（PDGF-Cマウス）を掛け合わせHCV/PDGF-Cマウスを作成した。HCV/PDGF-Cマウスでは肝線維化の進行がより高度であり、早期に肝腫瘍の発生を認めた。興味深いことに、HCV/PDGF-Cマウスでは細胞回転の亢進が著名であった。HCVマウスの初代肝細胞ではTGF- β 1によるp21、p15の発現誘導が有意に抑制され、TGF- β 1作用による細胞周期停止・老化促進が回避されている可能性が示唆された。以上よりHCV/PDGF-Cマウスは、C型肝炎からの肝発がん機序の解析に有用である他、従来のHCVマウスやPDGF-Cマウスよりも短期間で発がんすることから、今後の肝発がん抑制の研究に有用と考えられた。

A. 研究目的

安全性と有効性に優れたC型肝炎ウイルス（HCV）治療薬の登場が近い。しかし、我が国におけるHCV感染患者数は多く、これからも多数のHCV関連肝がんの発生が予想される。本研究は慢性C型肝炎から肝細胞がん にいたる病態を明らかにし、その進展を阻止する新たな治療法を開発し、実用化を目指す研究を行う。

本研究では、これまで解析してきたHCVトランスジェニックマウスに病態の進展に重要と考えられる遺伝子改変マウス（IL28B K/O、Lymphotoxin β K/O、PDGF-C Tg等）を交配する動物実験モデルを作製することによって、脂肪化・線維化・肝発がん に於け

るサイトカイン・増殖因子の役割やインターフェロン応答と肝発がんの関わりなどを明らかにする。さらにこれら標的分子に対する治療法の開発と実用化を目指す。

B. 研究方法

これまでに報告したHCV全長トランスジェニックマウス（Gastroenterology, 2002 Feb;122(2):352-65）は、肝臓に脂肪化が見られ、約10%に肝がんを発症する。しかしながら、ヒトのC型慢性肝炎で認められる炎症・線維化を伴っていない。本年度は既報の線維化進展を示すPDGF-Cトランスジェニックマウスを掛け合わせ、早期に肝発がんするダブルトランスジェニックマウ

スの作成を試みた。

(倫理面への配慮)

遺伝子改変マウスを含む実験動物を用いた研究においては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針(平成18年6月1日制定)に従った。倫理面、実験手技に関して金沢大学動物実験施設に申請し承認を得た。

C. 研究結果

HCV 全長トランスジェニックマウス(HCV マウス)に PDGF-C トランスジェニックマウス(PDGF-C マウス)を掛け合わせダブルトランスジェニックマウス(HCV/PDGF-C マウス)を作成した。特異的プライマーを用いゲノタイピングを行い、Western blotting にて発現蛋白の確認を行った。HCV マウスではコア蛋白の発現、PDGF-C マウスでは PDGF-C の発現、HCV/PDGF-C マウスではコア蛋白及び PDGF-C の発現を確認した。10 週齢マウスでの解析では、腫瘍数、腫瘍径、肝重量共に HCV/PDGF-C マウスに於いて他マウスより有意に上昇していた。腫瘍発生率は HCV マウスでは 10 匹中、肝腫瘍を認めず、PDGF-C マウスでは 10 匹中、腺腫 6 結節、肝がん 0 結節、HCV/PDGF-C マウスでは 10 匹中、腺腫 33 結節、肝がん 10 結節と HCV/PDGF-C マウスに於いて有意に肝腫瘍発生の増加が認められた。

HCV/PDGF-C マウスに於ける腫瘍発生増加の機序を明らかにするため肝組織病理像を検討したところ、HCV/PDGF-C マウスでは PDGF-C マウス以上に肝線維化の亢進が

認められた。Affymetrix gene chip による肝組織遺伝子発現の解析では、HCV/PDGF-C マウスの背景肝で、Cyclin 遺伝子 Wnt シグナル、Hedgehog シグナル、Src 遺伝子、Aurora Kinase B の活性化が起こっており、がん化のシグナルが既に活性化されていたものと考えられた。

RTD-PCR による遺伝子発現の検討では、TGF- β 1、CTGF、Collagen1a、AFP、Cyclin D1、Cyclin B1 の発現が HCV/PDGF-C マウスの背景肝で他のマウスに比し有意に発現上昇していた。

TGF- β 1 の発現は p21 や p15 を誘導し、細胞回転の停止、老化を誘導する。HCV マウスと WT マウスから初代肝細胞を分離し、TGF- β 1 に対する反応性を評価したところ、HCV マウスから得られた肝細胞は WT マウスから得られた肝細胞に比し、TGF- β 1 で誘導される p21 や p15 の発現誘導が有意に抑制されていた。HCV 蛋白により TGF- β 1 に対する反応性の低下、細胞回転の亢進と老化回避の現象が起こっていることが示唆された。

HCV マウス、PDGF-C マウス、HCV/PDGF-C マウスの全生存率を検討すると、HCV/PDGF-C マウスで他群に比し有意に生存率の低下が認められた。

D. 考察

PDGF-C マウスはアルブミンプロモーター下に PDGF-C を過剰発現するトランスジェニックマウスであるが、PDGF 受容体は肝細胞で発現しておらず、したがって過剰に産生された PDGF-C は間質の星細胞や血管内皮に働き線維化・血管新生を惹起する。

このマウスに於ける肝発がん機構は不明な点も多いが、間質の線維化・血管新生に伴う増殖因子やサイトカイン産生及び酸化ストレスの亢進に伴う肝細胞の形質転換と考えられる。一方、HCV マウスは肝細胞で HCV 全長蛋白を発現させたトランスジェニックマウスであり、肝臓に脂肪化が見られ、約 10%に肝がんを発症する。しかしながら、ヒトの C 型慢性肝炎で認められる炎症・線維化を伴っていない。本年度は HCV/PDGF-C ダブルトランスジェニックマウスを作成し、間質に於ける線維化・血管新生と肝細胞に於ける HCV 蛋白の影響を併せ持つ肝発がんモデルマウスを作成した。興味深いことに HCV/PDGF-C マウスでは肝線維化の進行がより高度であり、早期に肝腫瘍の発生を認めた。これまでに HCV 蛋白による内因性 TGF- β 1 の発現誘導が報告されており、PDGF-C による線維化作用と相加的あるいは相乗的に線維化の進展が起こったものと考えられる。また興味深いことに、HCV/PDGF-C マウスでは細胞回転の亢進が著名であり、HCV マウスの初代肝細胞では TGF- β 1 による p21、p15 の発現誘導が有意に抑制されていた。HCV 蛋白により肝細胞における TGF- β 1 作用による細胞周期停止・老化促進が回避されている可能性が示唆された。

HCV/PDGF-C マウスは、C 型肝炎からの肝発がん機序の解析に有用である他、従来の HCV マウスや PDGF-C マウスよりも短期間で発がんすることから、今後の肝発がん抑制の研究に有用と考えられた。

E. 結論

- 1) 高率に肝発癌する HCV/PDGF-C トランスジェニックマウスを作成した。
- 2) 短期間の発癌抑制実験に有用と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M Honda, T Shirasaki, T Shimakami, A Sakai, R Horii, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, H Okada, K Murai, M Nakamura, E Mizukoshi, S Kaneko. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. Hepatology (in press)
- 2) T Terashima, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, M Kitahara, H Nakagawa, T Kagaya, E Mizukoshi, M Honda, S Kaneko. Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. Hepatol Res (in press)
- 3) H Takayama, H Misu, H Iwama, K Chikamoto, Y Saito, K Murao, A Teraguchi, F Lan, A Kikuchi, R Saito, N Tajima, T Shirasaki, S Matsugo, KI Miyamoto, S Kaneko, T Takamura. Metformin Suppresses Expression of the Selenoprotein P gene via an AMPK-FoxO3a Pathway in H4IIEC3 Hepatocytes. J Biol Chem 289(1):335-45, 2014
- 4) S Sha Zeng, T Yamashita, M Kondo, K Nio, T Hayashi, Y Hara, Y Nomura, M Yoshida, T Hayashi, N Oishi, H Ikeda, M Honda, S

- Kaneko. The Transcription Factor SALL4 Regulates Stemness of EpCAM-positive Hepatocellular Carcinoma. J Hepatol 60(1):127-34, 2014.
- 5) E Kobayashi, E Mizukoshi, H Kishi, T Ozawa, H Hamana, T Nagai, H Nakagawa, A Jin, S Kaneko, A Muraguchi. A new cloning and expression system yields and validates TCRs from blood lymphocytes of cancer patients within 10 days. Nature Medicine 19(11):1542-6, 2013.
- 6) M Higashimoto, Y Sakai, M Takamura, S Usui, A Nasti, K Yoshida, A Seki, T Komura, M Honda, T Wada, K Furuichi, T Ochiya, S Kaneko. Adipose tissue-derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. Eur J Immunol 43(11):2956-68, 2013.
- 7) H Takamura, S Nakanuma, H Hayashi, H Tajima, K Kakinoki, S Sakai, I Makino, H Nakagawara, T Miyashita, K Okamoto, K Nakamura, K Oyama, M Inokuchi, I Ninomiya, H Kitagawa, S Fushida, T Fujimura, I Ohnishi, M Kayahara, T Tani, K Arai, T Yamashita, T Yamashita, H Kitamura, H Ikeda, S Kaneko, Y Nakanuma, O Matsui, T Ohta. Evaluation of eligibility criteria in living donor liver transplantation for hepatocellular carcinoma by α -SMA-positive cancer-associated fibroblasts. Oncol Rep 30(4):1561-74, 2013.
- 8) A Seki, S Y akai, T Komura, A Nasti, K Yoshida, M Higashimoto, M Honda, S Usui, M Takamura, T Takamura, T Ochiya, K Furuichi, T Wada, S Kaneko. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology 58(3):1133-42, 2013.
- 9) F Arihara, E Mizukoshi, M Kitahara, Y Takata, K Arai, T Yamashita, Y Nakamoto, S Kaneko. Increase in CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis. Cancer Immunol Immunother 62(8):1421-30, 2013.
- 10) K Kimura, Y Nakamura, Y Inaba, M Matsumoto, Y Kido, SI Asahara, T Matsuda, H Watanabe, A Maeda, F Inagaki, C Mukai, K Takeda, S Akira, T Ota, H Nakabayashi, S Kaneko, M Kasuga, H Inoue. Histidine augments the suppression of hepatic glucose production by central insulin action. Diabetes 62(7):2266-77, 2013.
- 11) T Shirasaki, M Honda, T Shimakami, R Horii, T Yamashita, Y Sakai, A Sakai, H Okada, R Watanabe, S Murakami, M Yi, SM Lemon, S Kaneko. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. J Virol 87(9):5270-86, 2013.
- 12) M Honda, T Yamashita, T Yamashita, K Arai, Y Sakai, A Sakai, M Nakamura, E Mizukoshi, S Kaneko. Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. BMC Cancer 13:191, 2013.

- 13) T Ueda, M Honda, K Horimoto, S Aburatani, S Saito, T Yamashita, Y Sakai, M Nakamura, H Takatori, H Sunagozaka, S Kaneko. Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Genomics 101(4):238-48, 2013.
- 14) T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, M Baba, K Nio, Y Hara, SS Zeng, TH Kondo, H Takatori, T Yamashita, E Mizukoshi, H Ikeda, Y Zen, H Takamura, XW Wang, S Kaneko. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 57(4):1484-97, 2013.
- 15) E Mizukoshi, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, T Ueda, F Arihara, T Kagaya, T Yamashita, K Fushimi, S Kaneko. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. Hepatology 57(4):1448-57, 2013.
- 16) Y Hodo, M Honda, A Tanaka, Y Nomura, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, A Sakai, M Sasaki, Y Nakanuma, M Moriyama, S Kaneko. Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. Clin Cancer Re 19(7):1827-37, 2013.
- 17) T Otda, T Takamura, H Misu, T Ota, S Murata, H Hayashi, H Takayama, A Kikuchi, T Kanamori, KR Shima, F Lan, T Takeda, S Kurita, K Ishikura, Y Kita, K Iwayama, KI Kato, M Uno, Y Takeshita, M Yamamoto, K Tokuyama, S Iseki, K Tanaka, S Kaneko. Proteasome dysfunction mediates obesity-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. Diabetes 62(3):811-24, 2013.
- 18) T Oze, N Hiramatsu, E Mita, N Akuta, N Sakamoto, H Nagano, Y Itoh, S Kaneko, N Izumi, H Nomura, N Hayashi, T Takehara. A multicenter survey of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan. Hepato Res 43(1):35-43, 2013.
- 19) T Yamashita, S Kaneko. Treatment strategies for hepatocellular carcinoma in Japan. Hepato Res 43(1):44-50, 2013.
2. 学会発表
なし
- 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

遺伝子改変マウスの作成と病態解析

分担研究者：本多 政夫 金沢大学医薬保健研究域保健学系 教授

研究要旨：C型慢性肝は炎症・脂肪化・線維化を特徴とし肝がんを発症する。これまでに、非環式レチノイド（NIK-333, ペレチノイン）の肝発がん抑制機構として肝線維化抑制作用を有することを報告した（Cancer Research 2012）。本年度は動脈硬化高脂肪食 NASHマウスモデルを用いて、ペレチノインの脂肪化抑制及び肝発がん抑制効果について検討した。ペレチノインは容量依存性に肝線維化・脂肪化・炎症シグナルを抑制し、肝腫瘍発生を有意に抑制した。ペレチノインはオートファジーを活性化させることで脂肪化を抑制した。また、ペレチノインは培養細胞でのHCVの複製及び感染を容量依存性に抑制した。以上よりペレチノインはC型慢性肝炎から肝がんの発生抑制に極めて有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

我が国の肝がん死亡数は年間3.5 万人であり、その7 割以上が慢性C型肝炎に起因する。肝炎に対する治療法は確実に進歩しており、直接作用型抗ウイルス剤（DAA）の併用により、高いウイルス学的完全駆除（SVR）が見込まれる。しかし、我が国におけるHCV感染患者数は多く、これからも多数のHCV関連肝がんの発生が予想される。本研究は動物モデルを用いて慢性C型肝炎から肝がんに至る病態を明らかにし、その進展を阻止する新たな治療法を開発し、実用化を目指す研究を行う。

B. 研究方法

本年度は、動脈硬化高脂肪食 NASH マウスモデルを用いて、現在 HCV 関連肝がんの再発抑制を目的として臨床試験が行われて

いる非環式レチノイド（NIK-333, ペレチノイン）の脂肪化抑制及び肝発がん抑制効果について検討した。また、ペレチノインの抗 HCV 作用について検討した。

（倫理面への配慮）

遺伝子改変マウスを含む実験動物を用いた研究においては、「動物の愛護及び管理に関する法律」等に基づく「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針（平成 18 年 6 月 1 日制定）」に従った。倫理面、実験手技に関して金沢大学動物実験施設に申請し承認を得た。

C. 研究結果

動脈硬化高脂肪食 NASH マウスモデルでは脂肪化・炎症・線維化に加え、肝細胞の風船状腫大が見られ、ヒト NASH 病理像と類似した病理像が得られた。肝腫瘍発生率

は68週齢までの解析で、34匹中、腺腫25匹、肝がん6匹、計25匹(73.5%)であった。ペレチノイン0.01%及び0.03%の投与に於いてそれぞれ、20週齢、38週齢、60週齢の肝組織病理像及び遺伝子発現の解析を行った。線維化シグナル関連遺伝子であるPDGFB、PDGFC、TGF- β 、 α -SMA、Collagen1の発現は、いずれもペレチノインにより容量依存性に発現が抑制された。脂質関連遺伝子であるPPAR γ 、SCD1、FASNの発現も、いずれもペレチノインにより容量依存性に発現が抑制された。一方、ミトコンドリアにおける脂肪代謝関連因子CPT1a、UCP2、PPARGC1の発現は、いずれもペレチノインにより容量依存性に発現が上昇していた。また、炎症シグナル遺伝子IL1 β 、IL6、TNF- α 、CCL5、CCL2の発現は、いずれもペレチノインにより容量依存性に発現が抑制された。

ペレチノインが脂肪化を抑制する機構としてオートファジーの活性化に注目して解析を行ったところ、マウス肝に於いてペレチノイン投与により、オートファゴソームマーカーであるLC3B-IIの発現上昇を認めた。免疫染色に於いて、リソソームマーカーであるLAMP2と局在の一致が見られ、オートファジーの活性化が起こっていることが明らかとなった。

ペレチノイン0.03%による腫瘍発生率は20匹中、腺腫5匹、肝がん1匹、計6匹(30%)であり、腫瘍発生が有意に抑制されていた。

さらに、ペレチノインの抗HCV効果について検討を加えたところ、ペレチノインは容量依存性にHCVの細胞内複製及び感染性

を抑制した。

D. 考察

C型慢性肝は炎症・脂肪化・線維化を特徴とし肝がんを発症する。これまでに、ペレチノインの肝発がん抑制機構として肝線維化抑制作用を有することを報告した(Cancer Research 2012)。本年度の研究では、ペレチノインはオートファジーを活性化させることで脂肪化を抑制することが明らかとなった。また、脂肪化抑制作用と関連し、ペレチノインはHCVの複製及び感染を濃度依存的に抑制することを明らかにした。以上よりペレチノインはC型慢性肝炎から肝がんの発生抑制に極めて有用であることが明らかとなった。

E. 結論

- 1) ペレチノイン(NIK-333)はオートファジーを活性化させ、NASHマウスモデルの脂肪化を抑制し、肝発がんを抑制した。
- 2) ペレチノイン(NIK-333)は培養細胞でのHCVの複製・感染を抑制した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Zeng SS, Yamashita T, Kondo M, Nio K, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Yoshida M, Hayashi T, Oishi N, Ikeda H, **Honda M**, Kaneko S. The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. **J Hepatol.** 60(1):127-134. 2014.
- 2) Nishida N, Sawai H; Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF,

- Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, **Honda M**, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New susceptibility and resistance HLA-DPA1/DPB1 alleles to hepatitis B virus-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia', submitted to PLOS Genetics, on which you are listed as an author. **PLoS One**. 2014. in press.
- 3) Takeshita Y, Takamura T, **Honda M**, Kita Y, Zen Y, Kato KI, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. **Diabetologia**. 2014. in press.
- 4) **Honda M**, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. **Hepatology**. 2013. in press.
- 5) Terashima T, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Kitahara M, Nakagawa H, Kagaya T, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. **Hepatol Res**. 2013. in press.
- 6) Spaniel C, **Honda M**, Selitsky SR, Yamane D, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM. MicroRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. **PLoS One**. 2013. in press.
- 7) **Honda M**, Yamashita T, Yamashita T, Arai K, Sakai Y, Sakai A, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. **BMC Cancer**. 13:191, 2013.
- 8) Miyahara K, Nouse K, Morimoto Y, Takeuchi Y, Hagihara H, Kuwaki K, Onishi H, Ikeda F, Miyake Y, Nakamura S, Shiraha H, Takaki A, **Honda M**, Kaneko S, Sato T, Sato S, Obi S, Iwadou S, Kobayashi Y, Takaguchi K, Kariyama K, Takuma Y, Takabatake H, Yamamoto K; Okayama Liver Cancer Group. Pro-angiogenic cytokines for prediction of outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma. **Br J Cancer**. 109(8):2072-2078. 2013.
- 9) Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, **Honda M**, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived