

が求められる。

一方次世代シーケンサーION-PGM シーケンサーを用いた基礎検討では、HCV 全長に対するカバー率が現状ではまだ低く、さらなる基礎検討を重ねて安定的なシーケンシングを行なう技術の確立が必要であると考えられた。

E. 結論

山形コホート研究の検体を用いた追跡調査では、HCV 感染が肝発癌のリスクになることが推定されたが、イベント数がまだ少ないためより大きいコホートでの検討が必要である。一方次世代シーケンサーION-PGM を用いた基礎検討はまだ安定しておらず、さらなる技術的方法の確立が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

12. 論文発表

- 1) 渡辺 久剛, 佐藤 智佳子, 奥本 和夫, 西瀬 雄子, 斎藤 貴史, 河田 純男, 上野 義之. 【B型肝炎の概念の変遷とその臨床的意義】 B型肝炎ウイルスジェノタイプ B 高感染地域における感染実態の変遷と核酸アナログ治療例におけるジェノタイプの臨床的意義. 消化器内科. 2014; 58(2): 213-9.
- 2) Shakado S., Sakisaka S., Okanou T., Chayama K., Izumi N., Toyoda J., Tanaka E., Ido A., Takehara T., Yoshioka K., Hiasa Y., Nomura H., Seike M., Ueno Y., Kumada H. Interleukin 28B polymorphism predicts interferon plus ribavirin treatment outcome in patients with hepatitis C virus-related liver cirrhosis: A multicenter retrospective study in Japan. Hepatology Research 2014; 44(9):983-92.
- 3) Omata M., Nishiguchi S., Ueno Y.,

Mochizuki H., Izumi N., Ikeda F., Toyoda H., Yokosuka O., Nirei K., Genda T., Umemura T., Takehara T., Sakamoto N., Nishigaki Y., Nakane K., Toda N., Ide T., Yanase M., Hino K., Gao B., Garrison K. L., Dvory-Sobol H., Ishizaki A., Omote M., Brainard D., Knox S., Symonds W. T., McHutchison J. G., Yatsuhashi H., Mizokami M. Sofosbuvir plus ribavirin in Japanese patients with chronic genotype 2 HCV infection: an open-label, phase 3 trial. Journal of Viral Hepatitis. 2014; 21(11):762-8.

4) Ninomiya M., Ueno Y., Shimosegawa T. Application of deep sequence technology in hepatology. Hepatology Research 2014; 44(2):141-8.

学会発表

17. Watanabe H., et al and Ueno Y. Genetic polymorphism in interferon-lambda 4 gene and treatment response to peginterferon and ribavirin in Japanese chronic hepatitis C. 米国肝臓病学会年次集会 ポストン 2014年
18. 三浦 雅人, 上野 義之, 下瀬川 徹. HBe 抗体陽性無症候性キャリアの自然経過に関する検討. 日本肝臓学会第50回総会 東京、2014年
19. 渡辺 久剛, 佐藤 智佳子, 上野 義之. HBV 遺伝子型からみた自然経過観察例および核酸アナログ治療例の HBs 抗原陰性化と肝発癌予後. 日本肝臓学会第50回総会 東京、2014年
20. 渡辺 久剛, 斎藤 貴史, 上野 義之. 肝疾患診療における医療連携の在り方 本県における肝炎対策の現状と課題をふまえた「やまがた肝炎ネットワーク」の構築と肝疾患診療連携体制. 日本肝臓学会第50回総会 東京、2014年

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成26年度）

C型肝炎治療時の脂質代謝制御に関する研究

研究分担者 国立病院機構九州医療センター 消化器内科 科長 中牟田誠
研究協力者 国立病院機構九州医療センター 消化器内科 医長 国府島庸之
医師 吉本剛志
医師 樋口野日斗
医長 福泉公仁隆

研究要旨

Telaprevirはコレステロール・脂肪酸代謝に影響を与え、Peg-IFN + RBV + TVR治療中のTC, HDL-C値に変化が生じる。この変化は、肝細胞でのウイルスの増殖や再感染の抑制をもたらすと考えられ、この反応性の違いが治療効果に大きく影響する。一方、Daclatasvir + Asnaprevir治療時にはそのような変化を認めず、脂質代謝を制御することで治療効果の増強が期待される。

A. 研究目的

C型肝炎感染肝では脂質代謝異常を来しており、この変化はC型肝炎ウイルスの増殖に深く関連している。NS3/4A阻害剤であるTelaprevir (TVR)は2011年に認可となり、C型慢性肝炎に対してPeg-IFN + ribavirin (RBV) + TVR併用療法が行われている。また、2014年9月にはHCV NS5A阻害剤であるDaclatasvir (DCV)とNS3阻害剤であるAsnaprevir (ASV)が認可となり、現在IFN free治療であるDCV + ASV併用療法が行われている。我々は、Peg-IFN + RBV治療時にpitavastatin + EPAのadd on治療が著効率を増加することを報告しており、Peg-IFN + RBV + TVR治療時やDCV + ASV併用療法時にもadd on治療を行っている。今回C型肝炎治療時のコレステロール代謝の変化と脂質代謝制御の治療への効果について検討を行った。

B. 研究方法

当院においてHCV Genotype 1b 高ウイルス群119例に対しPeg-IFN + RBV + TVR治療を行い、現在HCV Genotype 1b 102例に対しDCV + ASV併用療法を行っている。治療中のコレステロール値の変化と治療効果について解析を行った。肝細胞へのTVRの影響はHepG2細胞を用い、定量的RT-PCR法を用いて各種遺伝子発現を測定した。

(倫理面への配慮)

遺伝子多型解析においては、患者の同意の下に行い、個人情報処理するコンピュータについては、他の一切のコンピュータと切り離すなどの措置を講じるとともに、個人情報を含むその他の資料は、鍵のかかる保管庫に保管するなど個人情報の保護に細心の注意を払った。

C. 研究結果

Peg-IFN + RBV + TVR治療時には、治療早期より血中総コレステロール (TC) と LDLコレステロール (LDL-C) 値が有意に上昇し、TC, LDL-CともTVR投与終了後改善した。治療効果との関連について検討したところ、治療前のTC値は著効群で有意に高値であった。また、著効群ではTVR治療経過中のTC値が高く、治療開始前からのTCの変化量も大きい傾向にあった。Peg-IFN + RBV + TVR治療時のadd on治療の効果について検討したが、add on治療の有無で著効率に差を認めなかった。HepG2細胞にTVRを付加したところ、HCVの細胞への侵入に関与するLDL-receptorの発現やコレステロール合成に関与するHMG-CoA還元酵素の発現が有意に低下した。また脂肪酸合成酵素の発現低下も認められた。一方、DCV + ASV併用療法時にはTC, LDL-C値に変化を認めなかった。Add on治療群では通常治療群と比較して治療1週、2週、4週時点でのHCV-RNA量が低く、RVR率も有意に高かった。また、多変量解析においてadd on治療はRVRに関与する独立して有意な因子であった。

D. 考察

Peg-IFN + RBV + TVR三剤療法中、TVRの効果によりコレステロール代謝は大きな影響を受けていた。TVRはHCVのprotease活性を阻害し抗ウイルス効果を持つのみならず、コレステロール合成や脂肪酸合成を阻害することでウイルスが増殖しにくい環境を形成し、更にLDL-receptorの発現を制御することでウイルスの再感染を阻害することで、抗ウイルス効果を増強している可能性が考えられ

る。この作用はadd on治療時の肝組織における脂質代謝変化と同一であり、このことがPeg-IFN + RBV + TVR治療時のadd on治療効果が制限された原因と想定される。一方DCV + ASV治療時にはadd on療法の有効性が示唆され、これはASVがTVRのような脂質代謝に対する影響を持たないためと考えられる。

E. 結論

脂質代謝の制御は直接作用型抗ウイルス剤使用時に治療効果に影響する重要な因子と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

EASL 2014

DDW 2014

第50回 日本肝臓学会総会

第18回 日本肝臓学会大会

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

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究者報告書（平成 26 年度）

酸化ストレスによる肝発癌に関わるゲノム情報の解析

研究分担者 宮西 浩嗣 札幌医科大学医学部腫瘍・血液内科 講師

研究要旨: C型慢性肝炎では持続慢性炎症によって惹起される発癌の機序は明らかとなっていないが、発癌過程において細胞内で生じた活性酸素（ROS）による酸化的 DNA 傷害が関与する可能性が想定されている。また C 型肝炎の増悪因子として肝細胞に蓄積した鉄の関与が注目され、鉄イオンが Fenton 反応等を介してヒドロキシルラジカル等の ROS の産生を促進し、酸化的 DNA 傷害を増強することが知られている。本研究では C 型肝炎を背景とした HCC 患者における酸化的 DNA 傷害の修復系遺伝子群の関与を検討することを目的とした。検討の結果、C 型肝炎患者において MUTYH 遺伝子の一つの SNP における minor allele 保有が発癌危険因子となる可能性が示唆され、その機序は minor allele 配列による MUTYH 転写抑制であり、minor allele 保有者で MUTYH 発現が低下していることが示された。

与について検討することを目的とした。

A. 研究目的

持続慢性炎症によって惹起される発癌過程には、細胞内で生じた活性酸素(ROS)による酸化的 DNA 傷害が関与する可能性が想定されている。C 型肝炎の炎症増悪因子として肝細胞に蓄積した鉄の関与が注目されている。鉄イオンは Fenton 反応を介して ROS を生成し酸化的 DNA 傷害を引き起こす。これまでに我々は、C 型肝炎および HCC の肝組織中に鉄が過剰に沈着しており、酸化的 DNA 傷害のマーカである 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)が蓄積していることを報告してきた。8-OHdG は C のかわりに A、T とともペアリングし DNA 変異を惹起することから、肝発癌への関与が推測される。本研究では C 型肝炎からの発癌への酸化的 DNA 傷害修復系遺伝子群の関

B. 研究方法

C型肝炎患者の末梢血リンパ球から高分子DNAを抽出し、酸化的DNA損傷修復酵素であるMUTYH遺伝子の全SNPs解析を次世代シーケンサーION PGMにより行い、Taqman genotyping assayにより確認した。また危険因子として抽出したSNPのmajor/minor配列とMUTYHプロモーター配列を挿入したLuc発現ベクターを作製し肝癌細胞株を用いて転写活性を測定した。

（倫理面への配慮）

研究に先立って倫理委員会および IRB 委員会の審査・承認を受け、さらに検体採取に際しては患者に対して十分なインフォームドコンセントを書面で得た。

C. 研究結果

(1) C型慢性肝炎からの肝発癌に関わる酸化 DNA 傷害修復遺伝子の個体差検討するため次世代シーケンサーで解析したところ、MUTYH 遺伝子の SNP は 3 種類同定され、そのうちの 하나가発癌危険因子の候補となった。Taqman genotyping assay で同 SNP の分布を確認したところ、他 SNP が他の因子と独立した肝発癌危険因子であることが明らかとなった。

(2) Luc assay により同 SNP の minor allele 配列の挿入が MUTYH の転写を抑制することが示された。

D. 考察

C型慢性肝炎 32 例について MUTYH 遺伝子全配列を検索し、肝発癌との関連を検討したところ一種類の SNP の minor allele 保有者が有意に肝発癌に多く見られ、肝発癌の独立危険因子であることが確認できた。

E. 結論

C型慢性肝炎からの発癌に酸化 DNA 傷害修復酵素の SNP が関与していることが示された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. 宮西浩嗣、田中信悟、加藤淳二. 鉄過剰を伴う慢性肝障害からの肝発癌における酸

化的 DNA 傷害修復能の関与. 第 50 回日本肝臓学会総会 (ワークショップ 9)

2. 宮西浩嗣、河野豊、加藤淳二. 酸化 DNA 傷害修復酵素 MUTYH の genotype による肝発癌危険群の囲い込み. JDDW2014 (シンポジウム 7)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

厚生労働省研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
次世代シーケンシング・ゲノムワイド関連解析を用いた C 型肝炎治療に伴う肝病態
進展軽快、肝発癌に関わる宿主因子の解析（坂本班）
分担研究者報告書（平成 26 年度）

NASH 発癌症例における肝組織糖・脂質代謝変化および肝脂肪化による鉄代謝関連遺伝子発現変化に関する NGS を用いたトランスクリプトーム研究
研究分担者 高後 裕
旭川医科大学内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 教授

研究要旨

C 型肝炎は高頻度に steatosis を合併する。NAFL のモデルである高脂肪食負荷マウスでトランスクリプトーム解析を行ったところ、脂肪負荷群では余剰の脂肪酸からリン脂質合成が促進されてシグナルに影響を与える可能性が示唆された。このことから NASH は様々な増殖刺激から細胞内シグナルが活性化しやすい組織環境が形成されていると考えられる。また、同モデルにおける鉄代謝異常の原因遺伝子を探索したところ、BMP-SMAD シグナル抑制によるヘプシジン発現低下があり、ヘプシジン発現低下に、非実質細胞から産生される BMPER が関与することを明らかとなった。

研究協力者

大竹孝明 旭川医科大学臨床消化器・肝臓学診療連携講座 特任教授
澤田康司 旭川医科大学消化器・血液腫瘍制御内科 特任准教授
佐々木勝則 旭川医科大学消化管再生修復医学講座 特任教授
田中宏樹 旭川医科大学臨床消化器・肝臓学診療連携講座 特任助教

fatty liver disease; NAFLD) は、飲酒習慣なしに肥満やメタボリックシンドロームの合併によって肝内脂肪沈着を来し、一部が肝硬変や肝癌に進展する慢性肝疾患である。NAFLD は種々の肝内酸化ストレスが肝硬変、肝癌への進展に関与することが知られている。本研究では、NAFLD モデルマウスの肝臓を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、特に肝組織糖・脂質代謝変化に関係する遺伝子の変化を解析した。

《NASH 発癌症例における肝組織糖・脂質代謝変化に関するトランスクリプトーム解析》

A. 研究目的

C 型肝炎に対する抗ウイルス治療の奏効率が向上し、今後、患者の予後規定において宿主因子の比重がさらに強くなっていくと考えられる。非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic

B. 研究方法

NAFL モデルマウスの作成

8 週齢雄性 C57BL/6 マウスに通常飼料、または高脂肪食(F2HFD2、オリエンタル酵母、脂肪化カロリー比 82%)を 16 週間投与し屠殺し、血液および肝臓を採取し、以後の解析に用いた。

NASH-HCC 検体の解析

正常肝組織 2 例、NASH 発癌例 3 例で検討した。

網羅的遺伝子発現解析

通常食群 (n=3) と高脂肪食群

(n=3) のマウス肝組織より RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成し高出力シーケンサー Ion Proton (Life Technologies) を用いて全 mRNA シーケンス解析を行った。データ解析は CLC Genomics Workbench を用いて個々の遺伝子発現量として RPKM 値

(Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads) を算出し、RPKM 値の比の絶対値が 1.5 倍以上で Student t 検定により得られた P 値が 0.05 未満を遺伝子を発現変動遺伝子として抽出した。同様に正常肝組織と NASH 背景肝、NASH 背景肝と肝癌部の比較検討を行った。

パスウェイ解析

トランスクリプトーム解析結果を解析ソフト MetaCore™ (Thomson Reuters) に入力しパスウェイ解析を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験を行うに当たって、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律 (平成 17 年法律第 68 号)」、および「旭川医科大学における動物実験等に関する取扱細則(平成 19 年 12 月 20 日)」を踏まえ、研究計画が動物実験委員会の承認を得たうえで行った。

臨床サンプルを用いた検討においては「臨床研究における倫理指針」(厚生労働省:平成 20 年 7 月 31 日改正)を遵守し、それに基づき実験を計画することを本学臨床研究倫理委員会の承認を受け、十分

なインフォームドコンセントのもと患者の自由意思での同意を得て行っている。個人情報の漏洩防止に関して、匿名化によりプライバシーの保護に万全を期した。

C. 研究結果

NAFL モデルマウスの作成

NAFL のモデルの高脂肪食負荷マウスでトランスクリプトーム解析を行いました。通常食群に比べて高脂肪食群では有意な体重増加、肝重量の増加、血漿 ALT 値の増加を認め、高脂肪食群では肝組織に Zone 3 優位の著明な脂肪沈着を認めたが、明らかな炎症細胞浸潤は認めず、NASH ではなく、NAFL モデルであることが確認された (図 1)。

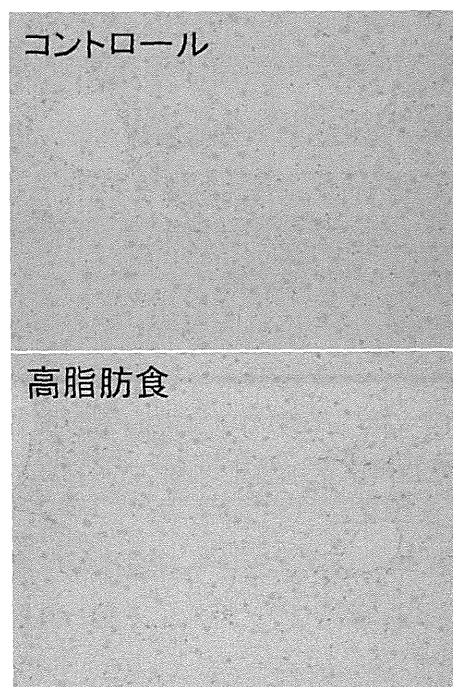


図 1 : NAFL モデルマウス肝組織像
NAFL モデルの網羅的遺伝子発現解析

網羅的に遺伝子発現を解析した 38,114 の遺伝子のうち、有意な発現変動が認められた遺伝子数は 2,314 種類であった。こ

のうち、糖代謝、脂質代謝関連酵素の遺伝子で発現変動があったものは、解糖系では発現亢進：HK, GCK, PFK, PK, PDH、発現低下：ALDO、クエン酸回路系では発現亢進：SUCL, FH、脂肪酸β酸化では発現亢進：ACADM, HADH, ACAA、コレステロール合成系では発現亢進：ACAT2, HMGCS、発現低下：HMGCR, IDI1, SQLE、蛋白質プレニル化では発現亢進：FNTB であった（図2）

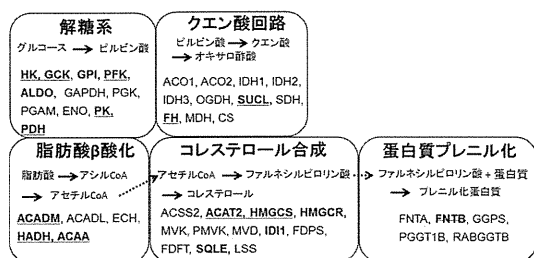


図2：高脂肪食負荷モデル（16週間）で発現亢進した糖・脂質関連酵素遺伝子（下線）

NASH 発癌例の網羅的遺伝子発現解析

正常肝の2例はそれぞれ肝転移巣切除部の背景組織で、NASH 肝組織3例とは対応がない。網羅的に遺伝子発現を解析した遺伝子のうち、有意な発現変動が認められた遺伝子数は2,189種類であった。

一方、NASH 背景肝と HCC 部はそれぞれ同一患者から採取されたもので対応のある比較となっている。294 遺伝子の発現変動がみられた。このうち、正常肝と NASH 背景肝の比較で、糖代謝、脂質代謝関連酵素の遺伝子で発現変動があったものは、解糖系では ALDO が発現亢進し、クエン酸回路系では SUCL, SDH が発現亢進、脂肪酸β酸化では ACADM が発現亢進、コレステロール合成系では変化なく、白質プレニル化では RABGGTB が発現亢進していた（図3）。

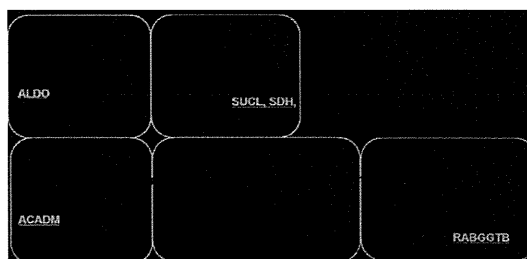


図3：NASH 背景肝で発現亢進した糖・脂質関連酵素遺伝子（下線）

次に高脂肪食負荷マウスおよびヒト NASH 肝組織において、リン脂質合成酵素群と蛋白質リン酸化経路に関して発現変動した酵素に注目した。両方で発現亢進していた酵素遺伝子として FASN, ACOT, IMPA1, GPAT, PLC, PI3K があつた。また、ACSM, GPD, GPAM はマウスモデルだけで発現亢進し、ACSBG, ISYNA1, PTEN はヒト NASH だけで発現亢進していた（図4）。

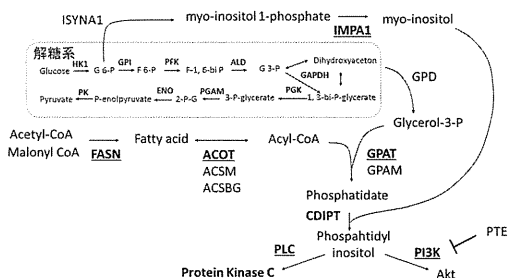


図4：NAFL マウス、ヒト NASH 両方で発現亢進しているリン脂質合成酵素群と蛋白質リン酸化経路酵素（下線）

パスウェイ解析

NASH 背景肝と癌部では糖・脂質・リン脂質代謝系関連酵素の転写レベルの変化はなかった。そこで、本研究のトランスクリプトーム解析結果をパスウェイ解析で NASH 背景肝と癌部を比較した。NASH 背景肝に比較し、癌部では PDGFR とその下流の adapter 分子、転写因子の一部が転写レベルで亢進していた（表1、

図 5)。

Gene	Fold Change (HCC/NASH)	NASH			HCC		
		No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
PDGFR	1.84	0.41	0.61	0.81	1.12	1.13	1.11
MAPK1/3	1.58	0.33	0.36	0.33	0.61	0.52	0.54
MEF2	1.54	0.07	0.05	0.08	0.1	0.09	0.12
CaMKK	1.64	0.04	0.05	0.04	0.06	0.08	0.08
PLC-beta	2.42	0.01	0.006	0.009	0.02	0.03	0.02
IP3 R	1.84	0.08	0.08	0.11	0.12	0.14	0.17

表 1 : PDGFR シグナル関連遺伝子

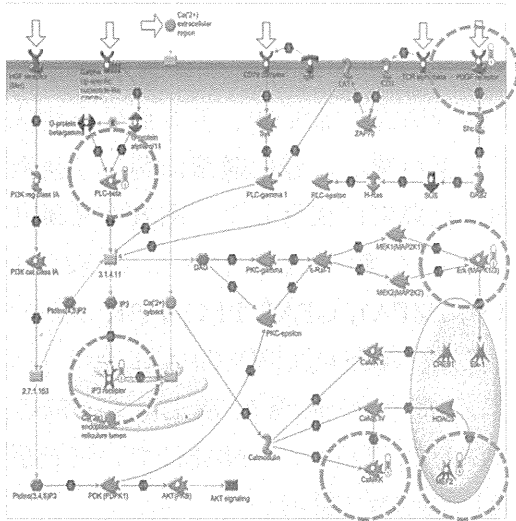


図 5 : PDGFR とその下流の adaptor 分子、転写因子が転写レベルで発現亢進

D. 考察

NAFL モデルマウスの肝脂肪化において鉄過剰モデル程ではないがコレステロール合成系・蛋白プレニル化関連酵素の発現亢進が誘導され Ras シグナルの活性化が推察された。また過剰の脂肪酸の存在下でリン脂質合成系関連酵素の発現亢進があり、PKC, Akt シグナルの活性化が示唆された。また、NASH の発癌部においては PKGF シグナルの活性化が示唆された。このように NAFL/NASH では様々な増殖刺激から細胞内シグナルが活性化しやすい組織環境が形成されている可能性が示唆された。

E. 結論

1. 高脂肪食負荷 NAFL モデルでは、余剰の脂肪酸からリン脂質合成が誘導されてシグナルに影響を与えている可能性が示唆された。
2. NASH では様々な増殖刺激から細胞内シグナルが活性化しやすい組織環境が形成されていた。

《肝脂肪化による鉄代謝関連遺伝子発現変化に関する NGS を用いたトランスクリプトーム研究》

A. 研究目的

NAFLD は種々の肝内酸化ストレスが作用し病態が進展する。その中の一つに肝内鉄過剰による酸化ストレスが肝硬変、肝癌への進展に関与することが知られている。肝細胞で産生される鉄代謝制御分子ヘプシジンは、鉄トランスporter-Ferroportin 1 の発現を調節して鉄代謝の恒常性を保つ役割を持つ (図 6)。遺伝性ヘモクロマトーシスはヘプシジン発現調節に関与する HFE、

トランスフェリン受容体 2、ヘモジュベリン、またはヘプシジン自身の遺伝子異常によってヘプシジンの発現低下が起き、全身性鉄過剰となる。ヘプシジンの発現調節は、鉄過剰状態によって Bone Morphogenetic Protein (BMP)-SMAD シグナル経路またはトランスフェリン受容体経路が活性化し、炎症状態によってインターロイキン(IL)-6-STAT3 シグナル経路が活性化してヘプシジン発現が誘導される。

これまでアルコール性肝障害や C 型慢性肝炎においては、ヘプシジン発現低下が合併する 2 次性鉄過剰症の原因と指摘されてきた。しかし、NAFLD に

における鉄過剰の機序については一定の見解がない。本研究では、NAFLD モデルマウスの肝臓を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、NAFLD における鉄代謝異常に関係する重要な遺伝子を探索することを目的とした。

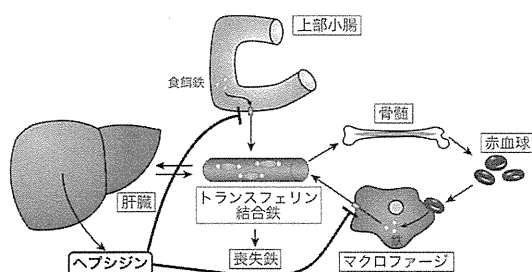


図 6：鉄代謝調節における肝臓の役割

B. 研究方法

NAFL モデルマウスの作成

前解析と同様に NAFL モデルを作成し、以後の解析に用いた。

血漿成分の解析

血漿内の ALT と血漿鉄を日立自動分析装置で、マウス血漿フェリチンを mouse ferritin ELISA で、血漿内活性型ヘプシジン濃度を LC/ESI-MS/MS で測定した。

原子吸光分析法による肝鉄貯蔵量の測定

肝組織をクロロホルムで脱脂し、乾燥後、濃硝酸で加熱溶解した。原子吸光光度計で鉄の原子化吸光度を測定し、標準曲線から鉄量 (mg Fe/g dry liver) を解析した。

網羅的遺伝子発現解析

前解析と同様に常食群 (n=3) と高脂肪食群 (n=3) のマウス肝組織を用いて解析した。

RT-qPCR

サンプル RNA から cDNA を作成し、TaqMan プローブを用いて *Hamp*

(ヘプシジン)、*Bmper* (BMP binding endothelial regulator)、*18S rRNA* に対して RT-qPCR 解析を施行し、比較 Ct 法により遺伝子発現量を測定した。

ウェスタンブロット

肝組織あるいは免疫沈降されたマウス血漿サンプルから RIPA バッファーを用いてタンパク質を抽出し、SDS 緩衝液と混合して電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写してリン酸化 SMAD と SMAD1、Actin、BMPER、BMP6 の発現量を解析した。

免疫化学染色・免疫蛍光染色

肝組織切片における BMPER 発現をジアミノベンジジン発色による免疫化学染色で評価した。初代培養肝細胞と非実質細胞における E-Cadherin と VE-Cadherin の発現を DAPI も加えた 3 重免疫蛍光染色により評価した。

マウス血漿の免疫沈降

Dynabeads (Life Technologies) と BMPER 抗体を用いてマウス血漿の免疫沈降を行った。得られたサンプルのタンパク質発現をウェスタンブロットにより評価した。

マウス肝組織からの初代培養肝細胞および非実質細胞の分離

コラゲナーゼを含む Hanks 溶液を灌流した通常食飼育のマウス肝組織を PBS で懸濁し、遠心で得られた沈殿を肝細胞が含まれる分画として培養し、上清を非実質細胞が含まれる分画として培養して用いた。

統計処理

有意差検定には Student t 検定を用い、 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては前研究と同様。

C. 研究結果

高脂肪食負荷マウスにおける脂肪肝、肝炎の発症と鉄動態の変化

高脂肪食群の肝組織像は NASH ではなく NAFL に相当する所見であった。血漿鉄と血漿フェリチンは有意に高値を示した (図 7, 8)。肝内鉄含有量はいずれの群においても上昇しておらず、鉄染色でも肝内鉄沈着を認めなかった。

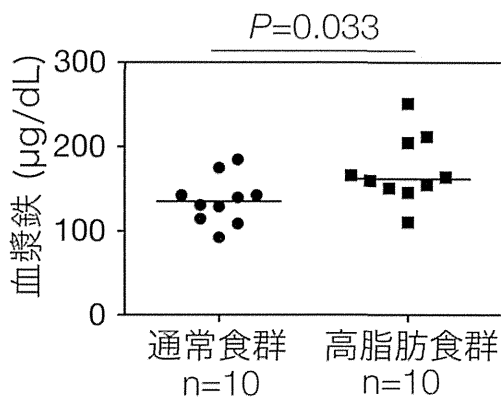


図 7: 血漿鉄

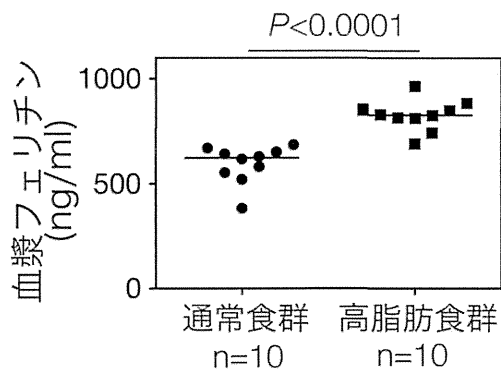


図 8: 血漿フェリチン

網羅的遺伝子発現解析

網羅的に遺伝子発現を解析した 38114 種類の遺伝子のうち、有意な発現変動

が認められた遺伝子数は 2314 種類であった (図 9)。このうち、ヘプシジン発現に関連する遺伝子に絞ると *Bmp4*、*Bmper*、*Epor* (エリスロポエチン受容体)、*Gdf15* (増殖分化因子 15)、*Hamp*、*Hfe2* (ヘモジュベリン) の 6 遺伝子であった (表 2)。

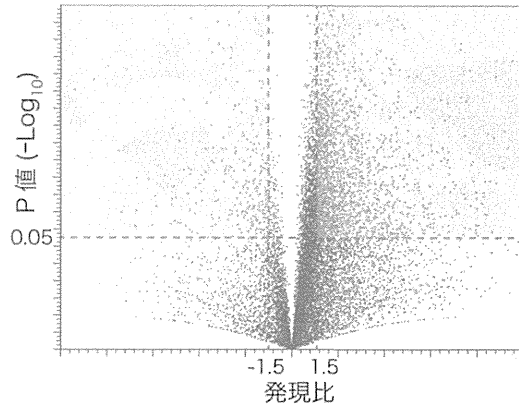


図 9: Volcano plot. 発現比の絶対値が 1.5 以上で P 値が 0.05 未満となる領域の遺伝子を発現変動遺伝子とした。

関連シグナル経路	遺伝子	発現蛋白質	発現比	P値
BMP-SMAD シグナル	<i>Bmp2</i>	Bone Morphogenetic Protein 2	-1.410	0.001
	<i>Bmp4</i>	Bone Morphogenetic Protein 4	1.601	0.032
	<i>Bmp6</i>	Bone Morphogenetic Protein 6	1.039	0.788
	<i>Bmper</i>	BMP Binding Endothelial Regulator	5.242	0.035
	<i>Bmpr2</i>	Bone Morphogenetic Protein Receptor 2	1.531	0.007
	<i>Hfe2</i>	Hemojuvelin	1.200	0.011
トランスフェリン受容体シグナル	<i>Tfrc</i>	Transferrin Receptor Protein 1	1.195	0.250
	<i>Tfr2</i>	Transferrin Receptor Protein 2	-1.014	0.784
	<i>Il6</i>	Interleukin 6	1.000	1.000
IL-6/STAT3 シグナル	<i>Stat3</i>	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	1.236	0.004
	<i>Epor</i>	Erythropoietin Receptor ¹⁾	2.303	0.047
その他	<i>Gdf15</i>	Growth Differentiation Factor15 ²⁾	4.226	0.015
	<i>Furin</i>	Furin	1.068	0.393

表 2: 主なヘプシジン関連遺伝子。白字が発現変動遺伝子

ヘプシジン発現と調節因子の検討

Hamp 遺伝子の発現が高脂肪食群で低下していることを RT-qPCR (図 10) および翻訳産物の血漿ヘプシジン濃度 (図 11) で確認した。*Bmp4*、*Bmper*、*Hfe2* の 3 遺伝子の産物が BMP シグナルに関与するため、伝達分子である SMAD のリン酸化を検討し、高脂肪食群で有意な低下を認めた (図 12)。

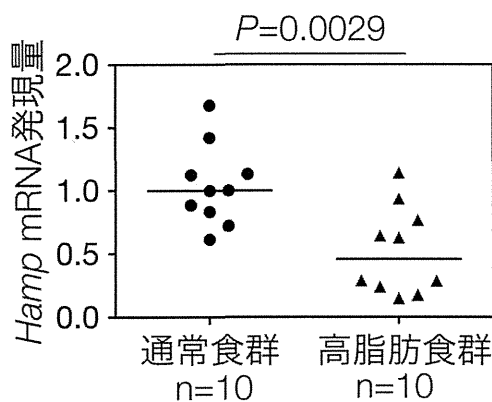


図 10 : *Hamp* mRNA 発現(RT-qPCR)

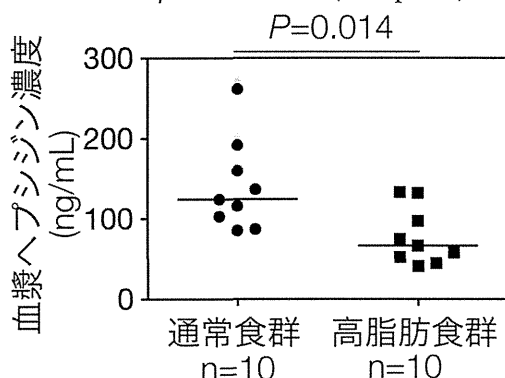


図 11 : 血漿中活性型へプシジン濃度 (LC/ESI-MS/MS)

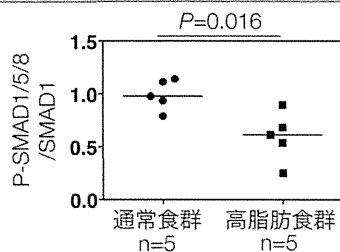
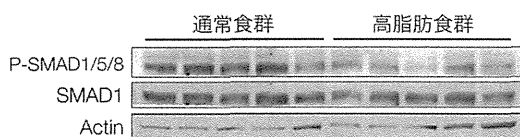


図 12 : 肝内 SMAD リン酸化解析 (ウェスタンブロット)

マウスの BMPER 発現の検討

へプシジン発現低下とリン酸化 SMAD 発現低下に対して *Bmp4*, *Hfe2* の挙動は相反する動きである。一方, *Bmper* 発現増加はそれに対応する発現変

動であった。よって、以後の検討を BMPER に注目して進めた。マウス肝組織の BMPER をコードする *Bmper* mRNA 発現は高脂肪食群で有意な増加を示した (図 13)。マウス血漿中 BMPER は増加傾向を示した (図 14)。

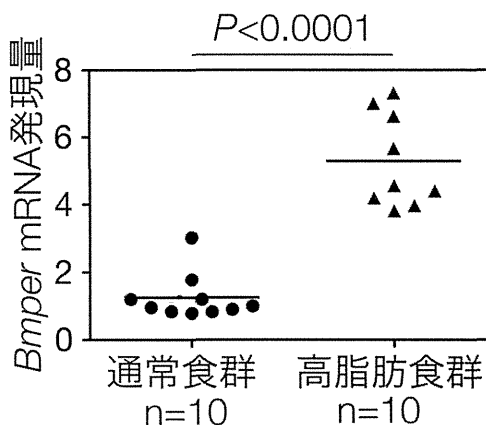


図 13 : *Bmper* mRNA 発現(RT-qPCR)

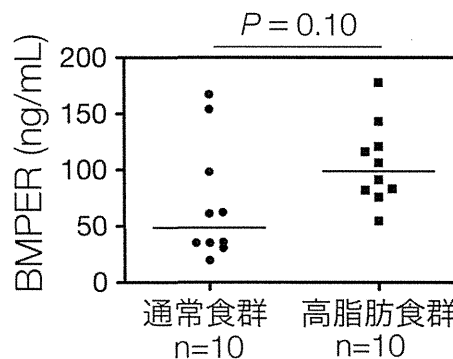


図 14 : マウス血漿 BMPER 蛋白発現 (ELISA)

マウス肝組織の肝細胞と非実質細胞における BMPER 発現解析

通常食群、高脂肪食群ともに肝組織の免疫化学染色では BMPER が非実質細胞に陽性像を示した (図 15)。マウス肝組織における BMPER 発現局在を確認するため、肝細胞と類洞内皮細胞を主とする非実質細胞を分離した。各細胞における *Bmper* mRNA 発現を測定したところ、非実質細胞で有意に高値を示し

た (図 16)。

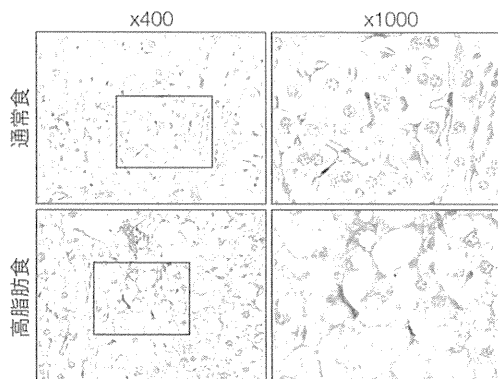


図 15 : 肝組織の BMPER 免疫化学染色

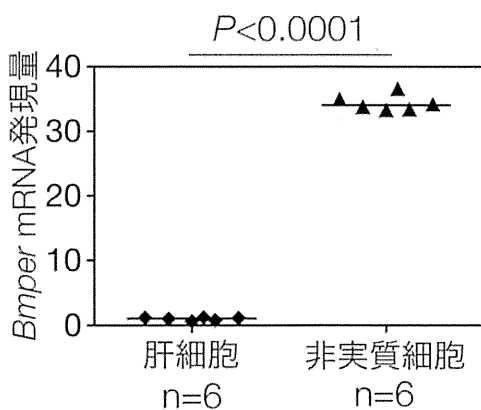


図 16 : 非実質細胞に *Bmper* mRNA 発現がある

BMPER が BMP6 と結合して抑制的に働くことから、血漿を BMPER 抗体で免疫沈降し、ウェスタンブロットで蛋白発現を解析した。血漿中の BMPER は BMPER 抗体で選択的に免疫沈降され、BMPER の阻害するターゲットである BMP6 が共免疫沈降されていた (図 17)。

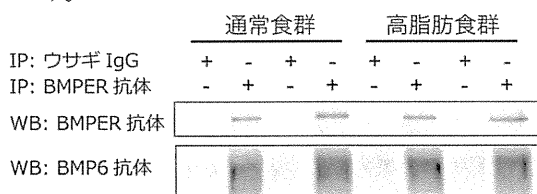


図 17 : BMPER と BMP6 の共免疫沈降とウェスタンブロット

D. 考察

本研究では、可染鉄を認めない軽度の肝内鉄過剰状態を合併する 16 週間の高脂肪食負荷による脂肪肝モデルマウスで、網羅的遺伝子発現解析を行った。脂肪肝マウスにおける鉄過剰状態の機序に鉄代謝制御分子ヘプシジンの発現変化を想定してはいるが、特定の遺伝子に絞り込まないで遺伝子発現を網羅的に解析した。*Hamp* 遺伝子の発現と翻訳蛋白ヘプシジンの発現が低下していることを確認し、発現変動遺伝子の中にヘプシジン発現変動に関与する遺伝子として 5 遺伝子を見出した。ヘプシジンは鉄吸収を負に調節する作用があり、発現低下によって鉄吸収が亢進して鉄過剰の原因となる。ヘプシジン発現低下の原因として、ヘプシジンを調節する主な上流シグナルである SMAD のリン酸化が低下していることを見出した。そして 5 遺伝子の中で、SMAD シグナルを抑制的にする方向で変動している *Bmper* 遺伝子に注目した。BMPER は BMP2,4,6 の各々と結合しそのシグナル伝達を阻害することが知られている。本研究では脂肪肝モデルで BMPER 発現亢進がヘプシジン発現抑制の原因であることを示した。さらに BMPER が血中で BMP6 と結合していることを証明した。本研究では BMPER の発現局在が非実質細胞であることを示した。ヘプシジン発現調節において、促進系の BMP6 の発現が肝細胞のオートクライン調整より、非実質細胞からのパラクライン調節の方が重要であると示されているが、抑制系の

BMPER の発現もパラクラインで作用することは特筆すべき発見である。

E. 結論

高脂肪食負荷による NAFL モデルマウスにおいて鉄過剰症が合併し、鉄制御分子ヘプシジンの発現低下が見られることを示した。この機序として BMP シグナル制御分子 BMPER 発現亢進が関与し、さらに非実質細胞が BMPER を産生しパラクライン調節を行っていることを示した。BMPER は NAFL に合併する鉄過剰症の病態メカニズム上、重要な分子と考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

13. Addo L, Tanaka H, Yamamoto M, Toki Y, Ito S, Ikuta K, Sasaki K, Ohtake T, Torimoto Y, Fujiya M, **Kohgo Y**. Hepatic nerve growth factor induced by iron overload triggers defenestration in liver sinusoidal endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1852(1):175-83 2014.
14. Hasebe T, Sawada K, Nakajima S, Maeda S, Abe M, Suzuki Y, Ohtake T, Hasebe C, Fujiya M, **Kohgo Y**. Effective control of relapsing disseminated intravascular coagulation in a patient with decompensated liver cirrhosis by recombinant soluble thrombomodulin. *Intern Med* 53(1): 29-33 2014.
15. Sasaki Y, Shimonaka Y, Ikuta K, Hosoki T, Sasaki K, Torimoto Y, Kanada H, Moriguchi Y, **Kohgo Y**. Hepsidin production in response to iron is controlled by monocyte-derived humoral factors. *Int J Hematol* 99(1): 12-20 2014.
16. Kawaguchi T, Shiraishi K, Ito T, Suzuki K, Koreeda C, Ohtake T, Iwasa M, Tokumoto Y, Endo R, Kawamura NH, Shiraki M, Habu D, Tsuruta S, Miwa Y, Kawaguchi A, Kakuma T, Sakai H, Kawada N, Hanai T, Takahashi SI, Kato A, Onji M, et al. Branched-chain Amino Acids Prevent Hepatocarcinogenesis and Prolong Survival of Patients With Cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 12(6):1012-8 2014.
17. Ichiki K, Ikuta K, Addo L, Tanaka H, Sasaki Y, Shimonaka Y, Sasaki K, Ito S, Shindo M, Ohtake T, Fujiya M, Torimoto Y, **Kohgo Y**. Upregulation of iron regulatory hormone hepcidin by interferon a. *J Gastroenterol Hepatol* 29(2): 387-94 2014.
18. Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, Abe M, Tanaka H, Ikuta K, Suzuki Y, Fujiya M, Hasebe C, **Kohgo Y**. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatol Res* 44(8):920-34 2014.
田中宏樹, 高後裕. 【代謝と癌-oncogenic metabolism 研究の進歩-】 消化器癌遺伝子変異と代謝プロファイルにはどのような相互関係があるか. *分子消化器病* 11 巻 4 号 343-348 2014.
19. 大竹孝明, 澤田康司, 高後裕. 新しい消化器疾患動物モデル(第 15 回) 非アルコール性脂肪性肝障害モデル動物 脂肪性肝障害モデルを用いた肝炎発症メカニズムの解析. *分子消化器病* 11 巻 3 号 265-269 2014.
20. 内海辰哉, 澤田康司, 中嶋駿介, 阿部真美, 大竹孝明, 藤谷幹浩, 高後裕. adefovir の減量と経口リン製剤が有効であった病的尺骨骨折を伴う Fanconi 症候群の 1 例. *日本内科学会雑誌* 103 巻 8 号 1927-1930 2014.

学会発表

21. Nakajima S, Ohtake T, Hasebe T, Sawada K, Abe M, Suzuki Y, Fujiya M, **Kohgo Y**. Usefulness of Acoustic Noninvasive Assessment of Liver Stiffness: Radiation Force Impulse (ARFI) Elastography for staging of liver fibrosis and differential diagnosis of hepatic tumor. The 65th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. November 7-11, 2014, Boston.
22. Ohtake T, Tsuji K, Kawanishi T, Machida T, Takagi H, Mezawa S, Yazaki Y, Shinomura Y, **Kohgo Y**, Hokkaido Study Group of Portal Hypertension. A multicenter survey concerned with efficacy and safety of danaparoid sodium treatment against portal vein thrombosis. The 65th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. November 7-11, 2014, Boston.
23. Tanaka H, Ohtake T, Addo L, Yamamoto M, Toki Y, Sawada K, Nakajima S, Hasebe T, Ikuta K, Sasaki K, Torimoto Y, Fujiya M, **Kohgo Y**. Iron-overload alters lipid metabolism and Ras signaling independent of oxidative stress in mouse liver tissue by whole RNA sequencing. The 65th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases. November 7-11, 2014, Boston.
24. 澤田康司、大竹孝明、中嶋駿介、阿部真美、藤谷幹浩、**高後裕**. Cathelicidin 誘導を介した脂肪酸の Toll-like receptors 発現誘導に関する検討. 第 100 回日本消化器病学会総会、2014 年 4 月 23-26 日、東京.
25. 中嶋駿介、阿部真美、澤田康司、大竹孝明、藤谷幹浩、**高後裕**. 超音波診断装置による肝線維化診断と MR elastography の使用経験. 第 100 回日本消化器病学会総会、2014 年 4 月 23-26 日、東京.
26. 阿部真美、中嶋駿介、澤田康司、長谷部千登美、大竹孝明、**高後裕**. 一地方都市のかかりつけ医を対象とした肝炎に関する意識調査 医療連携における問題点. 第 50 回日本肝臓学会総会、ワークショップ 12「肝疾患診療における医療連携の在り方」2014 年 5 月 29-30 日、ホテルニューオータニ東京.
27. 田中宏樹、中嶋駿介、澤田康司、阿部真美、生田克哉、佐々木勝則、大竹孝明、鳥本悦宏、藤谷幹浩、**高後裕**. 鉄過剰が誘導するエネルギー代謝異常 トランスクリプトーム解析による肝発癌関連分子の探索. 第 50 回日本肝臓学会総会、ワークショップ 9「肝障害における金属元素の役割」2014 年 5 月 29-30 日、ホテルニューオータニ東京.
28. 澤田康司、中嶋駿介、阿部真美、大竹孝明、藤谷幹浩、**高後裕**. 北海道における IFN 少量長期療法施行 C 型慢性肝炎症例の臨床像～北海道単独肝炎助成制度からの解析～. JDDW2014 2014 年 10 月 24 日、神戸.
29. 中嶋駿介、澤田康司、阿部真美、大竹孝明、**高後裕**. 難治性肝性腹水に対するトルバプタンの治療効果. JDDW2014 2014 年 10 月 24 日、神戸.
30. Sawada K, Ohtake T, Hayashi H, Hasebe T, Nakajima S, Abe M, Fujii F, Fujiya M, Hasebe C, **Kohgo Y**. Platelet count and Fib-4 score are useful for predicting hepatic fibrosis and evaluation of fibrosis improvement in hepatitis B virus infected patients treating with nucleoside/nucleotide analogues. The 11th JSH Single Topic Conference. 2014. 11. 20-21. Hiroshima, Japan.
31. 大竹孝明、阿部真美、長谷部拓夢、中嶋駿介、澤田康司、井上充貴、鈴木康秋、長谷部千登美、藤谷幹浩、**高後裕**. 一地方自治体の肝炎医療に関するフィールドワーク研究. 第 40 回日本肝臓学会東部会、2014 年 11 月 27-28 日、京王プラザホテル.
32. 澤田康司、大竹孝明、林秀美、中嶋駿介、長谷部拓夢、阿部真美、細木弥生、藤井常志、藤谷幹浩、長谷部千登美、**高後裕**.

Sequential 療法による HBs 抗原量の変化と Drug free 化効果に関する検討. 第 40 回日本肝臓学会東部会、2014 年 11 月 27-28 日、京王プラザホテル.

33. 中嶋駿介、大竹孝明、高後裕. Virtual Touch Quantification による肝線維化診断と肝腫瘍の質的診断能の検討第 40 回日本肝臓学会東部会、2014 年 11 月 27-28 日、京王プラザホテル.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

・発明の名称：ヘプシジンのスプライシングバリエント並びに当該バリエントを指標とした癌の診断方法. 発明者：高後裕，大竹孝明，土岐康通，佐々木勝則.

国内出願日：2014 年 8 月 21 日.

国際出願：準備中.

・他 1 件出願準備中.

2. 実用新案登録

該当なし.

3. その他

該当なし.

分担研究者 横浜市立大学附属市民総合医療センター消化器病センター 中馬 誠 准教授
研究協力者 横浜市立大学附属市民総合医療センター消化器病センター 野崎 昭人 講師

分担研究課題：肝発癌に関わるゲノム・エピゲノム情報の解析

- (1) Genotype 2 型 C 型慢性肝炎のインターフェロン治療における治療効果予測と遺伝子多型についての検討
近年、遺伝子型 1 の C 型肝炎患者において IL28B SNP が有意な治療効果予測因子として定着したが、遺伝子型 2 については報告が少なくコンセンサスが得られていない。PEG-IFN α 2b+RBV 併用療法を行った遺伝子型 2 症例の IL28B SNP 解析を行い、その治療効果に与える影響を検討した。
- (2) 肝癌における Heat shock factor 1(HSF1)の分子標的治療としての可能性
C 型肝発癌において酸化ストレスの関与が考えられており、ストレス関連分子である HSF1 の肝発癌における関与を検討した。細胞生物学的には、HSF1 が腫瘍の増殖、抗 apoptosis に働く事と、ヒト肝癌臨床検体では、HSF1 が高発現していることを明らかにした。
- (3) 肝癌の早期再発に関する miRNA の同定
C型肝癌は根治後も高頻度に肝内再発を来し、早期再発の予後は不良である。肝癌切除後の早期再発に関連する分泌型microRNAを探索し、早期再発例で高発現している5つのmiRNA; を同定した。これらのmiRNAが肝癌早期再発診断のバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

- (1) Genotype 2 型 C 型慢性肝炎のインターフェロン治療の効果予測における遺伝子多型の関与を明らかにする。
- (2) HSF1 の肝癌における役割を解析し、肝癌における分子標的治療の可能性について明らかにする。
- (3) 肝癌患者の血清において肝癌早期再発に関する miRNA の同定を行う。

B. 研究方法

- (1) 対象は、Group2 高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対してペグインターフェロン・リバビリン(PEG-IFN α 2b+RBV)併用療法を導入した 104 症例のうち同意を得て SNP 解析を行った 80 例。IL28B SNP は Genotype I 型の C 型慢性肝炎に対する治療効果と関連のあると既に報告のある

rs8099917, rs11881222, and rs8103142 につ

いてインベータープラス法を用いて解析を行った。

(2) A ; 細胞生物学的検討 1) HSF1 knockout (HSF1KO)マウス、WT マウスの初代培養肝細胞株、HSF1 高発現肝癌細胞株(HSF1 control)、同細胞株の HSF1-knock down(KD)細胞での細胞増殖に関する検討 2)上記 HSF1KO、WT マウス、HSF1 KD、control 細胞における apoptosis に関する検討 B ; 肝癌切除症例の組織検体における HSF1 の発現と臨床病理学的検討を行った。

(3) 対象は、HCC にて肝切除施行された 45 例(早期再発 (ER)-肝切除後 6 ヶ月以内に再発-19 例、5 年以上無再発生存 (NR)-26 例)、HCC を伴わない慢性肝炎(H)10 例、

健常人(C)5例、計60例。1)5例のERと5例のNR、2例の健常人の血清を用いて、miRNA-microarrayによる網羅的解析を行い、早期再発に関与するmiRNAの同定を行った。2)同定されたmiRNAを定量RT-PCRにより上記60例で検討した。

C. 研究結果

(1) 症例の治療効果；ultra-rapid virological response (URVR) / rapid virological response (RVR) / end-of-treatment virological response (ETR) / sustained virological response (SVR)率は、それぞれ22.2% / 61.4% / 95.0% / 87.1%であった。単変量解析ではSVRと関連する因子としてURVR, RVR, ETR, IL28B SNPs (rs8099917, rs11881222, and rs8103142)が抽出された。またgenotypeや年齢、性別、BMI、線維化の程度、薬剤総投与量はSVRとの有意な関連を認めなかった。多変量解析においてSVRと有意な関連をもつものとして、RVR (Odds ratio (95% CI): 6.491(1.669–25.241), $P=0.007$)とIL28B (rs8099917; Odds ratio (95% CI): 6.491(1.669–25.241), $P=0.007$)が独立した因子として抽出された。なお、IL28BとURVR、RVR、ETRには有意な相関は認めず、IL28B SNPは再燃と関連しているが($P=0.017$)、RVRは再燃とは関連していない($P=0.255$)結果であった。

(2) A；1) HSF1-KD細胞では、controlに比較して、40%の増殖抑制、BrDUで40%の取り込み低下を認めた。EGF投与後、HSF1 control、WTマウスに比較してHSF1-KD、HSF1 KOマウスでは、EGFR, MEK, ERKのリン酸化の有意な低下を認めた。SCIDマウスにおいてHSF1-KDではcontrolに比較して有意に腫瘍の縮小を認めた。マウス肝左葉切除後の肝右葉においてHSF1は24,48時間後で発現の増加を認め、HSF1は肝細胞の増殖、再生に関与していると考えられた。2) TNF α 投与後のNF- κ B signalについては、WTマウスに比較してHSF1 KOマウスでは、HSF1により制御されてい

るBAG-3(Bcl-2-associated athanogene domain 3)の発現減少を介して、IKK γ のproteasome degradationを来し、NF- κ Bの活性化の低下を認めた。またHSF1-KD細胞において、control細胞に比較してTNF α 投与後NF- κ Bに制御されている抗アポトーシス分子の発現低下を認め、さらにTUNEL染色において陽性細胞の上昇を認め、HSF1の発現抑制はapoptosisの亢進に寄与していると考えられた。B；肝癌の切除検体における免疫組織染色では、癌部が非癌部に比較して60%の症例で高発現しており、HSF1の高発現と分化度、腫瘍径、腫瘍個数、予後が関連しており、臨床上もHSF1の肝癌における関与が示唆された。

(3) 1) array解析より、ER-NR両群間で発現差2倍以上あるmiRNAを同定した。2) 同定したmiRNAの60例における定量PCRで特に早期再発で高発現している5つのmiRNA；miR-135a, miR-658, miR-665, miR-1246, miR-1915を抽出した。miRNAそれぞれの発現比(ER/NR, ER/H, ER/C)は、miR-135a (3.2, 2.3, 2.7), miR-658 (4.2, 3.5, 2.9), miR-665 (3.4, 2.7, 2.3), miR-1246 (2.9, 3.4, 3.8), miR-1915 (4.9, 3.2, 5.7)であり、HCCの早期再発の感度は71.2%、特異度は82.4%であった。

D. 考察

(1) genotype2 C型慢性肝炎に対するPEG-IFN+RBV併用療法で、多変量解析においてIL28B SNPが有意にSVRと関連するという結果は、今回が初めての報告であった。IL28B SNPとRVRの有無がSVRと関連する因子として抽出され、それぞれ異なったメカニズムによってSVRと関連している可能性が示唆された。またIL28B SNPは再燃と有意な関連を認めるのに対し、RVRと再燃に関連を認めなかったため、IL28B SNPはRVRと異なり genotype2 C型慢性肝炎に対するPEG-IFN+RBV併用療法において再燃を抑制することでSVRと関連する可能性が示唆された。

(2)本研究により、HSF KOマウスでは、ERK, NF- κ Bの両方の活性化が減弱し、HSF1KD細胞、Xenograftでは肝癌の増殖抑制が得られた。HSF1の機能低下に伴いERKの活性化が低下することは、HSF1KO MEF細胞での報告がある(Dai C et al. Cell 2007; 130: 1005–1018.)、NF- κ Bとの関与については直接的なものではなく、今回が新規である。肝癌においてERK, NF- κ Bの活性化が重要な役割を担っていると従来より考えられており、本研究では、HSF1とERK, NF- κ Bの関係をKOマウスを用いた*in vivo*モデルから解析した点でも意義が高いと考えられる。またHSF1の機能低下が、腫瘍の増殖抑制、apoptosisの亢進を示したことは、臨床検体でのHSF1の発現と肝癌の悪性度、予後との相関を示したことも踏まえて、HSF1は今後、肝癌における重要な標的の一躍を担うことが期待される。

(3)今回同定された5つのmiRNAが肝癌早期再発診断のバイオマーカーになりうる可能性が示唆された。miR-135aは門脈腫瘍栓を伴うHCCの組織で高発現し(J.Hepatol 2012)、miR-1246は食道癌の予後に相関する血清バイオマーカーである事(BJC 2013)が報告されており、今後多数例での検証が望まれる。

E 結論

- (1) Genotype 2型C型慢性肝炎のインターフェロン治療の効果予測における遺伝子多型の関与が示された。
- (2) 肝癌におけるHeat shock factor 1(HSF1)の分子標的治療としての可能性が示された。
- (3) 肝癌の早期再発に関するmiRNAを同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1 Shimoyama Y, Nozaki A, et al. Effects of IL-28B gene polymorphism on response to peginterferon plus ribavirin combination therapy for genotype 2 chronic hepatitis C. Hepatol Res. 2013; 43: 919-24.
- 2 Chuma M, Sakamoto N, et al. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase. Carcinogenesis. 2014; 35: 272-81.
- 3 Chuma M, Terashita K, Sakamoto N. New molecularly targeted therapies against advanced hepatocellular carcinoma: From molecular pathogenesis to clinical trials and future directions. Hepatol Res. 2014 Dec 4. doi: 10.1111/hepr.12459. [Epub ahead of print]

学会発表

- 1 肝細胞癌の早期再発に関する血清バイオマーカー ; miRNAの同定。第50回日本肝臓学会総会、2014.5.30 東京

H. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無

その他

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻・号	ページ	出版年
Mizokami M, Yokosuka O, Takehara T, Sakamoto N, Korenaga M, Mochizuki H, Nakane K, Enomoto H, Ikeda F, Yanase M, Toyoda H, Genda T, Umemura T, Yatsuhashi H, Ide T, Toda N, Nirei K, Ueno Y, Nishigaki Y, Betular J, Gao B, Ishizaki A, Omote M, Mo H, Garrison K, Pang PS, Knox SJ, Symonds WT, McHutchison JG, Izumi N, Omata M	Ledipasvir and sofosbuvir fixed-dose combination with and without ribavirin for 12 weeks in treatment-naive and previously treated Japanese patients with genotype 1 hepatitis C: an open-label, randomised, phase 3 trial.	Lancet Infect Dis		掲載予定	2015
Onishi R, Ohnishi S, Higashi R, Watari M, Yamahara K, Okubo N, Nakagawa K, Katsurada T, Suda G, Natsuiyaka M, Takeda H, Sakamoto N	Human Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Severe Colitis in Rats.	Cell Transplant		掲載予定	2015
Yoshimura A, Ohnishi S, Orito C, Kawahara Y, Takasaki H, Takeda H, Sakamoto N, Hashino S	Association of peripheral total and differential leukocyte counts with obesity-related complications in young adults.	Obes Facts	8 (1)	1-16	2015
Jiang X, Kanda T, Nakamoto S, Saito K, Nakamura M, Wu S, Haga Y, Sasaki R, Sakamoto N, Shirasawa H, Okamoto H, Yokosuka O	The JAK2 inhibitor AZD1480 inhibits hepatitis A virus replication in Huh7 cells.	Biochem Biophys Res Commun	458 (4)	908-12	2015