

平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		KANEKO SHUICHI				
①研究代表者氏名		金子 周一			②所属研究機関・部局・職	金沢大学・大学院医学系研究科・教授
③研究課題名	和文	Genomics 技術による新しい肝臓病学の確立				
	英文	Establishment of Genomics Based Hepatology				
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計
	31,200	19,000	19,000	11,400	11,400	92,000
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
金子 周一	金沢大学・大学院医学系研究科・教授	肝臓病学	データベースを用いた遺伝子解析と統括			
本多 政夫	金沢大学・大学院医学系研究科・助教授	肝臓病学	SAGEを用いた遺伝子解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）						
<p>Genomics技術を中心とする遺伝子解析技術の進歩によって、細胞あるいは臓器において発現している方におよぶ遺伝子を同時に包括的に解析することが可能となった。</p> <p>本研究では各種の肝臓病を対象に包括的な発現遺伝子解析を行い、肝臓の機能および構造と遺伝子発現との関連を明らかにし、病態の解析を行う。肝臓において発現している遺伝子のデータベースを構築するとともに、新たな診断や治療法の開発研究を行う。さらに包括的な発現遺伝子情報をもとに、遺伝子発現よりみた新しい肝臓病学の分野を確立する。</p>						

⑦研究成果の概要（研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。）

研究成果は目的に応じて、1. 肝臓病における包括的発現遺伝子データベース作成、2. 従来から知られている肝臓病の解析、3. 新たな解析法、診断・治療法の開発、4. 従来は肝臓病と考えられていなかった肝臓異常の検出、の4点に分類し以下に簡潔に記入した。

1. 肝臓病における包括的発現遺伝子データベース作成

肝臓における包括的発現遺伝子情報と臨床情報をデータベース化した。1) 世界最大となる正確で系統的な各種肝臓病のヒト肝臓における発現遺伝子データベースを構築した(約300例の肝臓DNAチップ解析、18種の肝臓SAGEライブラリー：合わせて約1,000万遺伝子情報、公開予定)。2) 系統的な肝臓病における発現タンパクデータベース(10ライブラリー、PMF法にて同定済み1,000スポット：公開予定)を作製した。

2. 従来から知られている肝臓病の解析

解析情報を用いて慢性肝炎など従来から肝臓病として知られる疾患の研究を行った。B型およびC型慢性肝炎、自己免疫性肝炎および原発性胆汁性肝硬変、肝癌を解析し発現遺伝子情報を用いることによって包括的発現遺伝子情報からみた疾病の診断および病態解析を行い、加えて、従来の研究手法で解決できなかった重要な問題点を解決した(Hepatology 2001a, b, 2002, J Exp Med 2002, J Hepatol 2002, Cancer Res 2004, Gastroenterology 2000, 2001, 2005, Gut 2005他)。

3. 新たな解析法、診断・治療法の開発

#1を用いることによってヒトにおいても染色体に臓器特異的な発現遺伝子の集積領域があること、これを用いることによって新規肝臓発現遺伝子の探索が可能であることを示した(Genomics 2004)。#1を用いて癌抗原エピトープ候補を抽出し(Int J Cancer 2005、他。)、特許出願した。病態解析だけでなく肝臓疾患の治療方針の決定にもgenomics技術が有用であることを示し(BBRC 2004他)、この業績によって平成16年度の産学官連携功労者文部科学大臣賞を受賞した。

4. 従来は肝臓病と考えられなかった肝臓異常の検出

軽度の異常あるいは従来は正常と診断されていた肝臓の解析を行った。多くの成果は特許出願が終了し論文投稿を予定している。糖尿病および肥満を有する症例の肝臓における包括的発現遺伝子は対照群と大きくことなること、それらの異常が各種の代謝異常と密接に関連し、さらには全身の動脈硬化病変の進行にも密接に関係する可能性を示した(Diabetes in revision、Diabetologia 2004)。また、糖尿病患者の肝臓では糖尿病との関連が未だ報告されておらず発現が亢進している分泌型タンパクの70個を特許出願し、順次解析しているところである。うちひとつが強い血管新生作用を示したため特許出願している。

Genomics技術による新しい肝臓病学の確立

世界最大の肝臓における包括的発現遺伝子データベースの作成

従来から肝臓病として知られている
肝臓の解析(慢性肝炎・肝癌など)

従来は肝臓病と考えられていない
肝臓異常の検出(糖尿病・肥満症など)

病態解析、新たな疾病概念の創出、新しい解析法、診断・治療法の開発

⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

我々は Genomics 技術を用いることによって従来の医学手法では困難であった B 型と C 型の慢性ウイルス性肝炎の病態の違い、肝発癌過程の違い、原発性胆汁性肝硬変と自己免疫性肝炎の病態の違いを明らかにした。これらの成果はいずれも独創性が高く、一流紙の表紙を飾り、米国学会の招聘講演を受けるなど圧倒的に世界においてこの分野をリードしている。

さらに従来の医学手法では困難であった C 型慢性肝炎患者に対するインターフェロン治療の反応性を治療前に予測する個別化医療の可能性を示し、文部大臣賞を受けた。この成果は肝臓領域に限らず広く個別化医療の分野において大きな影響を与えた。

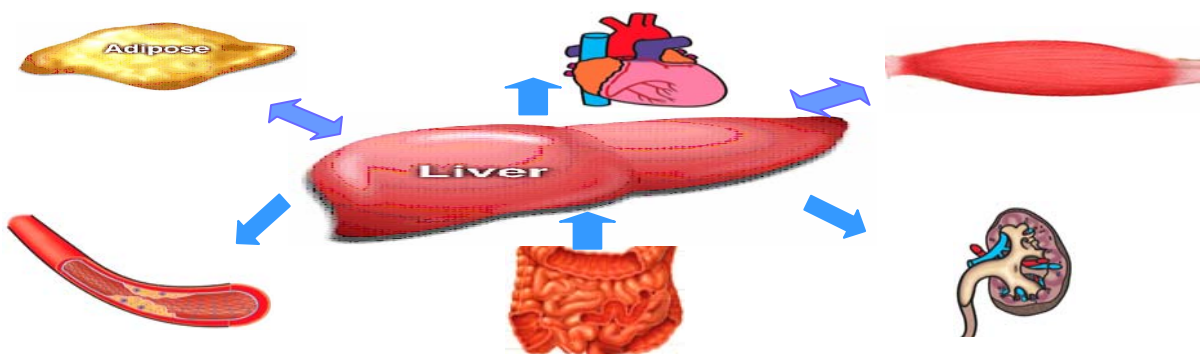
こうした成果にとどまらず今回の最大の成果のひとつは、従来は重要な肝臓病であると考えられなかった代謝疾患の研究である。糖尿病患者や肥満症患者は黄疸や腹水といった肝臓の症状を示すことはなく、また CT/MRI などの画像診断、さらには病理診断を行っても脂肪肝程度を示す程度であるため、従来の医学手法では重要な異常が肝臓に存在するとは考えられてこなかった。しかし、今回の研究によって包括的に発現遺伝子を解析すると、糖尿病患者の肝臓は糖代謝だけでなく脂質代謝、タンパク代謝が大きく変動していた。また糖尿病に肥満が加わることによって肝臓のエネルギー代謝、脂質代謝はさらに大きな変動を示した。こうした代謝の変化だけでなく、糖尿病患者の肝臓においては、全身の動脈硬化をひきおこす生理活性物質の遺伝子発現が亢進していることが明らかとなった。即ち、本研究において、**糖尿病・肥満症などを有する患者の肝臓は各種の代謝異常と密接に相互に関連し、加えて動脈硬化、炎症などの疾患と密接に関係している可能性があることを示したのである。**

肝臓は、本来、糖・タンパク・脂質の代謝や薬物および異物の解毒を専門とする巨大な臓器である。長い飢餓の時代にあつて、肝臓は摂取された栄養を効率的に利用してブドウ糖など重要な代謝物の血中濃度を一定（ホメオスターシス）に保つ重要な役割を果たしてきた。しかし、飽食の時代になって、一転、肝臓は過剰に摂取される栄養にさらされている。肝臓は旺盛な代謝能力を有しているが、能力を超える栄養を処理できず栄養は全身に運ばれている可能性がある。こうした肝臓の構造と機能および歴史的な役割を考慮して我々の研究成果を考察すると、我々の研究成果は 21 世紀の最大の課題である動脈硬化、糖尿病、癌、炎症をはじめ栄養状態が関与する症候群に肝臓が大きく関与している可能性を示したのである。

このように本研究成果は飽食の時代における栄養状態が関与する症候群に対する戦略をたてるうえで、こうした肝臓の状態を肝臓病としてとらえて基盤的な研究を行うことの重要性を示すというきわめて独創的で誇るべき成果を残すことが出来た。

本研究によって、飽食時代の肝臓は本来の機能を果たすことが出来ず病んでいることが明らかとなった

即ち、栄養状態が関与する疾病に対する戦略として肝臓の研究が重要となった
飽食時代における肝臓機能の破綻を病気としてとらえる概念を確立し、
その病因および病態の解析と肝臓が及ぼす生活習慣病への影響を明らかにする必要がある



⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

1. X Yang, P Lu, C Fujii, Y Nakamoto, JL Gao, S Kaneko, PM Murphy, and N Mukaida. Essential contribution of a chemokine, CCL3, and its receptor, CCR1, to hepatocellular carcinoma progression. *Int J Cancer* 118(8):1869-1876, 2006.
2. K Hayashida, A Daiba, A Sakai, T Tanaka, K Kaji, N Inaba, S Ando, N Kajiyama, H Terasaki, A Abe, M Ogasawara, M Kohara, M Harada, T Okanoue, S Ito, and S Kaneko. Pretreatment prediction of interferon-alfa efficacy in chronic hepatitis C patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3(12):1253-1259, 2005.
3. H Ando, H Yanagihara, Y Hayashi, Y Obi, S Tsuruoka, T Takamura, S Kaneko, and A Fujimura. Rhythmic mRNA expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology* 146(12):5631-5636, 2005.
4. E Mizukoshi, Y Nakamoto, H Tsuji, T Yamashita, and S Kaneko. Identification of alpha-fetoprotein-derived peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes in HLA-A24+ patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 118(5):1194-1204, 2005.
5. M Honda, H Kawai, Y Shiota, T Yamashita, T Takamura, and S Kaneko. cDNA microarray analysis of autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and consecutive disease manifestation. *J Autoimmun* 25(2):133-140, 2005.
6. R Maniratanachote, A Shibata, S Kaneko, I Yamamori, T Wakasugi, T Sawazaki, K Katoh, S Tokudome, M Nakajima, and T Yokoi. Detection of autoantibody to aldolase B in sera from patients with troglitazone-induced liver dysfunction. *Toxicology* 216(1):15-23, 2005.
7. M Honda, H Kawai, Y Shiota, T Yamashita, and S Kaneko. Differential gene expression profiles in stage I primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 100(9):2019-2030, 2005.
8. H Ando, S Tsuruoka, H Yamamoto, T Takamura, S Kaneko, and A Fujimura. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase mRNA expression in C57BL/6 mice fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis* 178(2):265-269, 2005.
9. K Kawaguchi, M Honda, T Yamashita, Y Shiota, and S Kaneko. Differential gene alteration among hepatoma cell lines demonstrated by cDNA microarray-based comparative genomic hybridization. *Biochem Biophys Res Commun* 329(1):370-380, 2005.
10. H Iida, M Honda, HF Kawai, T Yamashita, Y Shiota, B-C Wang, H Miao, and S Kaneko. Ephrin-A1 expression contributes to the malignant characteristics of α -fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma. *Gut* 54(6):843-851, 2005.
11. M Matsuda, Y Nakamoto, S Suzuki, T Kurata, and S Kaneko. Interferon-gamma-mediated hepatocarcinogenesis in mice treated with diethylnitrosamine. *Lab Invest* 85: 655-663, 2005.
12. C Fujii, Y Nakamoto, P Lu, K Tsuneyama, BK Popivanova, S Kaneko, and N Mukaida. Aberrant expression of serine/threonine kinase Pim-3 in hepatocellular carcinoma development and its role in the proliferation of human hepatoma cell lines. *Int J Cancer* 114(2):209-218, 2005.
- ⑬ M Honda, T Shimazaki, and S Kaneko. La protein is a potent regulator of replication of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C through internal ribosomal entry site (IRES) directed translation. *Gastroenterology* 128(2):449-462, 2005.
- ⑭ T Yamashita, M Honda, H Takatori, R Nishino, N Hoshino, and S Kaneko. Genome-wide transcriptome mapping analysis identifies organ-specific gene expression patterns along human chromosomes. *Genomics* 84(5):867-875, 2004.

⑨研究成果の発表状況（続き）（この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）、最初と最後のページ、発表年（西暦）、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。）

15. K Kitamura, Y Nakamoto, S Kaneko, and N Mukaida. Pivotal roles of interleukin-6 in transmural inflammation in murine T cell transfer colitis. *J Leukoc Biol* 76(6):1111-1117, 2004.
- ⑩ T Takamura, M Sakurai, T Ota, H Ando, M Honda, and S Kaneko. Genes for systemic vascular complications are differentially expressed in the livers of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47(4):638-647, 2004.
17. Y Nakamoto, T Suda, T Momoi, and S Kaneko. Different procarcinogenic potentials of lymphocyte subsets in a transgenic mouse model of chronic hepatitis B. *Cancer Res* 64(9):3326-3333, 2004.
18. T Shimakami, M Hijikata, H Luo, YY Ma, S Kaneko, K Shimotohno, and S Murakami. Effect of interaction between hepatitis C virus NS5A and NS5B on hepatitis C virus RNA replication with the hepatitis C virus replicon. *J Virol* 78(6): 2738-2748, 2004.
19. A Daiba, N Inaba, S Ando, N Kajiyama, H Yatsushashi, H Terasaki, A Ito, M Ogasawara, A Abe, J Yoshioka, K Hayashida, S Kaneko, M Kohara, and S Ito. A low-density cDNA microarray with a unique reference RNA: pattern recognition analysis for IFN efficacy prediction to HCV as a model. *Biochem Biophys Res Co* 315(4): 1088-1096, 2004.
20. U Fuchizaki, H Miyamori, S Kitagawa, and S Kaneko. Radiofrequency ablation for life-threatening ruptured hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 40(2): 354-355, 2004.
21. Y Nakamoto, and S Kaneko. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury. *Curr Mol Med* 3(6): 537-544, 2003.
22. U Fuchizaki, S Kaneko, Y Nakamoto, Y Sugiyama, K Imagawa, M Kikuchi, and K Kobayashi. Synergistic antiviral effect of a combination of mouse interferon-alpha and interferon-gamma on mouse hepatitis virus. *J Med Virol* 69(2): 188-194, 2003.
23. H Nagai, M Emi, Y Terada, M Baba, M Shimizu, N Konishi, S Kaneko, K Kobayashi, Y Yumoto, M Ghazizadeh, O Kawanami, K Matsubara. DNA alterations during multi-step development of human hepatocellular carcinomas revealed by laser capture microdissection. *Hepatol Res* 26(3): 199-208, 2003.
24. P Lu, Y Nakamoto, Y Nemoto-Sasaki, C Fujii, H Wang, M Hayashi, Y Ohmoto, S Kaneko, K Kobayashi, and N Mukaida. Potential interaction between CCR1 and its ligand, CCL3, induced by endogenously produced interleukin-1 in human hepatomas. *Am J Pathol* 162(4): 1249-1258, 2003.
25. K Masutomi, EY Yu, S Khurts, I Ben-Porath, JL Currier, GB Metz, MW Brooks, S Kaneko, S Murakami, JA DeCaprio, RA Weinberg, SA Stewart, and WC Hahn. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114(2): 241-253, 2003.
26. S Kaneko, and K Kobayashi. Clinical application of a DNA chip in the field of liver diseases. *J Gastroenterol* 38 (Suppl XV): 85-88, 2003.
27. K Kawaguchi, S Kaneko, M Honda, H Kawai, Y Shiota, and K Kobayashi. Detection of hepatitis B virus DNA in serum from patients with chronic hepatitis B using a DNA microarray method. *J Clin Microbiol* 41(4): 1701-1704, 2003.

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

28. Y Nakamoto, S Kaneko, H Takizawa, Y Kikumoto, M Takano, Y Himeda, and K Kobayashi. Analysis of the CD8-positive T cell response in Japanese patients with chronic hepatitis C using HLA-A*2402 peptide tetramers. *J Med Virol* 70(1): 51-61, 2003.
29. M Hirano, S Kaneko, T Yamashita, H Lou, W Qin, Y Shiota, T Nomura, K Kobayashi, and S Murakami. Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J Biol Chem* 278(7): 5109-5115, 2003.
30. Y Nakamoto, S Kaneko, H Fan, T Momoi, H Tsutsui, K Nakanichi, K Kobayashi, and T Suda. Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy. *J Exp Med* 196(8): 1105-1111, 2002.
31. K Masutomi, S Kaneko, M Yasukawa, K Arai, S Murakami, and K Kobayashi. Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 21(38): 5946-5950, 2002.
32. Y Shiota, H Luo, W Qin, S Kaneko, T Yamashita, K Kobayashi, and S Murakami. Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem* 277(13): 11149-11155, 2002.
33. K Minouchi, S Kaneko, and K Kobayashi. Mutation of p53 gene in regenerative nodules in cirrhotic liver. *J Hepatol* 37(2): 231-239, 2002.
34. Y Nakamoto, S Kaneko, and K Kobayashi. Increased susceptibility to apoptosis and attenuated Bcl-2 expression in T lymphocytes and monocytes from patients with advanced chronic hepatitis C. *J Leukocyte Biol* 72(1): 49-55, 2002.
35. K Arai, K Masutomi, S Khurts, S Kaneko, K Kobayashi, and S Murakami. Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) are important for its oligomerization and telomerase activity. *J Biol Chem* 277(10): 8538-8544, 2002.
36. T Shimazaki, M Honda, S Kaneko, and K Kobayashi. Inhibition of internal ribosomal entry site-directed translation of HCV by recombinant IFN- α correlates with a reduced I α protein. *Hepatology* 35(1): 199-208, 2002.
37. Y Nakamoto, S Kaneko, K Kobayashi. Monocyte-dependent cell death of T lymphocyte subsets in chronic hepatitis C. *Immunol Lett* 78(3): 169-174, 2001.
38. T Yamashita, S Kaneko, S Hashimoto, T Sato, S Nagai, N Toyoda, T Suzuki, K Kobayashi, and K Matsushima. Serial analysis of gene expression in chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 282(2): 647-654, 2001.
39. Y Shiota, S Kaneko, M Honda, H F Kawai, and K Kobayashi. Identification of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. *Hepatology* 33(4): 832-840, 2001.
40. M Honda, S Kaneko, H F Kawai, Y Shiota, and K Kobayashi. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 120(4): 955-966, 2001.
41. H F Kawai, S Kaneko, M Honda, Y Shiota, and K Kobayashi. Alpha-fetoprotein-producing hepatoma cell lines share common expression profiles of genes in various categories demonstrated by cDNA microarray analysis. *Hepatology* 33(3): 676-691, 2001.