

20020444

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

ウイルス性慢性疾患の発症に関与する宿主遺伝子の解析

平成 12 年度～14 年度 総合研究報告書

主任研究者 鈴木 哲朗
国立感染症研究所ウイルス第二部

平成 15 (2003) 年 4 月

目次

I 総合研究報告書

ウイルス性慢性疾患の発症に関与する宿主遺伝子の解析----- 1

鈴木哲朗

II 研究成果の刊行に関する一覧表-----14

III 主な研究成果の刊行物・別刷-----25

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総合研究報告書

ウイルス性慢性疾患の発症に関与する宿主遺伝子の解析

主任研究者 鈴木哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨 ウイルス性慢性肝疾患特に C 型肝炎の発症、進展に関わる宿主遺伝子、またインターフェロン（IFN）感受性に関連する宿主遺伝子を同定し、その情報を基に新たな予防法、個々の患者に最適な治療法を提供することを目的とし以下の成績を得た。

1 倫理指針に則りインフォームドコンセントのための説明文書及び同意文書を作成し、患者試料の匿名化及び個人情報管理システムを確立した。医学研究倫理委員会の承認を得た後、B 型及び C 型慢性肝疾患患者から検体採取を行った。これまでに収集された 620 検体は感染症研究所に保存され、個人情報は各研究協力施設の管理責任者によって厳格に管理されている。

2 全 HCV 蛋白またはコア蛋白を発現するヒト肝細胞株、及び TG マウスの肝組織を用いた網羅的な遺伝子発現プロファイリングより、HCV 蛋白によって発現が変動する細胞遺伝子を解析した。two-hybrid 法等により HCV コア蛋白と相互作用する細胞因子を検索した。また、分化度の異なる肝癌症例及び非癌組織を用いた分子病理学的解析から、growth factor 関連因子、IFN receptor の発現様式と肝細胞癌の分化度との相関を明らかにした。これらの成績を基に C 型肝炎の発症進展に関連する候補遺伝子として約 100 種類を選抜した。

3 選抜した候補遺伝子群のエクソン及びプロモーター領域の一塩基多型（SNP）について C 型肝炎患者-健常者の相関解析を行っている。これまでに IL1 β プロモーター領域の 2 ケ所の SNP が C 型肝炎の発症に関与する可能性があること、TNF α プロモーター領域において変異の頻度は低いものの、慢性肝炎から肝癌への移行の相対危険度が増加する SNP が存在することを明らかにした。また同時に行っているゲノムワイドスクランニングから、1 番染色体で 2 箇所、2 番染色体で 8 箇所 C 型肝炎の発症と強く連鎖している領域を同定した。

分担研究者

神代正道 久留米大学医学部教授
松浦善治 大阪大学微生物病研究所教授
小池和彦 東京大学医学部助教授
亀岡洋祐 国立感染症研究所遺伝子資源室
主任研究官

東京大学医学部附属病院感染症内科
吉崎佐矢香 国立感染症研究所ウイルス第二部協力研究員

協力研究者

松浦知和 東京慈恵会医科大学講師
森石恆司 大阪大学微生物病研究所助教授
堤 武也 国立感染症研究所ウイルス第二部協力研究員

A 研究目的

我が国における肝臓病の大部分は肝炎ウイルス感染に起因する。B 型肝炎ウイルス（HBV）または C 型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染に起因する慢性肝炎患者は、感染後 10 年から 30 年の経過で 30~40% が肝硬変さらには肝細胞癌へ移行するか、慢性

肝疾患の進行には個人差が大きいことが知られている。感染ウイルス量の違いがその主要な原因となる症例は限られており、宿主細胞側の要因に左右されるケースが数多く存在すると考えられる。国民病ともいえる慢性肝疾患の原因はHBV感染が20～30%、HCV感染が60～70%を占めている。ウイルス慢性肝炎に対する、現在最も有効な治療法はインターフェロン（IFN）療法であるが、効果の期待できるC型肝炎の場合でも著効を示すのは20～30%であり、副作用も問題となっている。また、B型肝炎では、IFN投与によるHBVの完全排除は困難であるとされている。

我が国高齢者の主要な疾患であるウイルス性慢性肝疾患の発症機序を解明することは、適切な予防法、根治的な治療法を開発する上で極めて重要である。本研究では、1) 肝炎ウイルスの持続感染また慢性肝炎から肝硬変、肝細胞癌の発症に関わる宿主遺伝子を同定すること、2) 慢性肝炎、特にC型肝炎におけるIFNの感受性にかかわる宿主遺伝子を同定すること、を目的とする。

B 研究方法

(1) HCV 発現培養細胞を用いた遺伝子発現プロファイリング

human EF1a プロモーター支配下でHCV全蛋白を発現するヒト肝癌細胞株Hep394、及びEcdysone-Inducible Expression Systemを用いてHCVコア蛋白を誘導発現するヒト肝癌細胞株Hep191を樹立した。HCV発現細胞、非発現細胞よりISOGEN試薬を用いてトータルRNAを抽出し、さらにOligotex-dT30 mRNA purification kitによりpoly(A) RNAを調製した。逆転写反応の際、Cy3-dUTPあるいはCy5-dUTPを取り込ませプローブを作製した。ヒト2304遺伝子からなるマイクロアレイスライドとハイブリタイズさせ

た後、スライドスキャナーでスキャンし蛍光強度を定量した。

(2) HCV コア蛋白結合因子の解析

HCV コア蛋白と結合する因子を yeast two-hybrid 法でスクリーニングした。コア結合蛋白質N末端から173個のアミノ酸をコートする遺伝子をpGBKT7に組み込み、これを餌蛋白質 (bait) として用いて、pACT2で作製したヒト肝臓 cDNA ライブラリーおよびヒト胎児脳 cDNA ライブラリーからプロトコールにしたかって bait と結合する蛋白質遺伝子の単離をおこなった。得られた因子とコア蛋白との相互作用を免疫沈降法で解析した。コア蛋白の細胞内局在をタイムラプス顕微鏡を使って経時的に観察した。

(3) HCV コア蛋白トランスジェニック(TG) マウスを用いた遺伝子発現プロファイリング

2ヶ月齢のオスのTGマウス及びその littermate であるオスの non-TG マウスを sacrifice し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓より全 RNA を抽出しさらに mRNA を選別した。約8000クローンのマウス遺伝子を含む Gene Expression Microarray を用いてマイクロアレイ解析を行った。発現に差の認められた遺伝子群について RNA トットプロット、RT-PCR または TaqMan PCR 法で確認した。エタノール摂取の影響の検討は、エタノール食を三週間与えた TG マウス、ならびに同じ食事を与えた non-TG マウス各二匹を用いて行った。

(4) コア蛋白が細胞内シグナル伝達系へ及ぼす影響

転写因子の活性の検討は、マウス肝臓より核蛋白を抽出し、³²Pでラベルした各転写因子の認識配列を含んだオリゴ DNA を

用いて、ゲルシフト法により行った。MAPK assay は、市販のキットを用いて行った。IKK の活性については、大腸菌から発現精製した GST-I κ B- β を基質として、肝臓のライセートから anti-IKK 抗体により免疫沈降法で回収した IKK により in vitro kinase assay を行った。

(5) IFN 誘導性アポトーシス関連因子の発現と機能解析

I 型 IFN レセプター AR-2 鎖の発現を RT-PCR 法、及び免疫組織学的手法で解析した。TUNNEL 法で染色後 flowcytometry を使用してアポトーシスの定量を行った。種々の caspase 活性は蛍光キットを用いて測定し、遺伝子発現は multiplex PCR kit による RT-PCR 法で検出した。ミトコンドリア内アポトーシス関連因子の発現は western blotting で解析した。

(6) 患者検体を用いた遺伝子多型解析

培養細胞、TG マウスの遺伝子発現プロファイリングなどから選択された、HCV 蛋白によって発現誘導される遺伝子群についてエクソン及びプロモーター領域の一塩基多型(SNP)解析を直接シーケンシングにより行った。また、TaqMan ケミストリを利用した配列検出系でケノムワイトの SNP 解析を開始した。1 番染色体から 5 MB 間隔で 46 個、2 番染色体から同様に 50 個の SNP サイトを選択し解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し当該試験研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセ

ントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。

C 結果

HCV 蛋白を発現する培養肝細胞、TG マウス及び患者組織を用いた肝疾患関連遺伝子の探索

(1) HCV 発現培養細胞を用いた疾患関連遺伝子の探索

HCV 全蛋白を持続的に発現する細胞株 Hep394 は、少なくとも 3 ヶ月以上、HCV 蛋白を安定に産生、プロセスすることを確認した。Hep394 細胞及び対照細胞株を用いて cDNA マイクロアレイ法による遺伝子発現解析を行い、さらに RT-PCR 法により確認し、発現が亢進する遺伝子を 17 種類、低下する遺伝子を 5 種類同定した。細胞増殖に関わる遺伝子としては、forkhead 転写因子、RNA 結合蛋白、Ras suppressor が up-regulate し、Rb-associated protein が down-regulate していた。また、形質転換能など細胞環境への影響が知られ、HCV の病原性の主要因子と考えられるコア蛋白を誘導発現する肝癌細胞株 Hep191 を樹立し、同様にマイクロアレイ解析を行った。発現が 2 倍以上上昇または低下する遺伝子 20 種類を同定した。この中には、アポトーシス関連遺伝子、RNA/蛋白代謝関連遺伝子、シグナル伝達系遺伝子などが含まれていた。これらの発現変化から、Hep191 細胞ではコア蛋白の発現により抗アポトーシス状態がおこっている可能性が考えられた。実際 Hep191 細胞では、抗 Fas 抗体または TNF α で誘導される細胞 DNA の断片化が抑制され、caspase 3 活性が低下していることがわかった。

一方、コア蛋白と細胞蛋白との相互作用を two-hybrid 法、免疫沈降法、pull-down 法などで解析し、コア蛋白と RXR α 、proteasome subunit PA28 γ との細胞内結

合とそれによる転写調節等への影響を明らかにした。また経時的な細胞内局在観察などから、PA28 γ がコア蛋白の細胞内安定性および核局在に関与することを見出した。

(2) HCV TG マウスを用いた遺伝子発現プロファイリング

HCV コア遺伝子 TG マウス及びその littermate の肝組織を用いてサブトラクション及びマイクロアレイ解析を行い、発現の変化する遺伝子を計 60 種類同定した。その中には、転写因子、翻訳開始因子、サイトカインなど細胞増殖に関連する遺伝子が 10 種類含まれ、また脂質代謝調節に関わる遺伝子が 18 種類認められた。TG マウスでは TNF α 、IL1 β の発現上昇が認められたので、これらのサイトカインで調節される細胞内シグナル伝達系の解析を行った。JNK の活性上昇とそれに伴う AP1 の活性化を明らかにした。一方、p38 MAPK, ERK, IKK などの kinase 活性、及びその下流の転写因子 (ATF-2, Elk-1, NF- κ B) の活性には変化が認められなかった。

エタノール含有食を与えた TG マウスについても肝臓における遺伝子発現変化を同様に解析した。エタノール食マウスで発現が増加している遺伝子には細胞増殖に関わる galectin-1 が、低下している遺伝子には metallothionein, GST-M1B, GST-P1 などの antioxidant 遺伝子が含まれていた。アルコール摂取による C 型肝炎患者の病体悪化は臨床的によく知られているか、今回の成績はその分子機序を解明する手かかりになりうると期待される。

(3) 肝癌組織および肝癌細胞株での遺伝子発現様式の病理学的解析

肝細胞増殖および肝発癌に関与すると考えられる増殖因子群の発現を肝細胞癌および非癌部組織について病理学的に解析した。

分化度の異なる種々の肝癌症例を用いた解析から、肝細胞癌における TGF- α 、EGF receptor および VEGF の発現の増加は発癌の比較的早期のイベントであることを示した。引き続き、同様の研究材料を用いて IFN- α レセプターの発現、IFN- α の細胞増殖抑制作用を検討した。その結果、IFN- α の作用発現に重要な I 型 IFN レセプター AR-2 鎖の発現が肝細胞癌症例ではらつきがあること、IFN- α が、肝癌細胞株に対しアポトーシスや細胞周期の進行停止などを誘導し直接的に増殖を抑制することを明らかにした。さらに、IFN- α によるアポトーシス誘導の際には、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出と caspase 9 及び 3 の活性化が認められることがわかった。

ヒト遺伝子解析用試料の収集

「ヒトゲノム 遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、インフォームトコンセントのための説明文書及び同意文書をそれぞれ作成した。個人識別情報の匿名化プログラムをつくり、試料収集のためのプロトコルを確立した。各研究実施機関において医学研究倫理委員会に申請し承認された後、ウイルス性肝疾患患者検体の収集を開始した。連結不可能匿名化を行った後、感染症研究所へ移送し遺伝子解析を実施している。これまでに慢性肝疾患患者 620 例、健常者 100 例の検体を収集した。

遺伝子多型解析

HCV コア TG マウスで IL1 β 、TNF α の発現亢進とそれに伴う JNK-AP1 経路の活性化を認められたことから、サイトカイン遺伝子のプロモーター領域について C 型肝炎の発症進行に関与する遺伝子変異の解析を行った。IL1 β についてはプロモーター領域の 2ヶ所の SNP が C 型肝炎発症に関与する可能性が示された。TNF α プロモータ

一領域についても変異の頻度は低いか、慢性肝炎から肝細胞がん移行の相対危険度は増加する傾向が観察され、さらに解析規模を増して、無症候性キャリアを含めて解析を進めることが重要となった。とりわけ IL1 β プロモーター領域の変異に関する知見は C 型肝炎の発症進行機序を解析する上で有用であると考えられる。培養細胞系及び TG マウスを用いた解析から、サイトカイン遺伝子を含め肝疾患関連候補遺伝子約 100 種類を同定した。この成績及び IFN 感受性関連遺伝子に関する知見を踏まえ、データベース検索により約 600 部位の SNP を選択し、現在、疾患/対照群、IFN 著効/無効群の相関解析を行っている。

また、SNP 解析によるゲノムワイドスクリーニングを行うため、5MB 間隔に設定したアレル特異的 SNP 検出プローブを用いて、染色体 1 番および 2 番を走査した。染色体 1 番においては、2 箇所の C 型肝炎発症に関連すると思われる領域を検出した。この領域に存在する遺伝子にはこれまで報告されてきた C 型肝炎に関与すると思われる遺伝子は存在せず、新規関与遺伝子の検出の可能性が示唆された。2 番染色体では P 値 0.03 以下の部位を 8 点検出し C 型肝炎発症に関与する宿主遺伝子が多数存在することが推察された。

D 考察

ウイルス性肝疾患の発症に関連する遺伝子の選択は必ずしも容易ではない。本研究では、HCV 蛋白発現細胞株及び TG マウスを用いて網羅的に遺伝子発現プロファイリング等のスクリーニングを実施し候補遺伝子約 100 種類を同定した。この成績及び IFN 感受性関連遺伝子に関する知見を踏まえ、データベース検索により約 600 部位の SNP を選択した。また、インフォームト Consent のもと、慢性肝疾患患者 620 例、健常

者 100 例の検体を各臨床情報と共に収集し、TaqMan chemistry を利用したハイスループットな SNP タイピング法も確立した。このように多検体解析を効率良く行う体制は整っており、現在、疾患/対照群、IFN 著効/無効群の相関解析を行っている。最終的には多数の肝疾患関連または IFN 感受性関連 SNP が同定されるものと期待されるか、多変量解析法を利用して複数の SNP 及び臨床情報を組み合わせた発症予測システムを作成し、試験的に治療法のテーラーメイト化を実現することを目指す。

また、肝疾患関連 SNP については、それぞれの遺伝子産物（蛋白）の機能やプロモーター活性に及ぼす影響を培養細胞系で解析する。これによって、肝炎、肝細胞癌、脂質代謝異常の発症の分子メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。

E 結論

(1) 倫理指針に則りインフォームト Consent のもとウイルス性慢性肝疾患患者からの検体収集を行った。これまでに収集された 620 検体は感染症研究所に、個人情報はいは各研究協力施設の管理責任者によって管理されている。

(2) TG マウス 培養細胞系の遺伝子発現プロファイリングから、HCV 蛋白による発現変動を網羅的に解析した。また、two-hybrid 法等により HCV 蛋白と相互作用する細胞因子を検索した。これらの結果、C 型肝炎関連候補遺伝子として約 100 種類の遺伝子を選抜した。

(3) 患者-対照群の相関解析から、IL1 β 、TNF α 遺伝子の両プロモーター領域に C 型肝炎の発症または進行に関連する SNP が存在することが示唆された。またゲノムワイドの SNP スキャンニングから、C 型肝炎の発症と強く連鎖している領域を 1 番染色体で 2 箇所、2 番染色体では染色体全体に渡

って8箇所明らかにした。

F 研究発表

1 論文発表

- 1 Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver *Hepatology* 37 665-673 (2003)
- 2 Otsuka M, Aizaki H, Kato N, Suzuki T, Miyamura T, Omata M, and Seki N Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses *Biochem Biophys Res Commun* 300 443-447 (2003)
- 3 Suzuki T, Aizaki H, Tsutsumi T, Suzuki R, and Miyamura T Possible pathogenic roles of hepatitis C virus proteins *In Animal Frontier Sciences* 253-259 (2003)
- 4 Aizaki H, Otsuka M, Matsuda M, Li Y W, Harada T, Kawakami H, Seki N, Matsuura Y, Miyamura T and Suzuki T Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame *Hepatology* 36 1431-1438 (2002)
- 5 Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Kimuta S, Koike K, and Miyamura T Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice with transgene for hepatitis C virus core protein *Virology* 304 415-424 (2002)
- 6 Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, Suzuki R, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Matsuura Y, Koike K, and Miyamura T Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor - α modulates its transcriptional activity *Hepatology* 35 937-946 (2002)
- 7 矢野博久, 神代正道 IFNの代謝-抗腫瘍作用 肝胆膵 45 1001-1006, (2002)
- 8 矢野博久, 神代正道 インターフェロンは培養肝癌細胞増殖を抑制する 医学と薬学 47, supplement 69-74, (2002)
- 9 Morishi K, Koura M, and Matsuura Y Induction of Bad-mediated Apoptosis by Sindbis Virus Infection Involvement of Pro-survival Members of the Bcl-2 Family *Virology*, 292 258-271(2002)
- 10 Ishii K, Ueda Y, Matsuo K, Matsuura Y, Kitamura T, Kato K, Izumi Y, Someya K, Ohsu T, Honda M, and Miyamura T Structural analysis of vaccinia virus DIs strain Application as a new replication-deficient viral vector *Virology*, 302 433-444 (2002)
- 11 Burioni R, Matsuura Y, Mancini N, Tani H, Miyamura T, Varaldo P E, and Clementi M Diverging effects of human recombinant anti-hepatitis C virus (HCV) antibody fragments derived from a single patient on the infectivity of a vesicular stomatitis virus/HCV pseudotype *J Virol*, 76 11775-11779 (2002)

- 12 Dubourdeau M , Miyamura T , Matsuura Y , Alric L , Pipy B , and Rousseau D Infection of HepG2 cells with recombinant adenovirus encoding the HCV core protein induces p21^{waf1} down-regulation, effect of transforming growth factor β *J of Hepatology*, 37 486-492 (2002)
- 13 Miyamura T and Matsuura Y Virus-cell interaction during initial stage of hepatitis C virus infection *In Viral Hepatitis and Liver Disease* (Margolis H S , Alter M J , Liang T J , and Dienstag J L ed) International Medical Press, Atlanta, 289-293 (2002)
- 14 Matsui M , Moriya O , Abdel-Aziz N , Matsuura Y , Miyamura T , and Akatsuka T Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus *Vaccine*, 21 211-220 (2002)
- 15 Fukuta M , Watanabe T , Noritake J , Nakagawa M , Yamaga M , Matsuura Y , Iwamatsu A , Perez F , and Kaibuchi K Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170 *Cell*, 109 837-885 (2002)
- 16 Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K Role of hepatitis viruses in hepatocarcinogenesis *Oncology* 62 29-37, (2002)
- 17 Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, Topilco, Samson-Bouna M-E, Chretien Y, Pessayre D, Koike K, Chapman J, Barba G, Brechot C Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion a model of viral-related steatosis *FASEB J* 16 185-194, (2002)
- 18 Koike K Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis *J Gastroenterol* 37 55-64, (2002)
- 19 Koike K, Moriya K, Kimura S Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma Transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis *J Gastroenterol Hepatol* 17 394-400, (2002)
- 20 Koike K Remission of breakthrough hepatitis in chronic hepatitis B patients on lamivudine *J Gastroenterol* 37 988-990 (2002)
- 21 Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S, Koike K, Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Hino K HBV DNA in serum of HBsAg-negative, anti-HBc-positive blood donors *Transfusion* 42 1616-1617, (2002)
- 22 Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Iino S, Kimura S, Koike K Serum Lipid Profile of Patients with Genotype 1b Hepatitis C Viral Infection in Japan *Hepatol Res* in press
- 23 Arai T Y, Kuzmin V I, Kameoka Y, Botvinkin D A Identification of a new lyssavirus genotype from the

- lesser mouse-eared bat (*Myotis blythi*) in Kyrgyzstan *Emerging Infectious Diseases*, in press
- 24 Ichimori K, Fukuyama N, Nakazawa H, Aratani Y, Koyama H, Takizawa S, Kameoka Y, Ishida-Okawara A, Kohi F, Suzuki K Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice *Free Radical Research*, in press
- 25 Takahashi I, Kameoka Y, Hashimoto K MacroH2A1 2 binds the nuclear protein Spop *Biochim Biophys Acta* 1591 63-8 (2002)
- 26 Sugiyama, H , Morishima, Y , Kameoka, Y and Kawanaka, M Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage *Molecular and Cellular Probes*, in press,
- 27 Suzuki, R , Tamura, K , Li, J , Ishii, K , Matsuura, Y , Miyamura, T and Suzuki, T Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at it's carboxyl terminus *Virology* 280 301-309 (2001)
- 28 Suzuki, T The ubiquitin system and oocyte maturation *In Reproductive Biotechnology*53-57 (2001)
- 29 相崎英樹 鈴木哲朗 永森静志、宮村 産男 ヒト肝細胞と肝炎ウイルス 細胞 33 418-421 (2001)
- 30 Ogasawara, S , Yano, H , Higaki, K , Takayama, A , Akiba, J , Shiota, K and Kojiro, M Expression of angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in human biliary tract carcinoma cell lines *Hepatol Res* 20 97-113 (2001)
- 31 Akiba, J , Yano, H , Ogasawara, S , Higaki, K and Kojiro, M Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma *Int J Oncol* 18 257-264 (2001)
- 32 Takayama, A , Yano, H , Ogasawara, S , Higaki, K and Kojiro M Expression of Hu-IFN- α 2 chain of type I interferon receptor in human hepatocellular carcinoma and non-cancerous tissues *Int J Molecular Med* 6 621-627 (2000)
- 33 Tani H, Nishijima M, Ushijima H, Miyamura T, Matsuura Y Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection *Virology* 279 343-53 (2001)
- 34 Okuma K, Matsuura Y, Tatsuo H, Inagaki Y, Nakamura M, Yamamoto N, Yanagi Y Analysis of the molecules involved in human T-cell leukaemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoproteins *J Gen Virol* 82 821-30 (2001)
- 35 Urbani S, Uggeri J, Matsuura Y, Miyamura T Penna A, Boni C, Ferrari C Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV

- antigens *Hepatology* 33 1533-43 (2001)
- 36 Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, Ishii K, Moriishi K, Robison CS, Whitt MA, Miyamura T Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins *Virology* 286 263-75 (2001)
- 37 Hirayama M, Maruyama T, Mitsui H, Maekawa H, Yamada H, Hashimoto N, Koike K, Kimura S, Yasuda K, Ino S, Green J IgG1 anti-P2 as a marker of response to interferon in patients with chronic hepatitis C *Clin Exp Immunol* 126 92-100 (2001)
- 38 Moriya, K , Nakagawa, K , Santa, T , Shintani, Y , Fujie, H , Miyoshi, H, Tsutsumi, T , Miyazawa, T , Ishibashi, K , Horie, T , Imai, K , Miyamura, T , Kimura, S , and Koike, K Oxidative stress in the absence of inflammation in the liver of a mouse model for hepatitis C virus -associated hepatocellular carcinoma *Cancer Res* 61 4365-4370 (2001)
- 39 Yotsuyanagi, H , Yasuda, K , Shintani, Y , Moriya, K , Fujie, H , Tsutsumi, T , Nojiri, N , Juji, T , Hoshino, H , Shimoda, K , Hino, K , Ino, S , and Koike, K Frequent presence of hepatitis B virus in the sera from HBs antigen-negative, anti-HBc-positive blood donors *Transfusion* 9 1093-1099 (2001)
- 40 Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K Frequent β -catenin aberration in human hepatocellular carcinoma *Hepatol Res* 20 39-51 (2001)
- 41 Arai Y T , Takahashi H , Kameoka Y, Shino T , Wimalaratne O , Lodmell D L Characterization of Sri Lanka rabies virus isolates using nucleotide sequence analysis of nucleoprotein gene *Acta Virologica* in press (2002)
- 42 Funatsuki, K , Hashido, K , Matsunami, M , Kameoka, Y , Iwabuchi, K , Tsukeda, H , Tsuchida, K , Takada, N , Nakajima, Y , and Maekawa H Rapid identification of *Bombyx mori* cells using PCR amplification following a direct procedure for genomic DNA preparation *J Insect Biotech Sericol* 70 129-136 (2001)
- 43 Yagita K, Izumiyama S, Tachibana Y, Masuda G, Iseki M, Furuya K, Kameoka, Y , Kuroki, T , and Endo, T Molecular-characterization of cryptosporidium isolates obtained from human and bovine infections in Japan *Parasitol Res* 87 950-5 (2001)
- 44 杉山 広、川中正憲、亀岡洋祐、金子隆幸、上村晋一、原田洋明、組織標本の肺吸虫卵を用いた塩基配列解読による虫種同定の試み、日本臨床寄生虫学会誌 12 153-156 (2001)
- 45 杉山 広、川中正憲、亀岡洋祐、金子隆幸、上村晋一、原田洋明、肺切除により診断を得た肺吸虫症 患者肺組織標本の虫嚢内虫体を材料とした塩基配列解読による虫種同定の試み、日本臨床寄生虫学会誌 12 59-62 (2001)

- 46 Tanaka, Y , Shimoike, T , Ishii, K , Suzuki, R , Suzuki, T , Ushijima, H , Matsuura Y , and Miyamura, T Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome *Virology* 270 229-236 (2000)
- 47 Takikawa, S , Ishii, K , Aizaki, H , Suzuki, T , Asakura, H , Matsuura, Y , and Miyamura, T Cell fusion activity of HCV envelope proteins *J Virol* 74 5066-5074 (2000)
- 48 Aizaki H , Saito S , Ogino T , Miyajima N Harada T , Matsuura Y , Miyamura T , and Kohase M Suppression of interferon-induced antiviral activity in cells expressing hepatitis C virus proteins *J Interferon Cytokine Res* , 20 1111-1120 (2000)
- 49 Ikeda S , Kishida M , Matsuura Y , Usui H , and Kikuchi A GSK-3 β -dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by β -catenin and protein phosphatase 2A complexed with axin *Oncogene*, 19 537-545 (2000)
- 50 Utama A , Shimizu H , Hasebe F , Morita K , Igarashi A , Shoji I, Matsuura Y , Hatsu M, Takamizawa K , Hagiwara A , and Miyamura T Role of the DExH motif of the Japanese encephalitis virus and hepatitis C virus NS3 proteins in the ATPase and RNA helicase activities *Virology*, 273 316-3249 (2000)
- 51 Kamei A , Tamaki S , Taniyama H Takamura S , Nishimura Y , Kagawa Y , Uno-Furuta S , Kaito M , Kim G , Toda M , Matsuura Y , Miyamura T , Adachi Y , and Yasutomi Y Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid *Virology*, 273 120-126 (2000)
- 52 Tatsuo H , Okuma K , Tanaka K , Ono N , Minagawa H , Takeda A , Matsuura Y , and Yanagi Y Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins *J Virol* , 74, 4139-4145 (2000)
- 53 Mori Y , Dhepakson P , Shimamoto T , Ueda K , Gomi Y , Tani H , Matsuura Y , and Yamanishi K Expression of Human Herpesvirus 6B rep within Infected Cells and Binding of Its Gene Product to the TATA-Binding Protein In Vitro and In Vivo *J Virol* , 74, 6096-6104 (2000)
- 54 Rin Yamaguchi, Hirohisa Yano, Yutaka Nakashima, Sachiko Ogasawara, Koichi Higaki, Jun Akiba, Daniel J Hicklin and Masamichi Kojuro
- 55 Expression and localization of vascular endothelial growth factor receptors in human hepatocellular carcinoma and non-HCC tissues *Oncology reports* 2000 725-729 (2000)
- 56 Tohru Hisaka, Hirohisa Yano,

- Makoto Haramaki, Itaru Utsunomiya, and Masamichi Kojiro
Expression of epidermal growth factor family and its receptor in hepatocellular carcinoma cell lines
Relationship to cell proliferation
International Journal of Oncology 14 453-460 (1999)
- 57 Moriya K, Todoroki T, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Miyoshi H, Ishibashi K, Takayama T, Makuuchi M, Watanabe K, Miyamura T, Kimura S, Koike K Increase in the concentration of carbon 18 monounsaturated fatty acids in the liver with hepatitis C analysis in transgenic mice and humans
Biochem Biophys Res Commun 281 1207-1212 (2001)
- 58 Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Takayama T, Makuuchi M, Kimura S, Koike K The significance of hepatitis B virus DNA detected in hepatocellular carcinoma of patients with hepatitis C
Cancer 88 2478-2486 (2000)
- 59 Yotsuyanagi H, Shintani Y, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Kato T, Nishioka K, Takayama T, Makuuchi M, Ino S, Kimura S, Koike K Virologic analysis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan frequent involvement of hepatitis B virus
J Infect Dis 181 1920-1928 (2000)
- 60 Maruyama T, Mitsui H, Maekawa H, Yamada H, Hirayama M, Ino S, Yasuda K, Koike K, Kimura S, Milich DR Emergence of the precore mutant late in chronic hepatitis B infection correlates with the severity of liver injury and mutations in the core region
Am J Gastroenterol 95 2894-2904 (2000)
- 61 Fujie H, Moriya K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Ino S, Kimura S, Koike K Hepatitis B virus Genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan
Gastroenterology 120 1564-1565 (2001)
- 62 Koike K Hepatitis viruses update
Internal Medicine 40 173-175 (2001)
- 63 Kameoka Y, Yamagoe S, Hatano Y, Kasama T, Suzuki K Val58Ile polymorphism of the neutrophil chemoattractant LECT2 and rheumatoid arthritis in the Japanese population
Arthritis Rheum 43 1419-20 (2000)
- 64 Murase T, Kameoka Y, Suzuki R, Yamai S Variation in sic gene encoding complement-inhibiting protein of *Streptococcus pyogenes* serotype M1 isolates in Japan
Curr Microbiol 41 106-8 (2000)
- 2 学会発表
- 1 Suzuki, T, Suzuki, R, Matsuura, Y, and Miyamura, T Molecular Determinants for the Subcellular Localization of HCV Core Protein
The 24th Joint Meeting of the United States-Japan Hepatitis Panels, Tokyo, 2003
- 2 Aizaki H, Suzuki T, Matsuda M, Murakami K, Ishii K, Nagamori S, Kawakami H, Ishiko H, Kawada M,

- Matsuura T , Hasumura S ,
Matsuura Y , and Miyamura T
Production and release of infectious
HCV particles from persistently
infected human liver cell cultures
transfected with full length-HCV
RNA 9th International Meeting on
HCV and Related Viruses, San
Diego, USA, July 7-11, 2002
- 3 Sasano, T , Shimoike, T , Matsuura,
Y , Miyamura, T , and Suzuki, T
Characteristic bases in HCV 5'UTR
among genotypes identified by
principal component and
multidimensional scaling analyses
 - 4 Suzuki R , Sakamoto, S , Tsutsumi,
T , Rikimaru, A , Shimoike, T ,
Machida, S , Matsuura, Y ,
Miyamura, T , and Suzuki, T
Molecular determinants for the
subcellular localization of HCV core
protein
 - 5 Morishi, K , Okabayashi, T , Nakai,
K , Moriya, K , Koike, K , Murata, S ,
Chiba, T , Tanaka, K , Suzuki R ,
Suzuki, T , Miyamura, T , and
Matsuura, Y Nuclear localization of
HCV core protein through
PA28gamma-dependent pathway
 - 6 Tsutsumi, T , Matsuda M , Moriya,
K , Miyoshi, H , Fujie, H , Shintani,
Y , Koike, K , Suzuki, T , and
Miyamura, T Proteomics analysis of
mitochondrial proteins in the liver
of the hepatitis C virus core-
transgenic mouse and hepG2 cells
expressing the core protein
 - 7 堤武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、新谷良
澄、藤江肇、三好秀征、松浦善治 小
池和彦、宮村達男 C型肝炎ウイルス
コア遺伝子トランスジェニックマウス
の肝臓内における mitogen-activated
protein kinase の活性化の検討 第38
回日本肝臓学会総会、2002年6月、大
阪
 - 8 堤 武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、新谷
良澄、藤江 肇、三好秀征、松浦善治、
小池和彦、宮村達男 C型肝炎ウイル
スコア遺伝子トランスジェニックマウ
スの肝臓内における MAPK の活性化
の検討 第61回日本癌学会総会 2002
年10月、東京
 - 9 町出早苗、石井孝司、鈴木亮介、赤塚
俊隆、鈴木哲朗、宮村達男 弱毒ワク
シニアウイルス DIs を用いたC型肝炎
ウイルス構造蛋白の発現 第50回日本
ウイルス学会総会 2002年10月、札
幌
 - 10 村上恭了、染谷友美、根岸英雄、石井
孝司、岩堀 徹、相崎英樹、鈴木哲朗、
宮村達男 HCV レプリコン活性に関与
する宿主因子の検索 同上
 - 11 鈴木亮介、坂本真一郎、堤 武也、下
池貴志、松浦善治、宮村達男、鈴木哲
朗 C型肝炎ウイルスコア蛋白質の細
胞内局在を規定するシグナルの解析
同上
 - 12 堤 武也、松田麻未、森屋恭爾、三好
秀征、藤江 肇、新谷良澄、小池和彦、
鈴木哲朗、宮村達男 C型肝炎ウイル
スコア蛋白発現細胞におけるミトコン
トリア蛋白のプロテオミクス解析 同
上
 - 13 森石恒司、中井康介、鈴木亮介、鈴木
哲朗、宮村達男 松浦善治 PA28 γ に
よるC型肝炎ウイルスコアタンパク質
の核局在と核移行 第25回日本分子生
物学会 2002年12月、横浜
 - 14 亀岡洋祐、Persad Amanda、小池和
彦 堤 武也、松浦知和、須藤 勉、

井出達也、田中一雄、佐田通夫、日野
邦彦、神代正道、橋本雄之、宮村達男、
鈴木哲朗 C型肝炎ウイルス感染を制
御する宿主遺伝要因の探索 同上

G 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

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
Suzuki T, Aizaki H, Tsutsumi T, Suzuki R, and Miyamura T	Possible pathogenic roles of hepatitis C virus proteins	Sato E, Miyamoto H, and Manabe N	Animal Frontier Sciences	Hokuto Shobo	Kyoto	2003	253-259
Miyamura T and Matsuura Y	Virus-cell interaction during initial stage of hepatitis C virus infection	Margolis H S, Alter M J, Liang T J and Dienstag J L	Viral Hepatitis and Liver Disease	International Medical Press	Atlanta,	2002	289-293
T Suzuki	The ubiquitin system and oocyte maturation	Miyamoto H, and Manabe N	Reproductive Biotechnology	Hokuto Shobo	Kyoto	2002	53-57

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Ino S, Kimura S, Koike K	Serum Lipid Profile of Patients with Genotype 1b Hepatitis C Viral Infection in Japan	Hepatology Res		in press	
Arai T, Y. Kuzmin VI, Kameoka Y, Botvinkin D A	Identification of a new lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (<i>Myotis blythi</i>) in Kyrgyzstan	Emerging Infectious Diseases		in press	

Sugiyama, H , Morishima, Y , Kameoka, Y and Kawanaka, M	Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular discrimination between <i>Paragonimus westermani</i> and <i>P. miyazakii</i> at the metacercarial stage	Molecular and Cellular Probes		in press	
Ichimori K, Fukuyama N, Nakazawa H, Aratani Y, Koyama H, Takizawa S, Kameoka Y, Ishida-Okawara A, Kohi F, Suzuki K	Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase- deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice	Free Radical Research		in press	
Otsuka M , Aizaki H , Kato N , Suzuki T , Miyamura T , Omata M , Seki N	Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses	Biochem Biophys Res Commun	300	443-447	2003
Iwahori T, Matsuura T, Maehashi H, Sugo K, Saito M, Hosokawa M, Chiba K, Masaki T, Aizaki H, Ohkawa K, Suzuki T	CYP3A4 inducible model for in vitro analysis of human drug metabolism using a bioartificial liver	Hepatology	37	665-673	2003
Tsutsumi T , Suzuki T , Shimoike T , Suzuki R , Moriya K , Shintani Y , Fuji H , Matsuura Y , Koike K , Miyamura T	Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor - α modulates its transcriptional activity	Hepatology	35	937-946	2002

Aizaki H , Otsuka M , Matsuda M Li YW Harada T , Kawakami H , Seki N , Matsuura Y , Miyamura T Suzuki T	Expression profiling of liver cell lines expressing entire or parts of hepatitis C virus open reading frame	Hepatology	36	1431-1438	2002
Tsutsumi T , Suzuki T , Moriya K , Yotsuyanagi H , Shintani Y Fujie H , Matsuura Y , Kimuta S Koike K , Miyamura T	Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice with transgene for hepatitis C virus core protein	Virology	304	415-424	2002
矢野博久, 神代正道	IFN の代謝-抗腫瘍作用	肝胆膵	45	1001-1006	2002
矢野博久 神代正道	インターフェロンは培養肝癌細胞増殖を抑制する	医学と薬学	47 supplement	69-74	2002
Morishi K Koura M , and Matsuura Y	Induction of Bad-mediated Apoptosis by Sindbis Virus Infection Involvement of Pro-survival Members of the Bcl-2 Family	Virology	292	258-271	2002
Ishii K , Ueda Y Matsuo K Matsuura Y Kitamura T , Kato K Izumi Y , Someya K , Ohsu T , Honda M , and Miyamura T	Structural analysis of vaccinia virus DIs strain Application as a new replication-deficient viral vector	Virology	302	433-444	2002

Burioni R , Matsuura Y, Mancini N , Tan H , Miyamura T , Varaldo PE , and Clementi M	Diverging effects of human recombinant anti-hepatitis C virus (HCV) antibody fragments derived from a single patient on the infectivity of a vesicular stomatitis virus/HCV pseudotype	J Virol	76	11775- 11779	2002
Dubourdeau M , Miyamura T , Matsuura Y, Alric L , Pipy B , and Rousseau D	Infection of HepG2 cells with recombinant adenovirus encoding the HCV core protein induces p21 ^{waf1} down-regulation, effect of transforming growth factor b	J of Hepatology	37	486-492	2002
Matsui M , Moriya O , Abdel-Aziz N , Matsuura Y , Miyamura T , and Akatsuka T	Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells transduced with replication-defective recombinant adenovirus	Vaccine	21	211-220	2002
Fukuta M , Watanabe T , Noritake J , Nakagawa M , Yamaga M , Matsuura Y , Iwamatsu A , Perez F , and Kaibuchi K	Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170	Cell	109	837-885	2002
Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K	Role of hepatitis viruses in hepatocarcinogenesis	Oncology	62	29-37	2002

Perlemuter G Sabile A, Letteron P, Topilco, Samson-Bouna M- E, Chretien Y Pessayre D Koike K Chapman J, Barba G, Brechot C	Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion a model of viral- related steatosis	FASEB J	16	185-194	2002
Koike K	Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis	J Gastroenterol	37	55-64	2002
Koike K, Moriya K, Kimura S	Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma Transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis	J Gastroenterol Hepatol	17	394-400	2002
Koike K	Remission of breakthrough hepatitis in chronic hepatitis B patients on lamivudine	J Gastroenterol	37	988-990	2002
Yotsuyanagi H, Yasuda K, Ino S, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Kimura S Koike K Nojiri N, Juji T, Hoshino H, Hino K	HBV DNA in serum of HBsAg-negative, anti- HBe-positive blood donors	Transfusion	42	1616-1617	2002
Takahashi I Kameoka Y Hashimoto K	MacroH2A1.2 binds the nuclear protein Spop	Biochim Biophys Acta	1591	63-8	2002