

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）

## 分担研究報告書

## C型肝炎ウイルス培養細胞を用いた研究

分担研究者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）の研究が進まなかった最大の理由は、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたことである。我々が分離したJFH-1株により初めてHCVのウイルス培養が可能となった。しかし、HCVに対する感染感受性のある培養細胞はHuh7細胞のみと考えられている。そこで本研究では、Huh7細胞を様々なソースから取得してその感染感受性の違いを検討する。さらに細胞の培養方法による感染感受性の変化を検討する。

## A. 研究目的

未だに多くのC型肝炎ウイルス（HCV）感染者が世界中に存在する。HCV感染は持続感染化し、肝細胞癌を発症する重大な感染症である。しかし、インターフェロンおよびリバビリンによる治療効果は不十分であり、新たな治療薬開発が望まれる。これまでにHCVの治療薬開発が進まなかつた大きな理由の1つは、培養細胞でウイルスが感染増殖できなかつたためである。LohmannらがCon1株のHCVレプリコンを開発して以来、培養細胞でHCV複製に関する研究が可能となった。しかし、Con1株のHCV全長遺伝子を導入したレプリコンでもウイルス粒子は分泌されなかつた。一方、我々が劇症肝炎患者から分離したJFH-1株は、これまでのHCV株と比較して複製能力が非常に高く、このJFH-1株の合成全長RNAを培養細胞に導入することにより感染性のウイルス粒子を分泌した。これまでの研究ではJFH-1株と肝癌細胞であるHuh7細胞の組み合わせのみでウイルス感染増殖が可能である。

そこで本研究ではJFH-1株を用いてHuh7細胞

の様々なクローンや異なる研究室で維持されているHuh7細胞およびその他の培養細胞を用いて、HCVの感染増殖の違いとそれに関与する因子の同定を試みる。さらに細胞の培養方法による感染感受性の変化を検討する。

## B. 研究方法

## 1. 様々なHuh7細胞および他の細胞の入手

国内外の研究室より異なる性質をもつHuh7細胞およびその他の細胞を入手する。

## 2. 細胞のHCVに対する感染感受性および複製感受性の解析

培養細胞のHCVに対する感染感受性をJFH-1株を用いて作製した感染性ウイルスにより検討する。さらに、JFH-1株のサブジェノミックレプリコンを用いてRNA複製に関する感受性を解析する。

## 3. 細胞の培養条件による感染性の変化

培養液に添加する牛胎児血清の濃度、セレニウム、高脂質アルブミン溶液による感染性の変

化を観察する。さらに牛胎児血清の代わりにヒト血清アルブミンを添加する。

#### 4. ウイルス感染感受性を高める化合物の探索

市販の化合物ライブラリーを用いてHCV感染を増強する因子を探索する。ウイルス感染細胞に約1000種類の化合物を添加してウイルス産生能を検討する。

#### (倫理面への配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付 12文科振第266号 文部科学省研究振興局長通知に則り、当該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、個人情報を厳格に管理保存する。

### C. 研究結果

#### 1. Huh7細胞亜株の樹立とHuh7細胞の入手

従来より維持培養しているHuh7細胞および、Scripps研究所より入手したHuh7-FVC細胞およびHuh7.5.1細胞を解析に用いた。また、ジョージワシントン大学との共同研究により星細胞と初代培養肝細胞の共培養による肝細胞培養を試みた。HepG2細胞およびIMY細胞の感染感受性を解析した。

#### 2. 感染感受性の解析

JFH-1株の全長RNAをHuh7細胞にトランスフェクションして培養上清中に分泌されるHCV粒子を濃縮して感染実験に使用した。我々が維持培養しているHuh7細胞よりもHuh-FVCおよびHuh7.5.1は感染感受性が高いことが明らかとなった。

#### 3. 複製感受性の解析

JFH-1株のサブジェノミックレプリコンを用いて各細胞でのHCV RNA複製効率を解析した。Huh-FVCおよびHuh7.5.1は我々が維持しているHuh7細胞よりも複製効率は低かった。

#### 4. 培養液添加物による感染性の変化

牛胎児血清濃度を0.5%にしてもHuh7細胞の増殖は変化しないが、無血清にすると増殖は悪くなる。しかしウイルス産生量は10%に比べ2%でかなり低下し、1%以下にするとウイルス産生量が半分以下に低下する。牛胎児血清にセレンウムを添加してもウイルス産生量に変化はなかったが、牛胎児血清の代わりに高脂質アルブミンの添加により細胞増殖及びウイルス産生量が同程度見られた。しかし、ヒト血清アルブミンの添加では細胞増殖、ウイルス産生共に低かった。

#### 5. 無血清培養に馴化したHuh7細胞の樹立とそのウイルス感染性

Huh7細胞は無血清にすると細胞増殖清が低下するが血清濃度を徐々に低下させて馴化することにより無血清培地でも培養可能となる。無血清培地に馴化したHuh7細胞のHCV感染感受性は通常のHuh7細胞と変化がないことを確認した。

6. ウイルス感染感受性を高める化合物の探索  
市販のSigma LOPAC1280化合物をHCV感染細胞に添加してウイルス産生量を培養上製中のコア蛋白質濃度により解析した。1008化合物の中で、一次スクリーニングによりウイルス量を増加(Proviral) させる3化合物とウイルス産生を低下(Antiviral) させる4化合物を見いだした。しかしさらに詳細に解析するとProviralの化合物はウイルス産生増強作用は容量依存性がなく、感染細胞の培養条件などにより効果が見えにくくなることが明らかとなった。現在Antiviralに作用した化合物をさらに解析中である。

7. 星細胞と初代培養肝細胞を共培養することにより肝細胞を維持培養することが明らかとなった。維持培養状態の肝細胞にHuh7で作製した感染性HCVを接種し感染が成立するかどうかを観察したが、HCVの感染は成立しなかった。

8. HepG2細胞およびIMY細胞の感染感受性の解析

HepG2細胞およびIMY細胞はともにレプリコンの複製は可能である。そこで感染感受性について解析した。両細胞共にCD81の発現が無いためCD81を強制発現することにより感染感受性となることが明らかとなった。また、全長のレプリコンを導入することで感染性ウイルス粒子を産生する。IMY細胞で産生されたウイルス粒子はしよ糖密度勾配遠心法による解析でHuh7細胞で産生されたウイルス粒子と浮遊密度が異なっていた。

D. 考察

Huh7細胞は肝臓癌由来の培養細胞株でHCVに対する感染感受性を有する。昨年度の研究でCD81がこの感染感受性に重要であることを明らかにした。今年度の研究において、HepG2細胞およびIMY細胞でもCD81の発現が感染感受性に必要であることが明らかとなった。さらに細胞の培養条件により感染感受性が変化することを明らかにした。また、初代培養肝細胞によるウイルス感染を試みたが、感染は成立しなかった。Huh7細胞と宿主因子の発現を比較することにより感染に必須の因子を同定できる可能性がある。また、感染感受性を増強する化合物を見いだすことができれば関与する宿主因子の同定につながることを期待できるためさらにスクリーニングを継続する。

E. 結論

CD81が感染感受性に重要であり、Huh細胞のHCV感染感受性は培養条件により変化することが明らかとなった。感染感受性に関わる宿主因子の同定に向けた研究を継続する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Wakita T. Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system. *Methods Mol Biol.* 2009;510:305-27.
2. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 377(3):747-51.

3. Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2008 89(9):2108-13.
4. Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology*. 2008 48(3):732-40.
5. Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology*. 2008 48(4):1054-61.
6. Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2008 82(19):9639-46.
7. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M. Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatology Res*. 2008 38(9):909-18.
8. Murakami K, Kimura T, Osaki M, Ishii K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Shoji I. Virological characterization of the hepatitis C virus JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol*. 2008 89(7):1587-92.
9. Ebihara T, Shingai M, Matsumoto M, Wakita T, Seya T. Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology*. 2008 Jul;48(1):48-58.
10. Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol*. 2008 82(16):7964-76.
11. Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology*. 2008 376(2):397-407.
12. Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Zhang B, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 371(3):446-50.
13. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*. 2008 47(5):1437-45.
14. Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2008 82(12):5715-24.
- G. 知的所有権の出願・登録状況  
なし

平成20年度厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資する為の日米合作的肝炎ウイルス基礎研究  
(H18-国医-指定-007)

分担研究者：国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター・  
センター長 溝上 雅史

研究協力者：名古屋市立大学 大学院医学研究科 助教 菅内 文中

分担研究課題：肝炎ウイルス組換え遺伝子型の意義

研究要旨：DNAデータバンクに登録されている807本のHBV全塩基配列を用いてHBV組換え遺伝子型(r-HBV)の検索を行なった。12種類のA/D、2種類のA/C、2種類のA/E、1種類のA/G、1種類のA/B/C、2種類のB/C、2種類のC/D、1種類のC/F、1種類のC/G、2種類のU/Cおよび1種類のChimp/Cの合計28種類のr-HBVの存在が明らかとなった。r-HBVの組換え好発領域はS遺伝子のC末端領域とcore遺伝子領域に多い傾向にあった。また、アジア・アフリカ地域の各国、本邦における若年発症B型肝炎がん症例および免疫・化学療法後のHBV再燃例のr-HBVの関与についての検討において、アフリカのコート・ジボアール国から新たなr-HBV A/Eが検出され、ネパール国からはr-HBV C/Dが検出された。若年発症B型肝炎がん症例からは新たなr-HBV A/Cが検出された。HBV再活性化例においてはr-HBVの検出はされなかったが、各HBVクローン間の*in vitro* HBV複製モデルを用いた比較検討では、重症肝炎による死亡例からのHBV株である遺伝子型BかつPC変異陽性クローンで複製がより亢進していた。現在ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いてr-HBVの作成を行い、そのメカニズムとウイルス学的特徴について検討中である。

## 研究目的

HBV(Hepatitis B Virus)遺伝子型は現在までに分子系統樹を基にAからHまでの8型に分類されている。その世界分布には地域特異性が存在し、HBV遺伝子型と臨床像との密接な関連についても報告されている。

近年HBV遺伝子が部分的に異なる遺伝子型に置き換わったHBV組換え遺伝子型(r-HBV)の存在が目ざされ、申請者らもこれまで各種のr-HBVを発見しその臨床的重要性について報告してきた(Sugauchi et al. J Virol 2002; Sugauchi et al. Gastroenterology 2003; Sugauchi et al. Clin Infect Dis 2004)。しかしこれまでに

r-HBVを考慮したHBV遺伝子型分類やその臨床像との関連についての検討は十分ではなく網羅的検討がなされていない。

今回はr-HBVの網羅的検討を行い、その臨床的・ウイルス学的特徴を明らかにする目的で検討を施行した。

## 研究方法

1) 現在までにDNAデータバンクに登録されているHBV全塩基配列株とPCソフトを用いて全r-HBVの検索を行いその種類、組換え好発領域について解析を行う

た。2) r-HBVが分布するアジア・アフリカ地域のHBs抗原陽性の保存血清からHBV塩基配列の決定を行い、系統解析により新たなr-HBVの検索を行った。3) 本邦における若年発症B型肝炎14症例および免疫・化学療法後のHBV再燃4例において、保存血清を用いてHBV塩基配列の決定を行いr-HBVの関与について検討を行った。4) *In vitro* HBV複製モデルを用いて各HBVクローンのウイルス複製効率の測定(サザンブローディング、Real time detection-PCR)、蛋白発現レベル測定(HBs抗原、HBe抗原、コア抗原)を行いウイルス学的特徴の検討をおこなった。

## 研究結果

DNAデータバンクに登録されている807本のHBV全塩基配列株について300bpごとに分子系統樹の作成を行い確実な非組み換え遺伝型株641本を選出して分子系統樹を作成した(図1)。その641本をもとにsub-genotype別を含む各遺伝子型のコンセンサス配列を作成後、残りの166本のHBV全塩基配列に対してSimPlot解析を用いてr-HBV株の検索を行った。SimPlot解析にて合計28種類、150株以上のr-HBVの存在が明らかとなった(表1)。遺伝子型ADの種類が最も多く12種類、30株以上のr-HBVがアフリカ、欧州、インドに分布していた。その他2種類のr-HBV A/C、2種類のr-HBV A/E、1種類のr-HBV A/GおよびA/B/C、アジアに広く分布する100株以上で最多の2種類のr-HBV B/C、北西中国に分布する2種類のr-HBV C/D、1種類のr-HBV C/FおよびC/G、2種類のU/Cおよび1種類のチンパンジーとCのr-HBVが検索された。HBV遺伝子型の組換え好発領域はS遺伝子のC末端領域とコア遺伝子領域で多い傾向にあった。

アジア・アフリカ地域のHBs抗原陽性保存血清を用いてHBVの塩基配列の決定を行いr-HBVの検索によって、遺伝子型AとEが分布するコート・ジボアール国から既存の報告にない新たなr-HBV A/Eが検

出された(図2a)。また遺伝子型CとDが分布するネパール国から既存のG23と同一のr-HBV C/Dが検出された。

治療前HBs抗原陰性で造血器悪性腫瘍に対する治療後にHBV再活性をきたした4例の保存血清よりHBV-DNAを抽出し、r-HBVの検索を行った。また*in vitro* HBV複製モデルを用いてウイルス変異とウイルス複製効率について検討した。HBV 遺伝子型はBjが2例、Ceが2例でありr-HBVの存在は認めなかった。CP(1762/1764)配列は全例が野性株でPC(1896)変異株は1例に認めた。*In vitro* HBV複製モデルを用いた再活性化例の各HBVクローン間の比較検討では、重症肝炎による死亡例の遺伝子型BかつPC変異陽性例のHBVクローンで複製がより亢進していた(図3)。

40歳以下で発症した肝細胞癌14症例を対象として保存血清よりHBV-DNAを抽出しHBVの全塩基配列の決定を行いr-HBVの検索をおこなった。14症例の平均年齢は29.6±6.1歳(18~38)で男女比は10:4。HBe抗原陽性率は50%(7)であった。HBV全塩基配列を用いた系統樹解析では遺伝子型Ae、Ba(組み換え遺伝子型B/C)、Ceがそれぞれ1、1、11例に認められ、残りの1例はSimPlotプログラム解析から2814番から1573番の塩基配列は遺伝子型Aeに分類され、1574番から2813番の塩基配列は遺伝子型Ceに分類される既存の報告にない新たなr-HBV Ae/Ceであった(図2b)。PreS領域において欠損変異が64%に認められ、PreS1とPreS2領域の欠損変異はそれぞれ35%と43%に認められた。X遺伝子のEnhancer II領域のC1653T変異は29%に認められた。コアプロモーター領域のA1762T/G1764A変異は79%に認められた。プレコアスタートコドン上流のKozak塩基配列GCACCは13例において野生株であったがr-HBV Ae/Ce症例においてはGTATC変異が認められた。プレコアのG1896A変異株は21%、野生株は57%、混在株は21%に認められた。本邦における40歳以下のHBV関連肝細胞癌発症例では遺伝子型Ceが80%を占

めていたが14%の症例にr-HBVが検出されそのうちの1例は新たなr-HBV Ae/Ce であり、若年の慢性HBVキャリアーからの肝細胞癌発症においてはPreS領域の欠損変異とコアプロモーター変異との関連とともにr-HBVについても考慮する必要があると考えられた。

現在ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて各HBV遺伝子型クローンの重複感染にて人工的なr-HBVの作成を行い、そのメカニズムとウイルス学的特徴について検討中である。

## 結論

今回の検討で検出された2種類の新たなr-HBVを含む合計28種類のr-HBVの存在が明らかとなった。その世界分布には地域特異性が存在した。r-HBVの臨床的意義についてはさらに検討を進める必要がある。現在ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いてr-HBVのメカニズムとウイルス学的特徴について検討中である。

## 研究発表

### 論文発表

- 1: Kurbanov F, Tanaka Y, Chub E, Maruyama I, Azlarova A, Kamitsukasa H, Ohno T, Bonetto S, Moreau I, Fanning LJ, Legrand-Abravanel F, Izopet J, Naoumov N, Shimada T, Netesov S, Mizokami M. Molecular epidemiology and interferon susceptibility of the natural recombinant hepatitis C virus strain RF1\_2k/1b. *J Infect Dis*. 198:1448-56. 2008.
- 2: Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol*. 82:8241-2. 2008.
- 3: Trinks J, Cuestas ML, Tanaka Y, Mathet VL, Minassian ML, Rivero CW, Benetucci JA, Gimenez ED, Segura M, Bobillo MC, Corach D, Ghiringhelli PD, Sánchez DO, Avila MM, Peralta LA, Kurbanov F, Weissenbacher MC, Simmonds P, Mizokami M, Oubiña JR. Two simultaneous hepatitis B virus epidemics among injecting drug users and men who have sex with men in Buenos Aires, Argentina: characterization of the first D/A recombinant from the American continent. *J Viral Hepat*. 15:827-38. 2008.

- 1: Tanaka Y, Sanchez LV, Sugiyama M, Sakamoto T, Kurbanov F, Tatematsu K, Roman S, Takahashi S, Shirai T, Panduro A, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in chimeric mice carrying human hepatocytes. *Virology*. 376:408-15. 2008.
- 5: Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, Oynsuren T, Mizokami M. Virological and clinical implication of core promoter C1752/V1753 and T1764/G1766 mutations in hepatitis B virus genotype D infection in Mongolia. *J Gastroenterol Hepatol*. 23:474-81. 2008.

### 学会発表

1. Sugauchi E, Tanaka Y, Sakamoto T, Kusakabe A, Matsuura K, Sugiyama M, Nojiri S, Takashi J, Mizokami M. Influences of hepatitis B virus genotype and precore mutations on reactivation of occult hepatitis B in patients with hematological malignancy. 59th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), October 31-November 4, 2008, San Francisco, CA, USA.
2. Sakamoto T, Tanaka Y, Sugiyama M, Kurbanov F, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi E, Mizokami M. Mechanism for the Dependence of Hepatitis B virus genotypes G on Coinfection with Other Genotypes for Viral Replication. 59th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), October 31-November 4, 2008, San Francisco, CA, USA.
3. Kusakabe A, Tanaka Y, Yamaguchi T, Segawa, Kurbanov F, Sugiyama M, Sugauchi E, Hijikata M, Shimotohno K, Mizokami M. A novel three-dimensional culture system of immortalized hepatocytes; Assessment on HBV vaccine escape mutant strain infectivity and on ability of anti-PreS2 to prevent the infection. 59th American Association for the Study of Liver Disease (AASLD), October 31-November 4, 2008, San Francisco, CA, USA.
4. Sugauchi E, Tanaka Y, Yatsuhashi H, Enomoto M, Sakamoto T, Shinkai N, Kusakabe A, Matsuura K, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Hepatitis B virus genotype and X/core promoter/pre-S mutations in young-onset hepatocellular carcinoma. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Disease (APASL) March 23-26 2008 Seoul Korea.

表1. DNAデータベース登録HBVの網羅的解析による組換えHBV遺伝子型の分類

Type	Representative Sequence	Country	Recombinant Genotype	Hybrid type	Position of fragment
G1	EF103283	India	AD	A/D	A: 1-600
	EF103284	India	AD	A/D	A: 1-600
G2	AF418681	India	AD	D/A/D	A: 380-760
G3	AY161149	India	AD	D/A/D/A/D	A: 480-760, 1100-3060
G4	AY161146	India	AD	D/A/D	A: 1940-2440
	AY161141	India	AD	D/A/D	A: 1940-2440
G5	AY236161	Italy	AD	D/A/D	A: 440-1840
G6	X65258	Italy	AD	D/A/D/A/D	A: 450-780, 1600-2000
G7	X65259	Italy	AD	D/A/D	A: 790-1760
G8	X68292	Italy	AD	D/A/D	A: 650-2360
G9	AF297621	South Africa	AD	A/D/A/D/A	A: 1-1400, 1600-1820, 2160-3221
		South Africa	AD	D/A/D	A: 660-2880
G10	AF297620	South Africa	AD	D/A/D	A: 660-2880
		South Africa	AD	D/A/D	A: 380-2920
G11	AF297619	South Africa	AD	D/A/D	A: 380-2920
G12	EU185780	Brazil	AD	D/A/D	A: 160-680
G13	AY057947	Tibet	AC	C/A/C/A	A: 1600-1800, 3000-3215
G14	Y-HCC	Japan	AC	A/C/A	C: 1570-2800
G15	AB194949	Cameroon	AE	A/E/A	E: 800-1720
G16	ABI-33	Côte d'Ivoire	AE	A/E/A	E: 2120-2460
		United States	AG	A/G	A: 1-220
G17	AB056516	United States	AG	A/G	A: 1-220
G18	AB219430	Philippines	ABC	B/A/C/B	A: 1185-1784, C: 1785-2401
G19	Ba	Asia	BC	B/C/B	C: 1730-2440
G20	AF233236	China	BC	C/B/C	B: 1240-1820
	AB031265	Vietnam	BC	C/B/C	B: 1240-1820
G21	D16665	Japan	BC	C/B/C	B: 1820-2500
G22	AY817515	China	CD	D/C	D: 1-740
	AF461043	China	CD	D/C	D: 1-740
	Kobe	Japan	CD	D/C	D: 1-740
G23	AY817511	China	CD	D/C	D: 1-1460
	AY057948	Tibet	CD	D/C	D: 1-1460
	Nep9	Nepal	CD	D/C	D: 1-1460
G24	AB214516	Bolivia	CF	F/C/F	C: 1560-1800
G25	DQ078791	Thai	CG	G/C/G	C: 1860-2460
G26	AB048705	Australia	CU	C/U/C	U: 280-800
	AB048704	Australia	CU	C/U/C	U: 280-800
G27	AF241409	Vietnam	CU	U/C	C: 1600-3215
	AF241408	Vietnam	CU	U/C	C: 1600-3215
	AF231908	Vietnam	CU	U/C	C: 1600-3215
G28	AF498266	Central Africa	CChimp	C/Chimp	C: 551-1047



図1 641本の非組換え型HBV全塩基配列による系統解析

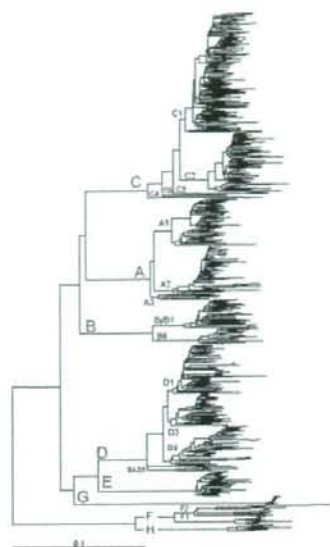


図2 a) 西アフリカより検出された新たな組換えHBV遺伝子型A/E

b) 本邦の若年発症肝癌例より検出された新たな組換えHBV遺伝子型A/C

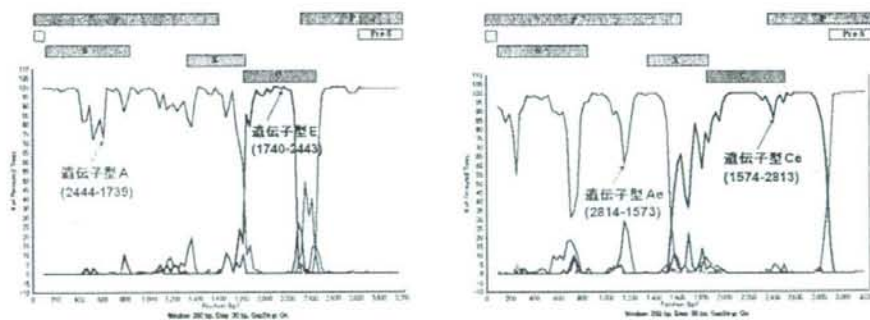
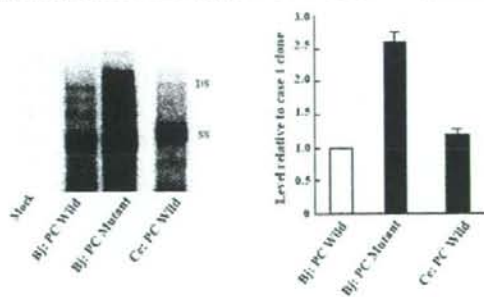


図3 *In vitro* HBV複製モデルを用いた各HBVクローン間の複製効率の比較



## 厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

## 分担研究報告書

## HIV感染症に合併するC型肝炎：我が国における実態の分析

研究分担者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨：多剤併用抗レトロウイルス療法(HAART)時代となって、HIV感染者の予後は著しく改善してきているが、HIV感染患者の死因のうち非AIDS関連死が約半数となっている。海外においては、AIDS非関連死の90%が肝疾患関連であり、多くは慢性C型肝炎ウイルス(HCV)感染症による死となっているとされる。HIV感染症に合併するC型肝炎について、これまで行なわれたアンケートと共同研究の結果を詳細に解析し、我が国におけるHIV感染症に合併するC型肝炎の状況について検討した。HIV・HCV重複感染例は、全国エイズ拠点病院のうち、首都圏、大都市の一部病院に集中する傾向が顕著であった。我が国におけるHIV感染症に合併するHCV感染症の特徴は、血液製剤による感染者が大多数を占める点にある。HIV感染症に合併するC型慢性肝炎は、HIV非感染例に比して若年で肝硬変や肝癌へと進行していた。C型肝炎に対するリバビリン併用PegIFN療法の治療成績は、HIV感染例においてHIV非感染例に比してやや低めであった。副作用はHIV非感染例と同等かそれ以上に強く、特に、HAART施行中は副作用の発生が多かった。HIV・HCV重複感染症に合併する末期肝硬変・肝がん症例に対する生体肝移植も実施されている。我が国におけるHIV感染症に合併するC型肝炎の実態が明らかにされた。今後の診療、日米医学協力、アジアの肝炎との比較検討において有用と考えられる。

## A. 研究目的

多剤併用抗レトロウイルス療法HAARTの登場以降、HIV感染者の予後は著しく改善してきている。これによって、HIV感染者の死因も従来に比べて大きく変化してきている。最近の複数の統計によると、HIV感染患者の死亡のうち、AIDS関連死は約半数にとどまり、非AIDS関連死が約半数となっている。海外においては、AIDS非関連死の90%が肝疾患関連であり、多くは慢性C型肝炎ウイルス(HCV)感染症による死とされている。したがって、我が国においても、感染者に合併する慢性HCV感染症の現状を把握し、治療法の開発を目指すことが急

務といえる。

## B. 方法

- 1) 厚生労働科学研究費エイズ対策事業「HIV感染症に合併する肝疾患に関する研究」（研究代表者 小池和彦）における全国アンケート調査、班員共同研究の結果を詳細に解析した。
- 2) 全国アンケート調査：我が国におけるHIV感染症に合併するウイルス肝炎の実態を把握するため、全国エイズ拠点病院へのアンケート調査によって作成されたデータベースを詳細に解析した。

- 3) 班員共同研究：我が国におけるHIV感染症に合併するC型肝炎の現状を明らかにする目的で、全国7施設の共同研究で行なわれたHIV・HCV重複感染症研究のデータを詳細に解析した。

## C. 結果

- 1) 全国拠点病院に対するHIV・HCV重複感染症に関するアンケート調査の結果、我が国のHIV感染症例の約20%がHCVに重複感染していた。血液製剤によるHIV感染例では96.9%と、そのほとんどがHCVにも感染していた。MSM (men who have sex with men)でのHCV感染率は4.2%であり、日本全体でのHCV陽性率(1.4%程度)に比して高率であった。「others」(異性間感染例が大部分と推定される)でのHCV陽性率は2.0%と日本全体でのHCV陽性率に近似した数字を示していた。血液製剤による感染例は、HIV・HCV重複感染症の80%以上を占めていた。
- 2) エイズ拠点病院である7施設におけるHIV・HCV重複感染症322例の肝疾患進展度の実態調査の詳細な解析を行なった。その結果、HIV・HCV重複感染症例のうちの約90%の症例でHCV量が高値( $\geq 100$  KU/ml)であることが判明したHCV単独感染では72%)。さらに、総ビリルビンが $2.0 \text{ mg/dl}$ を越える進行肝硬変が26例、 $3.0 \text{ mg/dl}$ を越える例で肝移植の対象となる症例が10例以上存在することも明らかになった。また、平均8.5年間の観察期間で、アルブミン値は平均 $0.17 \pm 0.52 \text{ g/dl}$ 低下、ビリルビン値は平均 $0.16 \pm 0.7 \text{ mg/dl}$ 上昇し、慢性肝炎(肝硬変)の進展

を示したが、血小板数は平均 $2.6 \pm 6.4 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 上昇していた。HCV単独感染症の場合とは異なり、血小板数は慢性肝炎の進行の目安としては使用できないことが明らかになった。

- 3) HIV感染症合併慢性C型肝炎に対して、リバビリン併用ペグインターフェロン療法でsustained virological response (SVR)が得られた例は、42例中15例(36%)であり、HCV単独感染症の場合に比して治療効果は低い傾向があった。
- 4) HIV・HCV重複感染症に対する生体肝移植が、これまでに9例の生体肝移植が施行されている。

## D. 考察

HIV・HCV重複感染例は全国拠点病院のうち首都圏、大都市の一部病院に集中する傾向が顕著であり、これらの病院におけるHIV感染症診療医と肝臓疾患診療医との連携を一層強化して行くことが重要と思われた。我が国におけるHIV感染症合併HCV感染症の特徴は、血液製剤による感染者が大多数を占める点にある。HIV感染症に合併するC型肝炎は、HCV単独感染例に比して若年で肝硬変や肝癌へと進行していた。

HIV感染症に合併するC型肝炎に対するリバビリン併用ペグインターフェロン療法の治療成績はHCV単独感染症に比して低めである。通常の慢性C型肝炎患者に比して、HCV量が約1オーダー高いことが原因のひとつと考えられる。投与時のウイルス動態はHCV単独例と大差が無いとされ、SVR達成のためには、より長期間の投与が必要と思われる。副作用は通常と同等かそれ以上に強いと考えられた。特に、

HAART施行中は副作用の発生が多く慎重な投与が必要である。

#### E. 結論

我が国におけるHIV感染症に合併するC型肝炎の実態が明らかにされた。今後の診療、日米医学協力、アジアの肝炎との比較検討等に有用であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hongo M, Ishizaka N, Furuta K, Yahagi N, Saito K, Sakurai R, Matsuzaki G, Koike K, Nagai R. Administration of angiotensin II, but not catecholamines, induces accumulation of lipids in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 2008 Dec 10. [Epub ahead of print]
- 2) Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signaltransduction and subcellular localization. *J Biol Chem* 2008 Dec 8. [Epub ahead of print]
- 3) Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis* 2008 Oct 30. [Epub ahead of print]
- 4) Koike K. Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in Hepatitis C Viral Infection. *J Gastroenterol* 2009;44supl:82-88.
- 5) Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr* 2008 Nov 27. [Epub ahead of print]
- 6) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- $\alpha$  is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 2008;118:683-694.
- 7) Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-31.
- 8) Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan. *Hepato Res* 2008;38:310-314.
- 9) Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepato Res* 2008;38:252-258.
- 10) Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepato* 2008;23:S87-91.
- 11) Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepato* 2008;48:858-879.

12) Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. *Hepatol Res* 2008;38:775-783.

## 2. 学会発表

- 1) Koike K: Steatosis, liver injury and hepatocarcinogenesis in HCV infection. *Hepatic Inflammation and Immunity* 2008, Galveston, 2008.
- 2) Abe K, Murakami K, Takamiya S, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Shoji I: Identification of hnRNPH1 and hnRNPF as binding partners for HCV core protein. p210, 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, 2008.
- 3) Yotsuyanagi H, Yamada N, Miyoshi H, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Moriya K, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Itoh F, Iino S, Koike K. Hepatitis B virus splicing variants emerge and dominate in the immune clearance phase of chronic hepatitis B. #677, 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Milan, 2008.
- 4) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. #1071, 59<sup>TH</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Disease, San Francisco, 2008.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスと樹状細胞

分担研究者 考藤 達哉 大阪大学大学院医学系研究科樹状細胞制御治療学准教授

研究の要旨

樹状細胞 (DC) にはウイルス感知系である Toll 様受容体 (TLR)、RIG-I、MDA-5 が発現しており、I 型 IFN や炎症性サイトカインなどの発現を介して先天免疫、獲得免疫の活性化に関与する。C 型慢性肝炎、B 型慢性肝炎患者における DC の TLR/RIG-I/MDA-5 の発現と機能及び病態における意義を解析した。C 型慢性肝炎患者のミエロイド DC (MDC) では、非感染者と比較して TLR2、TLR4、RIG-I の発現は増加しているが、TLR3、MDA-5 の発現には差を認めなかった。一方 B 型慢性肝炎患者 MDC では TLR2、TLR3、TLR4 の発現は非感染者と同等であった。C 型慢性肝炎、B 型慢性肝炎患者ともに、TLR3、TLR4 アゴニストによる MDC の IFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12 などの産生が非感染者に比べ低下していた。C 型肝炎、B 型肝炎患者 MDC を HCV NS3/4A 阻害剤や抗 HBV 核酸アナログで処理するとサイトカイン産生能は回復した。ウイルス肝炎患者 MDC における TLR/RIG-I の機能低下は、DC が病原体感染を十分に感知できず、効果的に免疫系を活性化できない可能性を示唆しているが、選択的抗ウイルス剤は MDC 機能の回復効果も期待できることが示された。

A. 研究目的

樹状細胞 (DC) は強力な抗原提示細胞であり、ウイルス、癌に対する免疫応答の中心的役割を果たしている。我々の検討により C 型慢性肝炎患者ではミエロイド DC (MDC) とプラスマサイトイド DC (PDC) が減少しており、MDC の Th1 誘導能や PDC の IFN 産生能が低下していることが明らかになった。DC には Toll 様受容体 (TLR) や RIG-I、MDA-5 が発現しており、ウイルス感染を感知して免疫応答を効果的に発動させる。HCV や HBV 感染においてもこれらのウイルス感知系が免疫病態に関与していると想定されるが、その発現と機能については明らかではない。本研究では C 型、B 型慢性肝炎の DC における TLR/RIG-I/MDA-5 の発現と機能を解析し、病態における意義を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

C 型慢性肝炎患者、B 型慢性肝炎患者および非感染者の末梢血より MDC を分離し、TLR/RIG-I/MDA-5 の発現を Real-time PCR 法を用いて検討した。また各 TLR に特異的なアゴニストを用いて MDC を刺激し、DC のサイトカイン産生能を検討した。MDC における TLR/RIG-I 系のシグナル伝達異常の有無を評価するために、TLR/RIG-I のシグナル伝達関連分子を PCR-Array を用いて網羅的に解析した。また多数例で TLR/RIG-I のアダプター分子の発現を比較した。C 型慢性肝炎患者、B 型慢性肝炎患

者 MDC を、それぞれ HCV NS3/4A 阻害剤、Entecavir で処理した後に TLR アゴニストで刺激し、サイトカイン産生能の変化を検討した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

C 型慢性肝炎患者 MDC における TLR2、TLR4、RIG-I の発現は亢進していたが、TLR3、MDA-5 の発現は非感染者と同程度であった。一方 B 型慢性肝炎患者 MDC では TLR2、TLR3、TLR4 の発現は非感染者と同程度であった。TLR3、TLR4 のアゴニスト刺激により MDC の IFN- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12 の発現は亢進したが、その程度は C 型慢性肝炎患者、B 型慢性肝炎患者で低かった。C 型肝炎患者 MDC では TRIF、TRAF6 の発現が非感染者 MDC より低値であったが、IPS-1、MyD88 の発現は高値であった。C 型肝炎、B 型肝炎患者 MDC をそれぞれ HCV NS3/4A 阻害剤、抗 HBV 核酸アナログ (Entecavir) で処理すると、MDC のサイトカイン産生能は亢進した。

D. 考察

C 型慢性肝炎、B 型慢性肝炎患者いずれにおいても MDC では TLR3、TLR4 下流のシグナル伝達が強く抑制されていることが示された。B 型肝炎 MDC では TLR/RIG-I 系の発現パターンが C

型肝炎 MDC とは異なり、HCV と HBV は異なる機序で MDC に干渉していることが示された。

## E. 結論

C 型慢性肝炎、B 型慢性肝炎患者では、MDC の TLR/RIG-I 系の機能が低下しており、その機序として C 型肝炎では TRIF、TRAF6 の発現低下が関与している可能性が示唆された。HCV、HBV 複製に選択的に作用する薬剤によって、抗ウイルス効果のみならず、MDC 機能の回復効果も期待できることが示された。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kanto T. Virus-associated innate immunity in liver. *Front Bioscience* 2008. 13. 6183-6192

2) Miyazaki M, Kanto T, Inoue M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijin T, Kakita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-I. *J Med Virol* 2008. 80: 980-988.

3) Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Kasugai T, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008. 99: 1643-1649.

4) Toyama T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Oze T, Nakanishi F, Yasumaru M, Mochizuki K, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma including recurrent cases: a study of 861 patients in a single institution. *J Clin Gastroenterol* 2008. 42: 317-322.

5) Kanada A, Takehara T, Ohkawa K, Kato M, Tatsumi T, Miyagi T, Sakamori R, Yamaguchi S, Uemura A, Kohga K, Sasakawa A, Hikita H, Kawamura K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B

virus/human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatol Res* 2008. 38: 622-628.

6) Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, Oze T, Inoue Y, Kurokawa M, Yakushijin T, Igura T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Oshita M, Hijioka T, Katayama K, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, Kato M, Hayashi N. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of the YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatol Res* 2008, 38: 450-456.

7) 考藤達哉: NKT 細胞とウイルス肝炎 医学のあゆみ「NKT 細胞研究の最新展開」225 巻 p157-161 2008

### 2. 学会発表

1) Kanto, T: NK and NKT-dendritic cell interactions in HCV infection  
Hepatic Inflammation and Immunity 2008 (Galveston, TX, USA 1.25-27 2008)

2) Kanto, T: Dendritic cell as a versatile controller of innate and adaptive immune response against hepatitis C virus  
The 10<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells (Kobe, Japan 10.1-5 2008)

3) Miyazaki, M: Impaired TLR/RIG-I-mediated innate immunity in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C patients (poster award)  
The 10<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells (Kobe, Japan 10.1-5 2008)

4) Sakakibara M: Novel mature dendritic cells inducible from monocytes with OK432, PGE1 and IFN- $\alpha$  serve as potent vaccine vehicles for gastrointestinal cancers (poster award)  
The 10<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells (Kobe, Japan 10.1-5 2008)

5) Itose, I: Dynamic changes of regulatory T cell subsets in patients with chronic HCV infection in relation to the degree of liver inflammation  
The Liver Meeting AASLD 59<sup>th</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course (San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

6) Takebe, S: IL-7 as a booster of Th2 differentiation by modulating myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection

The Liver Meeting AASLD 59<sup>th</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

7) Kakita, N: Natural regulatory T cells as biomarker for the assessment of hepatocellular carcinoma in local ablation therapy

The Liver Meeting AASLD 59<sup>th</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

8) Oze, T: Extended treatment with peginterferon alfa-2b and ribavirin combination therapy can suppress the relapse rate after treatment of chronic hepatitis C genotype 1 patients with late viral relapse

The Liver Meeting AASLD 59<sup>th</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

9) Oze, T: Ribavirin dosage reduction raises relapse rate dose-dependently in genotype 1 patients with chronic hepatitis C responding to pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin

The Liver Meeting AASLD 59<sup>th</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

10) Kurokawa, M: Effect of interferon alfa-2b plus ribavirin therapy on incidence of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis

The Liver Meeting AASLD 59<sup>th</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

11) Uemura, A: Critical role of IFN $\gamma$  produced from NK cells in IL-12-mediated NK cell activation and anti-tumor effect in liver

The Liver Meeting AASLD 59<sup>th</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

12) Shimizu, S: Expression of NKG2D activating receptor on NK cells in chronic hepatitis C

The Liver Meeting AASLD 59<sup>th</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

13) Kohga, K: SN38 inhibits the shedding of MHC class I-related chain A, a ligand of NKG2D immunoreceptor in human hepatocellular carcinoma cells

The Liver Meeting AASLD 59<sup>th</sup> Annual Meeting and Postgraduate Course

(San Francisco, CA, USA 10.31-11.4, 2008)

H.知的財産権の出願・登録状況  
特に予定なし



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金(社会保障国際協力推進研究事業)

主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資する為の日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## HBV

- Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, Oynsuren T, Mizokami M. Virological and clinical implication of core promoter C1752/V1753 and T1764/G1766 mutations in hepatitis B virus genotype D infection in Mongolia. *J Gastroenterol Hepatol*. 23:474-81. 2008
- Kanada A, Takehara T, Ohkawa K, Kato M, Tatsumi T, Miyagi T, Sakamori R, Yamaguchi S, Uemura A, Kohga K, Sasakawa A, Hikita H, Kawamura K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Early emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus in a patient with hepatitis B virus/human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatol Res* 2008. 38: 622-628
- Koike K, Kikuchi Y, Kato M, Takamatsu J, Shintani Y, Tsutsumi T, Fujie H, Miyoshi H, Moriya K, Yotsuyanagi H. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus in Japan. *Hepatol Res* 2008;38:310-314
- Kurashige N, Hiramatsu N, Ohkawa K, Oze T, Inoue Y, Kurokawa M, Yakushijiin T, Igura T, Kiso S, Kanto T, Takehara T, Tamura S, Kasahara A, Oshita M, Hijioka T, Katayama K, Yoshihara H, Hayashi E, Imai Y, Kato M, Hayashi N. Initial viral response is the most powerful predictor of the emergence of the YMDD mutant virus in chronic hepatitis B patients treated with lamivudine. *Hepatol Res* 2008, 38: 450-456
- Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol*. 82:8241-2. 2008
- Tanaka Y, Sanchez LV, Sugiyama M, Sakamoto T, Kurbanov F, Tatematsu K, Roman S, Takahashi S, Shirai T, Panduro A, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in chimeric mice carrying human hepatocytes. *Virology*. 376:408-15. 2008
- Trinks J, Cuestas ML, Tanaka Y, Mathet VL, Minassian ML, Rivero CW, Benetucci JA, Gimenez ED, Segura M, Bobillo MC, Corach D, Ghiringhelli PD, Sanchez DO, Avila MM, Peralta LA, Kurbanov F, Weissenbacher MC, Simmonds P, Mizokami M, Oubiña JR. Two simultaneous hepatitis B virus epidemics among injecting drug users and men who have sex with men in Buenos Aires, Argentina: characterization of the first D/Δ recombinant from the American continent. *J Viral Hepat*. 15:827-38. 2008

## HCV

- Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2008 82(12):5715-24
- Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 377(3):747-51
- Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors ataxia-telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol*. 2008 82(19):9639-46
- Ebihara T, Shingai M, Matsumoto M, Wakita T, Seya T. Hepatitis C virus-infected hepatocytes extrinsically modulate dendritic cell maturation to activate T cells and natural killer cells. *Hepatology*. 2008 Jul;48(1):48-58
- Ishii K, Murakami K, Hmwe SS, Zhang B, Li J, Shirakura M, Morikawa K, Suzuki R, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Trans-encapsulation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 371(3):446-50
- Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M. Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro. *Hepatol Res*. 2008 38(9):909-18
- Kato T, Choi Y, Elmowalid G, Sapp RK, Barth H, Furusaka A, Mishiro S, Wakita T, Krawczynski K, Liang TJ. Hepatitis C virus JFH-1 strain infection in chimpanzees is associated with low pathogenicity and emergence of an adaptive mutation. *Hepatology*. 2008 48(3):732-40
- Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2008 89(9):2108-13
- Kurbanov F, Tanaka Y, Chub E, Maruyama I, Azlarova A, Kamitsukasa H, Ohno T, Bonetto S, Moreau I, Fanning LJ, Logrand-Abravanel F, Izopet J, Naoumov N, Shimada T, Netesov S, Mizokami M. Molecular epidemiology and interferon susceptibility of the natural recombinant hepatitis C virus strain RF1\_2k/1b. *J Infect Dis*. 198:1448-56. 2008
- Masaki T, Suzuki R, Murakami K, Aizaki H, Ishii K, Murayama A, Date T, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. *J Virol*. 2008 82(16):7964-76
- Mateu G, Donis RO, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 based recombinant hepatitis C virus produces high levels of infectious particles but causes increased cell death. *Virology*. 2008 376(2):397-407
- Miyazaki M, Kanto T, Inoue M, Itose I, Miyatake H, Sakakibara M, Yakushijiin T, Kakita N, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. Impaired cytokine response in myeloid dendritic cells in chronic hepatitis C virus infection regardless of enhanced expression of Toll-like receptors and retinoic acid inducible gene-1. *J Med Virol* 2008. 80: 980-988
- Murakami K, Kimura T, Osaki M, Ishii K, Miyamura T, Suzuki T, Wakita T, Shoji I. Virological characterization

- of the hepatitis C virus JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J Gen Virol*. 2008 89(7):1587-92
- Nagase Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K, Kato T, Koike K, Suzuki M, Nishioka K, Iino S, Itoh F. Effect of treatment with interferon alpha-2b and ribavirin in patients infected with genotype 2 hepatitis C virus. *Hepatol Res* 2008;38:252-258
- Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, Yarmush ML. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*. 2008 47(5):1437-45
- Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology*. 2008 48(4):1054-61
- Wakita T. Isolation of JFH-1 strain and development of an HCV infection system. *Methods Mol Biol*. 2009;510:305-27

## HEV

- Kazuaki Takahashi, Hiroaki Okamoto, Natsumi Abe, Manri Kawakami, Hiroyuki Matsuda, Satoshi Mochida, Hiroshi Sakugawa, Yoshiaki Suginoshi, Seishiro Watanabe, Kazuhide Yamamoto, Yuzo Miyakawa, Shunji Mishiro. A Virulent Strain (JIO) of Hepatitis E Virus Genotype 3 in Japan: Analysis of Complete or Near-Complete Sequences of Human and Swine Isolates. *Emerging Infectious Diseases* 2009 (in press)
- Miyuki Taniguchi, Soo Ryang Kim, Shunji Mishiro, Kazuaki Takahashi, Myung Hee Shin, Haesun Yun, Man Suk Park, Li, Zhongmin, Kim Mi kyung, Fang Jinnv, Yoshitake Hayashi. Epidemiology of hepatitis E in Northeastern China, South Korea and Japan. *Journal of Infection* 2009 (in press)
- Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, Sato S, Nishimori H, Tsuji K, Maguchi H, Yoshida J, Maekubo H, Mishiro S, Ikeda H. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* 2008 Jul; 48(7): 1368-75
- Toyoda H, Honda T, Hayashi K, Katano Y, Goto H, Kumada T, Takahashi K, Abe N, Mishiro S, Takamatsu J. Prevalence of hepatitis E virus IgG antibody in Japanese patients with hemophilia. *Intervirology* 2008; 51(1): 21-5

## HEPATOCELLULAR CARCINOMA

- Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Kasugai T, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Serum levels of soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008, 99: 1643-1649
- Koike K, Tsutsumi T, Miyoshi H, Shinzawa S, Shintani Y, Fujie H, Yotsuyanagi H, Moriya K. Molecular Basis for the Synergy between Alcohol and Hepatitis C Virus in Hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:587-91
- Koike K. Steatosis, Liver Injury and Hepatocarcinogenesis in Hepatitis C Viral Infection. *J Gastroenterol* 2009;44supl:82-88
- Newell P, Villanueva A, Friedman SL, Koike K, Llovet JM. Experimental models of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2008;48:858-879
- Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Aoyama T. Hepatitis C virus core protein induces spontaneous and persistent activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transgenic mice: Implications for HCV-associated hepatocarcinogenesis. *Int J Cancer* 2008;122:124-31
- Tanaka N, Moriya K, Kiyosawa K, Koike K, Gonzalez FJ, Aoyama T. PPAR- $\alpha$  is essential for severe hepatic steatosis and hepatocellular carcinoma induced by HCV core protein. *J Clin Invest* 2008;118:683-694
- Toyama T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Oze T, Nakanishi F, Yasumaru M, Mochizuki K, Kanto T, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma including recurrent cases: a study of 861 patients in a single institution. *J Clin Gastroenterol* 2008. 42: 317-322

## MISCELLANEOUS

- Hongo M, Ishizaka N, Furuta K, Yahagi N, Saito K, Sakurai R, Matsuzaki G, Koike K, Nagai R. Administration of angiotensin II, but not catecholamines, induces accumulation of lipids in the rat heart. *Eur J Pharmacol* 2008 Dec 10. [Epub ahead of print]
- Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Imai K. Limitation of immunoaffinity column for the removal of abundant proteins from plasma in quantitative plasma proteomics. *Biomed Chromatogr* 2008 Nov 27. [Epub ahead of print]
- Ishizaka N, Ishizaka Y, Seki G, Nagai R, Yamakado M, Koike K. Association between hepatitis B/C viral infection, chronic kidney disease and insulin resistance in individuals undergoing general health screening. *Hepatol Res* 2008;38:775-783
- Ishizaka N, Ishizaka Y, Yamakado M, Toda E, Koike K, Nagai R. Association between metabolic syndrome and carotid atherosclerosis in individuals without diabetes based on the oral glucose tolerance test. *Atherosclerosis* 2008 Oct 30. [Epub ahead of print]
- Kanto T. Virus-associated innate immunity in liver. *Front Bioscience* 2008. 13. 6183-6192
- Yanagimoto S, Tatsuno K, Okugawa S, Kitazawa T, Tsukada K, Koike K, Kodama T, Kimura S, Shibasaki Y, Ota Y. A single amino acid of toll-like receptor 4 that is pivotal for its signaltransduction and subcellular localization. *J Biol Chem* 2008 Dec 8. [Epub ahead of print]

(和文は省略)

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷