

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
分担研究報告書

末梢血ジェノミクスを用いたウイルス性肝炎医療の開発

研究分担者： 前川 伸哉
山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：ウイルス性肝炎における病態や治療効果は、宿主因子とウイルス因子の両因子によって規定されると考えられるが、本研究においては双方の情報を統合することによって、真に有用な臨床マーカーを同定することを目指している。平成20年度においては、関連施設においてペグインターフェロン・リバビリン症例を施行したC型慢性肝炎患者で、すでに末梢血単核球中における自然免疫関連分子に絞った発現解析、あるいは網羅的な発現遺伝子解析（マイクロアレイ解析）が終了している症例群の血清を用い、HCV全長ゲノム解析を行い、相互の関連を検討しつつある。

A. 研究目的

ウイルス性慢性肝炎においては、近年の進歩によって、治療が奏功する症例は着実に増加している。しかしながら、例えばC型慢性肝炎においては、未だ最新の治療であるペグインターフェロン・リバビリン（PEG-IFN/RBV）の併用療法によっても、約半数の症例では無効となっており、症例毎に治療効果、あるいは病像を正確に予測できるマーカーの開発が急務となっている。

近年、HCV感染モデルの進展により、自然免疫系分子、あるいは脂質代謝関連分子などの宿主因子がウイルス増殖、あるいは肝炎の病態形成に重要な役割を担うことが解明されつつある。一方、変異に富むHCVゲノムにおける多型によって、病態、あるいは抗ウイルス治療の反応性に違いが生ずることも次第に明らかとなってきた。しかしながら、従来の研究ではこれらの両因

子は別個に解析されており、両者を統合し、関連を明らかとする十分な検討がなされていなかった。

本研究では、これらの知見を背景に、宿主因子、あるいはウイルス因子の一方のみではなく、双方の情報を統合することによって、真に有用な臨床マーカーを同定することを目標とする。

B. 研究方法

- 1) PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した Genotype 1b、高ウイルス量 HCV 患者において末梢血単核球内自然免疫遺伝子群の発現と治療奏功率との関連について検討した症例群の治療開始前血清を用い、HCV全ゲノムを解析する（武蔵野赤十字病院検体）。
- 2) PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した Genotype 1b、高ウイルス量 HCV 患者において末梢血単核球発現遺伝子の網羅的な発現解

析と治療奏功率との関連について検討した症例群の治療開始前血清を用い、HCV 全ゲノムを解析する（金沢大学検体）。

3) PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した Genotype 1b、高ウイルス量症例において全長解析を施行した症例群の血清をもちいたサイトカインアレイを行う（山梨大学検体）。

C. 研究成果

PEG-IFN/RBV 併用療法開始前に採取した末梢血単核球の解析において、無効例では ISG15、USP18 の末梢リンパ球での発現が有意に亢進し、一方 RIG-I/IPS-1 比は逆に、無効例で低下していたことから、治療開始前におけるこれらの発現解析によって治療反応性が予見できることが明らかとなった。これら自然免疫分子発現と HCV 遺伝子変異との関連を明らかにするため、現在はこれら症例群 130 例の治療前血清を用いて HCV 全ゲノム解析を行っている（武蔵野赤十字病院症例群）。

同様に、末梢血単核球からマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を施行した別の症例群 54 例に対する HCV 全ゲノム解析を行いつつある（金沢大学症例群）。

一方、PEG-IFN/RBV 併用療法を行った別症例群において治療反応性と HCV ゲノムの関連を検討したところ、コア蛋白領域と NS5A 領域における HCV ゲノム多型が治療効果と密接な関連を持つことが明らかとなった。同症例群 88 例の治療開始前血清から、今度は HCV ゲノム多型と関連する宿主因子を見出すため、インターフェロン関連因子を中心としたサイトカインアレイに取り組んでいる（山梨大学症例群）。

D. 考察と結論

末梢血リンパ球における自然免疫分子の発現情報、あるいは HCV ゲノムの多型情報は治療効果予測の重要な指標と考えられた。宿主因子情報と HCV ゲノム情報を統合し、今後さらなる解析を行ってゆく予定である。

E. 研究発表

論文発表

1. 論文発表

Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M.

Two flavonoids extracts from Glycyrrhizae radix inhibit in vitro hepatitis C virus replication.

Hepatol Res. 2008 Jul 20.

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 Sep;38(9):909-18.

Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N.

Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection.

J Infect Dis. 2008 Feb 1;197(3):361-70.

Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh K,

Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M.

Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA.

J Gastroenterol Hepatol. 2008

Sep;23(9):1437-47

1. 学会発表

前川伸哉、坂本穰、榎本信幸. ワークショップ8 : Viral genotyping/sequencing の臨床的意義. Whole HCV genome sequencing による治療感受性規定領域の検索. 第 12 回日本肝臓学会大会, 東京. 平成 20 年 10 月 1 日 - 10 月 3 日.

特許権等知的財産権の取得及び申請状況:

なし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成20年度）

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

研究分担者：田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学分野 准教授

分担研究課題：B型肝炎ウイルス感染キメラマウスおよび培養細胞系を用いた
ジェノミクス解析

研究要旨：平成20年度においては、ヒト肝細胞置換キメラマウスでのB型肝炎ウイルス(HBV)感染下における肝線維化を詳細に解析し、感染病態モデルとしての有用性を明らかとした。免疫不全下で、HBV遺伝子型や特異的変異が肝線維化進展に与える影響を分子レベルで検討し、臨床的に観察される病態と類似していることを確認した。それに続きジーンチップを用いた検討を行い、線維化進展に関わる遺伝子とその経路を検索した。

共同研究者氏名

杉山真也、溝上雅史

名古屋市立大学大学院医学研究科

臨床分子情報医学分野

検討した。さらには、HBV感染キメラマウス肝臓のジェノミクス解析を行い肝病態進展に寄与する宿主因子を明らかにする。

A. 研究背景・目的

ヒト肝細胞置換キメラマウス(キメラマウス)を用いて、各HBV遺伝子型と劇症肝炎に寄与する点変異を導入したウイルスを感染させ肝臓へ与える障害性の違いに関して検討してきた。昨年までに、比較的早期に肝細胞の病理学的形態変化と肝線維化が確認でき、特定のHBV遺伝子型と変異が肝臓に寄与することを明らかとした。

本年度では、この観察された病態が実際の臨床病態と類似したものであるか否かを病理学的検討に加えて分子レベルでの遺伝子発現を含めた線維化関連マーカーを検討する。感染期間の違うサンプルも用意し、感染期間による遺伝子発現の違いについても

B. 研究方法

HBV感染後のキメラマウス肝臓組織を病理学的・分子生物学的に解析し、臨床病態で観察されている遺伝子の変化とHBV遺伝子型や点変異が肝臓に及ぼす影響を比較検討する。サンプルとしては、感染期間6カ月と3カ月のマウス肝臓を用意した。キメラマウスの肝臓はヒト部分とマウス部分が共に存在するために、遺伝子発現量を検討する際の定量PCRでは種特異的なプライマーを新規に設計した。

キメラマウス肝臓からRNAを抽出しマイクロアレイによる解析に使用した。線維化進展群と非進展群、非感染群を用意し遺伝子発現プロファイルの比較解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

感染期間が6ケ月経過した群での線維化進展群ではTIMPs、MMPs、COL1a2といった線維化関連遺伝子の発現の亢進が見られ、非線維化進展群に対して有意差を示した。HBV抗原の蓄積と肝細胞の病理学的形態変化も線維化亢進群において多く観察された。

感染期間が3ケ月での検討では、線維化関連遺伝子の発現はすでに見られ、非線維化群に対して有意差を示した。しかしながら、HBV抗原蓄積と肝細胞の形態変化はわずかであり、これらの変化は時間に依存したものであると考えられた。

続いて、キメラマウス肝臓の遺伝子発現解析を行い、線維化進展群と非進展群の比較を行ったところ、線維化進展群では脂質、カルボン酸、アルコール、酸化代謝といった代謝に関連する経路の活性が全般的に減少していた。一方で、発現が亢進した経路としては、WNT、NOTCH及びTGF- β 1シグナル経路が見出された。線維化非進展群ではタンパク合成に関わる経路が亢進していた。

D. 考察

今回の検討により、キメラマウスで

観察された肝線維化が、ヒトでの検討と同様の遺伝子発現経路を活性化することで誘発されるものであることが明らかとなり、早期線維化モデルとしての有用性を確認した。このモデルは免疫不全ではあるが、免疫不全(抑制)下での肝線維化は臨床的にも実在し、問題となっている。また、感染による肝線維化誘発モデルとしては初めてのものであり、このモデルを基盤に検討を重ねることで臨床に即した研究が展開できると考えられる。

遺伝子発現を網羅的に検討した結果では、線維化群で種々の代謝経路の障害が観察され、臨床に近い結果が得られた。今後は、この結果の詳細な検討を進め、HBV感染を起因とする肝線維化に関連する遺伝子を同定し、病因の解明をめざす。

E. 結論

HBV感染キメラマウスでの遺伝子発現プロファイルが臨床像に即しており、HBV感染を起因とする線維化研究の基盤となりうるということが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sugiyama M, Tanaka Y, Mizokami M. et al. Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in Severe Combined Immunodeficiency

Transgenic With Urokinase-Type Plasminogen Activator Mouse With Human Hepatocytes. Gastroenterology. In press.

Kurbanov F, Tanaka Y, et al. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? J Virol. 2008. 82(16):8241-8242.

Yuen MF, Tanaka Y, et al. Independent Risk Factors and Predictive Score for the Development of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B. J Hepatol 50(1):80-8. 2009.

Tanaka Y, Sugiyama M, et al. Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes. Virology. 2008. 376(2):408-415.

2. その他の発表

Sugiyama M, Tanaka Y, et al. Reactive oxygen species induce liver fibrosis in uPA/SCID mice with human hepatocytes infected with specific hepatitis B virus genotypes. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Oct 31- Nov 4 2008. San Francisco.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

分担課題：脂質代謝系解析を用いたウイルス性肝炎に対する医療開発研究

研究分担者 花田 賢太郎 国立感染症研究所細胞化学部長

C型肝炎ウイルス（HCV）による難治性ウイルス肝炎の新規治療薬の開発が強く求められている。HCV 持続感染を起こすと病態の進行に伴い高頻度に脂肪肝を生じることから、HCV 感染と宿主脂質代謝との密接な関連が示唆されている。今回我々は、HCV の産生に関与する宿主脂質関連因子を探索する目的で、各種脂質代謝制御剤および脂質代謝物の影響について検討を行った。その結果、PPAR α アンタゴニスト、PPAR γ アゴニストやアラキドン酸代謝物が培養細胞レベルでの HCV 産生を阻害する事が明らかとなった。

A. 研究目的

難治性ウイルス肝炎の新規治療法の開発が強く求められている。HCV感染により肝脂肪化が特徴的に見られること、HCV複製と脂質代謝の関連が予想されるなど、HCVと脂質との関連が強く示唆されている。そこでHCV感染に関わる宿主脂質関連因子を同定し、当該因子の関与メカニズムを明らかにすることを目的とする。HCV産生に影響を与える脂質関連因子を見出せれば、それは新たな治療薬のターゲット候補になると期待される。

B. 研究方法

本年度は、HCV 産生に対する各種宿主脂質代謝（制御）過程について、主に脂質代謝制御剤を用いた解析を行うこととした。評価系としては培養細胞を用いた HCV 産生系を利用することとした。そのためにまず、培養細胞を用いた HCV 産生の評価系を構築した。細胞はヒト肝細胞由来の Huh7.5.1 細胞を用いた。HCV は、ヒト劇症肝炎患者から分離された JFH-1 株を用いた。培養器はコラーゲンコート 24 穴あるいは 48 穴プレートを用いた。Huh7.5.1 細胞に HCV を 37°C 2 時間感染後、経時的に培養液中及び細胞中のウイルス産生を調べた。その結果、3-4 日後よりウイルス蛋白質が検出されるようになり、6 日後まで対数的にウイルス蛋白質は増加した。7-8 日後より細胞死が観察され始めるので、阻害剤の検討では感染後 6 日間 37°C で培養することにした。この 6 日間の間に阻害剤で処理を行った。阻害剤は基本的に DMSO 溶液とし、0.5% (v/v) 以下で培養液に加えた。培養液中のウイルスの検出は HCV コアタンパク質の ELISA により行った。細胞中のウイルスの検出は、HCV コアタンパク質の ELISA あるいは抗 HCV コアタンパク質抗体を用いたイムノプロットにより行った。細胞毒性は XTT アッセイによる比色法で検討した。

HCV 複製に対する各種阻害剤の検討は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を含む HCV sub-genomic replicon (pSGR-JFH1) を培養肝細胞株 Huh7.5.1 細胞に導入して 2 時間後に各阻害剤を添加し、2.5 日間培養後にルシフェラーゼ活性を測定する事により検討した。

（倫理面への配慮）

本研究ではヒト臨床材料・実験動物等を用いていない。そのため倫理面での問題はない。

C. 研究結果

PPAR α アンタゴニスト

PPAR α は脂肪酸代謝に関わりの深い核内受容体である。PPAR α のアゴニストまたはアンタゴニストで細胞を処理した際の HCV 産生に対する影響を調べたところ、PPAR α アゴニストでは HCV 産生に対して全く影響を示さなかった。しかし、PPAR α アンタゴニスト GW6471 は IC₅₀; <10 μ M で有意に HCV 産生を阻害した。

PPAR γ アゴニスト

PPAR γ は、脂肪細胞の分化や糖代謝と関わりの深い核内受容体である。そこで、様々な PPAR γ アゴニストを用い、HCV 産生阻害能について検討した。その結果、Troglitazone, Ciglitazone, Rosiglitazone, GW1929 など調べた全ての化合物で有意に HCV 産生が阻害された。また、これら化合物は HCV 複製を（少なくとも）阻害することも明らかとなった。また、PPAR γ の生理的なりガンドと考えられている 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15-dPGJ₂) も HCV 産生を阻害した。PPAR γ アンタゴニスト GW9662 では影響を受けなかった。

高度不飽和脂肪酸（代謝物）

15-dPGJ₂ は、高度不飽和脂肪酸の一つであるアラキドン酸の代謝物である。高度不飽和脂

脂肪酸は 2 重結合をたくさん有するため反応性が高く細胞内で速やかに代謝されることが知られる。15-dPGJ2 以外にも高度不飽和脂肪酸代謝物で HCV 産生阻害能があるものはないかと、様々な高度不飽和脂肪酸代謝物の HCV 産生に対する影響を調べた。その結果、8, 15-di-HETE 等いくつかの代謝物で HCV 産生阻害活性が認められた。

D. 考察

本研究により複数の脂質代謝制御剤または高度不飽和脂肪酸代謝物が HCV 産生阻害能を持つことが明らかとなった。

培養細胞レベルで PPAR γ アゴニストが HCV 産生を阻害することが明らかとなった。PPAR γ アゴニスト Rosiglitazone はすでに糖尿病改善薬として臨床的に用いられており、もし、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法と組み合わせることでウイルス量のさらなる低下が起こるなどの有用性が見られれば大変興味深い。

E. 結論

培養細胞を用いた HCV 感染系を用い、HCV 産生を阻害する脂質代謝（制御）阻害剤のスクリーニングを行った結果、PPAR α アンタゴニスト、PPAR γ アゴニストが強力に HCV 産生を阻害する事が明らかとなった。これら薬剤は抗 HCV 薬としても機能する可能性を示した。また、高度不飽和脂肪酸代謝物にも HCV 産生阻害能を示すもの

が見いだされた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* 82(12):5715-24, 2008
2. Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. "Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells." *Virology* 383 (3), 319-327, 2009

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

分担課題：ジェノミクス技術による新規薬剤リードの探索研究

研究分担者 菅 裕明 東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究要旨 菅研究室で独自に開発した特殊ペプチド合成法（RaPID システム）を用いて、本研究班で新規に同定された標的に対する阻害剤を探索する。本年度は、HCV 関連標的の蛋白質 3 種に対する環状特殊ペプチドの探索を行った。

A. 研究目的

本研究班では、ウイルス性肝炎および肝癌における病態を網羅的なジェノミクス手法を用いて解析し、新規標的もしくは疾患関連因子の同定を目標としている。本研究分担班は、それらの新規標的や疾患関連因子に対し、薬物リードを迅速に発見することを目指し、関連技術を開発し実施することを目的としている。

B. 研究方法

当研究室で独自に開発したRaPID（Random Peptide Integrated Discovery）システムを駆使し、翻訳系を用いて特殊ペプチドを合成、薬剤探索にあてる。本技術の特筆すべき点は、フレキシザイム（tRNAアミノアシル化RNA触媒）を用いて、普遍遺伝暗号表を初期化し、通常アミノ酸を異常アミノ酸に対応させた改変遺伝暗号表を作成し、それに沿った形でmRNAを翻訳することで特殊アミノ酸を合成する手法である。また、昨年開発に成功したRaPIDディスプレイ法を用い、標的蛋白質への阻害剤の迅速探索を行う。

（倫理面への配慮）

本研究はヴィトロを中心としており、倫理面への配慮を特に必要ない。ただし、全てP2レベルで実験は行っている。

C. 研究結果

本年度は、RaPID ディスプレイ法を用いて、HCV 関連標的 NS3 プロテアーゼ（-HisT）、NS5A（-HisT）、LEL（-GST-biotin）ドメインに対し、特殊環状ペプチド阻害剤の探索を行った（括弧内は固定タグを示す）。いずれの標的に対しても、特殊環状ペプチドの濃縮に成功し、前者2つの標的に関しては、既に特殊ペプチドの配列情報も取得している。後者については、現在進行中。今後、これらの代表的なペプチドに関して化学合成を行い、その生理活性を探る。

D. 考察

RaPID ディスプレイ法による特殊ペプチドの探索技術は、迅速且つ確実に標的に結合する特殊環状ペプチドが獲得できることがわかった。

専攻研究では、一般的に100nM前後の解離定数をもつ分子が獲得でき、場合によってはさらに結合能力の強いものも発見されている。本研究で得られたHCV関連標的についての知見は、来年度内の研究で明らかにしたい。また、NS3 helicase を標的とした探索を計画したが、現在この標的に関しては発見段階で停止している（蛋白質が変性状態で発見された）。この問題も解決し、探索を再会したい。

E. 結論

目標の技術開発は達成した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- T Kawakami, H Murakami, H Suga "Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids" *Journal of American Chemical Society* 130, 16861-16863 (2008).
- T-J Kang, S Yuzawa, H Suga "Expression of histone H3 tails with combinatorial lysine modifications under the reprogrammed genetic code for the investigation on epigenetic markers" *Chemistry & Biology* 15, 1166-1174 (2008).
- A Ohta, H Murakami, H Suga "Polymerization of α -hydroxy acids by ribosomes" *ChemBioChem* 9, 2773-2778 (2008).
- H Xiao, H Murakami, H Suga, AR Ferre-D'Amare "Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme" *Nature* 454, 358-361 (2008).
- Y Goto, H Murakami, H. Suga "Initiating translation with D-amino acids" *RNA* 14, 1399-1410 (2008).

- Y Sako, J Morimoto, H Murakami, H Suga "Ribosomal synthesis of bicyclic peptides with two orthogonal inter-sidechain reactions" *Journal of American Chemical Society* 130, 7232-7234 (2008).
 - T-J Kang, H Suga "Ribosomal synthesis of nonstandard peptides" *Biochemistry and Cell Biology* 86, 92-99 (2008).
 - A Ohta, Y Yamagishi, H Suga "Synthesis of biopolymers using genetic code reprogramming" *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 159-167 (2008).
 - Y Sako, Y Goto, H Murakami, H Suga "Ribosomal synthesis of peptidase-resistant peptides closed by a non-reducible inter-sidechain bond" *ACS Chemical Biology* 3, 241-249 (2008).
 - Y Goto, A Ohta, Y Sako, Y Yamagishi, H Murakami, H. Suga "Reprogramming the initiation event in translation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides" *ACS Chemical Biology* 3, 120-129 (2008).
 - T Kawakami, H Murakami, H Suga "Messenger RNA-directed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides" *Chemistry & Biology* 15, 32-42 (2008).
2. 学会発表
- 8.28.2008 The 17th Meeting of Methods in Protein Structural Analysis, Sapporo, **Japan**
 - 9.11.2008 Aminoacyl-tRNA Synthetase Meeting 2008, Veyrier du Lac, **France**
 - 9.16.2008 International Symposium on Molecular Recognition of DNA: Biological Applications, Tokyo, **Japan**
 - 10.30.2008 Japanese-German Frontier of Science, Heidelberg, **Germany**
 - 11.12.2008 RIKEN International Conference Chemical Biology, Narita, **Japan**
 - 2008年3月28日：第128回日本薬学会年会・特別講演、横浜
 - 2008年5月19日：日本ケミカルバイオロジー研究会シンポジウム、東京
 - 2008年6月6日：第7回新規素材探索研究会セミナー、横浜
 - 2008年6月7日：第56回日本化学療法学会総会、岡山
 - 2008年6月18日：前期有機合成化学講習会、東京
 - 2008年10月15日：BIO JAPAN、横浜
 - 2008年12月11日：東北大学多元研・研究会、仙台
- H. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

統計的因果推定法に基づくジェノミクス解析法の研究

研究分担者 堀本 勝久 産業技術総合研究所・研究チーム長

研究要旨

グラフィカルモデルに基づきネットワーク構造変化を推定及び評価する手法を開発し、肝がん進展過程の各細胞において計測されたデータについて適用する。それにより、肝がんの進展過程特異的に活性化されるネットワーク群を推定することで、疾患進展機序の解明のための実験支援を行う。

A. 研究目的

ウィルス性肝炎の進展に沿って変化する細胞内分子ネットワークの変化を追跡する統計的手法を開発する。

B. 研究方法

2つの細胞内ネットワーク構造変化解析手法を開発する。手法の一つは、計測データから時間的に異なるネットワーク構造を推定する方法であり、もう一つは、文献データに基づいて構築された既知ネットワーク構造とその構成分子に関する計測データとの整合性を評価する方法である。

(倫理面への配慮)

当機関においては、理論研究のみを実施するため、動物実験は該当無し。

C. 研究結果

構造推定法により肝臓ガン進展過程において肝硬変から肝臓ガンに疾患が進展する遺伝子群間の因果関係を推定した。構造評価法方法によって、複数のネットワーク構造を収納したネットワークデータベースに対し、ある特定の条件下で計測したデータとの整合性を網羅的に評価し、活性化ネットワークの検索が可能になることを示した。

D. 考察

構造推定法では、遺伝子群間の関連性を推定する。マーカー遺伝子等の新規診断・治療法の開発に

は、遺伝子間の関連性の推定への発展が必要である。また、構造評価法では、解析対象となる既知ネットワーク構造の量が鍵になる。できる限り多くのネットワーク構造を収納したデータベースの構築がさらに必要である。

E. 結論

従来のスタティックなネットワーク解析と比較して、より生命現象に忠実な解析技術を開発したことで、疾患関連遺伝子や分化誘導原因遺伝子の探索において精度の高い解析が期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Saito, S., et al. BMC Sys. Biol. 2, 84, 2008.

Hayashida, M., et al., Int. J. Bioinfo. Res. and Appl. 4, 385-399, 2008.

2. 学会発表

Morioka, R., et al., OSB' 08, Lijung, China.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Morioka R, (堀本)	Phase Shifts of Circadian Transcripts in Rat Suprachiasmatic Nucleus.	Zhang XS, Chen L, Wu LY, Wang Y.	Proceedings of the Second International Symposium on Optimization and Systems Biology	World Publishing Corp	Beijing	2008	109-114
Zhang ZY, (堀本)	Time Series Segmentation for Gene Regulatory Process with Time-Window-Extension Technique.	Zhang XS, Chen L, Wu LY, Wang Y.	Proceedings of the Second International Symposium on Optimization and Systems Biology	World Publishing Corp	Beijing	2008	198-203
Wu ZK, (堀本)	Revealing Disease Related Interactions by Correlation Analysis.	Zhang XS, Chen L, Wu LY, Wang Y.	Proceedings of the Second International Symposium on Optimization and Systems Biology	World Publishing Corp	Beijing	2008	341-349

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
S Ura, (金子)	Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma.	Hepatology	in press	in press	2009

Y Sakai, (金子)	Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients.	Cancer Res	68(24)	10267-10279	2009
T Yamashita, (金子)	Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma.	J Hepatology	50(1)	100-110	2009
T Yamashita, (金子)	Application of serial analysis of gene expression in cancer research.	Curr Pharm Biotechnol	9(5)	375-382	2008
H Minagawa, (金子)	Comparative analysis of proteome and transcriptome in human hepatocellular carcinoma using 2D-DIGE and SAGE.	Protein J	27(7-8)	409-419	2008
T Tsuchiyama, (金子)	Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation.	Cancer Sci	99(10)	2075-2082	2008
N Iida, (金子)	Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice.	J Leukoc Biol	84(4)	1001-1010	2008
E Mizukoshi, (金子)	Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma.	J Hepatol	49(6)	946-954	2008

N Matsuzawa-Nagata, (金子)	Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity.	Metabolism	57(8)	1071-1077	2008
M Uno, (金子)	Tranilast, an antifibrogenic agent, ameliorates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis.	Hepatology	48(1)	109-118	2008
R Nishino, (金子)	Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma.	J Hepatol	49(2)	207-216	2008
R Teramoto, (金子)	Protein expression profile characteristic to hepatocellular carcinoma revealed by 2D-DIGE with supervised learning.	Biochim Biophys Acta	1784(5)	764-772	2008
H Minagawa, (金子)	Comparative proteomic and transcriptomic profiling of human hepatocellular carcinoma.	Biochem Biophys Res Commun	366(1)	186-192	2008
Tatsumi T, (竹原)	Decreased expressions of CD1d molecule on liver dendritic cells in subcutaneous tumor bearing mice.	J Hepatol	49	779-786	2008
Ohkawa K, (竹原)	Supportive Role Played by Precore and PreS2 Genomic Changes in the Establishment of Lamivudine Resistant-Hepatitis B Virus.	J Infect Dis	198	1150-1158	2008
Kohga K, (竹原)	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	99	1643-1649	2008

Kanmura S, (宇都)	Human neutrophil peptides 1-3 are useful biomarkers in patients with active ulcerative colitis.	Inflam Bowel Dis	in press	in press	2009
Takahama Y, (宇都)	Association of a genetic polymorphism in ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 with hepatitis C virus infection and hepatitis C virus core antigen levels in subjects in a hyperendemic area of Japan.	J Gastroenterol	43	942-950	2008
Kodama M, (宇都)	Endoscopic characterization of the small bowel in patients with portal hypertension evaluated by double balloon endoscopy.	J Gastroenterol	43	589-596	2008
宇都浩文, 桶谷真, 井戸章雄, 坪内博仁	C型肝炎治療 up to date C型肝炎慢性肝炎-ALT 持続正常者の治療戦略	Mebio	25	82-87	2008
宇都浩文, 西田知夏, 坪内博仁	ウイルス肝炎と生活習慣病	臨床と研究	85	1017-1020	2008
宇都浩文, 熊谷公太郎, 坪内博仁	HCV 多発地区における疫学調査から学んだもの	肝胆膵	57	717-725	2008
Sekine-Osajima Y, (前川)	Two flavonoids extracts from Glycyrrhizae radix inhibit in vitro hepatitis C virus replication.	Hepatol Res	39	60-69	2009
Jin H, (前川)	Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro.	Hepatol Res	38	909-918	2008
Amemiya F, (前川)	Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection.	J Infect Dis	197	361-370	2008

Sakamoto N, (前川)	Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA.	J Gastroenterol Hepatol	23	1437-1447	2008
Kurbanov F, (田中)	When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype?	J Virol	82(16)	8241-8242	2008
Tanaka Y, (田中)	Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes.	Virology	376(2)	408-415	2008
Sugiyama M, (田中)	Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in uPA/SCID Mouse with Human Hepatocytes.	Gastroenterology	136(2)	652-662	2009
Yuen MF, (田中)	Independent Risk Factors and Predictive Score for the Development of Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis B.	J Hepatol	50(1)	80-88	2009
Aizaki H, (花田)	Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection.	J Virol	82(12)	5715-24	2008
Nitahara-Kasahara Y, (花田)	Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells.	Virology	383 (3)	319-327	2009
T Kawakami, (菅)	Messenger RNA-directed incorporation of multiple N-methyl-amino acids into linear and cyclic peptides	Chemistry & Biology	15	32-42	2008

Y Goto, (菅)	Reprogramming the initiation event in translation for the synthesis of physiologically stable cyclic peptides	ACS Chemical Biology	3	120-129	2008
Y Sako, (菅)	Ribosomal synthesis of peptidase-resistant peptides closed by a non-reducible inter-sidechain bond	ACS Chemical Biology	3	241-249	2008
A Ohta, (菅)	Synthesis of biopolymers using genetic code reprogramming	Current Opinion in Chemical Biology	12	159-167	2008
T-J Kang, (菅)	Ribosomal synthesis of nonstandard peptides	Biochemistry and Cell Biology	86	92-99	2008
Y Sako, (菅)	Ribosomal synthesis of bicyclic peptides with two orthogonal inter-sidechain reactions	Journal of American Chemical Society	130	7232-7234	2008
T Kawakami, (菅)	Ribosomal synthesis of polypeptoids and peptoid-peptide hybrids	Journal of American Chemical Society	130	16861-16863	2008
T-J Kang, (菅)	Expression of histone H3 tails with combinatorial lysine modifications under the reprogrammed genetic code for the investigation on epigenetic markers	Chemistry & Biology	5	1166-1174	2008
A Ohta, (菅)	Polymerization of alpha-hydroxy acids by ribosomes	Chem Bio Chem	9	2773-2778	2008
H Xiao, (菅)	Structural basis of specific tRNA aminoacylation by a small in vitro selected ribozyme	Nature	454	358-361	2008
Y Goto, (菅)	Initiating translation with D-amino acids	RNA	14	1390-1398	2008

Nishino R, (堀本)	Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma.	J Hepatol	49	207-216	2008
Hayashida M, (堀本)	Integer Programming-based Approach to Allocation of Reporter Genes for Cell Array Analysis.	Int J Bioinformatics Research and Applications	4	385-399	2008
Saito S, (堀本)	Network evaluation from the consistency of the graph structure with the measured data.	BMC Sys Biol	2	84	2008

IV. 研究成果の刊行物・別刷