

平成 20 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：データマイニング手法を用いた効果的なC型肝炎治療法に関する研究

課題番号：H20-肝炎一般-006

研究代表者：泉 並木

I. 研究の意義

- (1) C型肝炎ウイルス(HCV)持続感染者は高率に肝癌を発症し、年間3万人が死亡している。
- (2) 治療によるウイルス排除により、肝癌による死亡が大幅に減少すると期待される。
- (3) しかしながら最新治療であるペグインターフェロン・リバビリン併用療法によりウイルスが排除される確率は50%であり、治療抵抗性要因の解析と、それに基づく個別化治療法の確立が急務である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) C型肝炎慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法における治療抵抗性要因、副作用予測因子をデータマイニングにより網羅的に解析し、安全性を担保した個別化治療アルゴリズムを確立する。
- (2) 個別化治療アルゴリズムにより科学的根拠に基づいて治療効果や副作用を予測し最適な治療法を選択することが可能となり、C型肝炎慢性肝炎に対する治療の均てん化を推進するために重要な方策となる。
- (3) 生体の治療抵抗性因子への介入など、難治例に対する新たな対策への有益な情報が得られ、治療効果向上の一助となる。

III. 1年間の研究成果

- ・研究代表者（泉並木）、研究分担者（黒崎雅之）
 - (1) 班員施設から1530例のデータを収集し分析用データベースを構築した。
 - (2) データマイニング解析を行ない治療効果・副作用予測アルゴリズムを構築した。
- ・研究分担者（坂本直哉、坂本穰、鈴木義之）
 - (1) データマイニング解析に必要な臨床データを収集し、データ入力を行った。
 - (2) ウイルス遺伝子変異（NS5A, core）と治療効果の関連を示した。
- ・研究分担者（菅内文中）
 - (1) データマイニング解析に必要な臨床データを収集し、データ入力を行った。
 - (2) 高感度HCV RNA定量法による治療効果予測の向上を示した。
- ・研究分担者（平松直樹）
 - (1) データマイニング解析に必要な臨床データを収集し、データ入力を行った。
 - (2) 副作用（貧血）を予測するアルゴリズムを作成した。
- ・研究分担者（岩崎 学）
 - (1) データマイニング解析の監修、および統計学的助言を行った。

IV. 21～22年度の課題

- (1) アルゴリズムを検証し、効果が高く安全性を担保した治療へ結びつけるための戦略を構築する。
- (2) 難治症例に対する延長療法の適応基準となるアルゴリズムを構築する。
- (3) 発癌予測アルゴリズムを構築する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) データマイニングに基づく個別化治療アルゴリズムにより、個々の症例で科学的根拠に基づいて治療効果を予測し最適な治療法を選択することが可能となり、C型慢性肝炎に対する治療の均てん化を推進するために重要な方策となる。
- (2) 副作用予測アルゴリズムの構築により、副作用率が低下し、安全性も向上する。
- (3) 発癌予測アルゴリズムにより、肝発癌予防対策を講じる必要性が高い患者を特定でき、発癌リスク因子への治療介入など、抗ウイルス療法以外の肝発癌防止対策を立てるための有力な情報が得られる。
- (4) 最終的には肝炎から肝発癌に至る症例を減少させ、肝癌による死亡者を減少させられる。

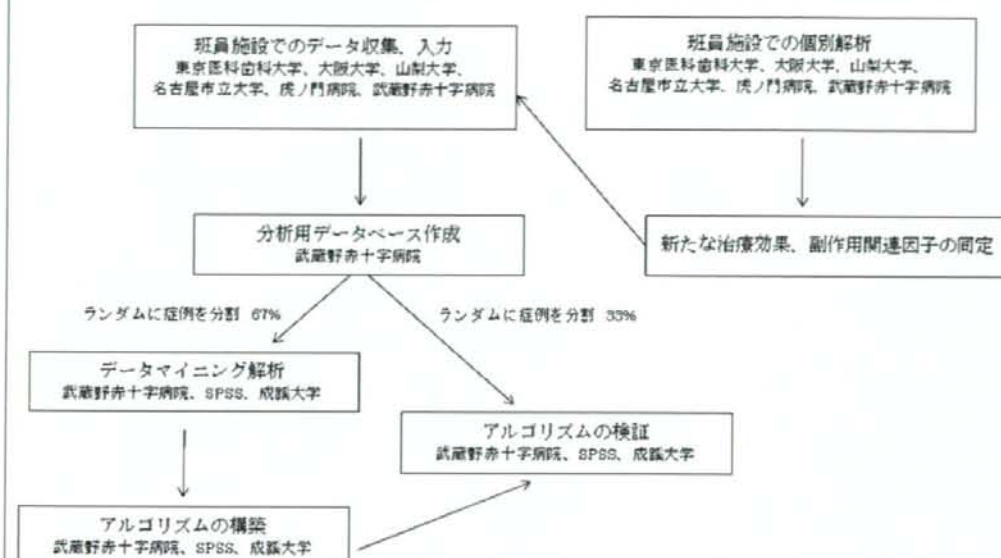
VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) データマイニング解析に基づくC型慢性肝炎に対するPEG-IFN/RBV併用療法の治療効果予測と治療戦略 第45回日本肝臓学会総会（2009年6月発表予定）黒崎雅之、岩崎学、平松直樹、鈴木義之、坂本直哉、坂本稔、菅内文中、泉並木
- (2) データマイニング解析に基づくPEG-IFN/RBV併用療法の治療戦略 第95回日本消化器病学会総会（2009年5月発表予定）黒崎雅之、泉並木
- (3) A Predictive Model of Response to Peginterferon Ribavirin in Chronic Hepatitis C using Classification and Regression Tree Analysis Masayuki Kurosaki, Kotaro Matsunaga, Itsuko Hirayama, Tomohiro Tanaka, Mitsuaki Sato, Yutaka Yasui¹, Nobuharu Tamaki, Naoki Umeda¹, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Kaoru Tsuchiya, Hiroyuki Nakanishi, Hiroki Ikeda, Jun Itakura Yuka, Takahashi, Yasuhiro Asahina, Nobuyuki Enomoto, Namiki Izumi in submission

知的財産権の取得及び申請 なし

ガイドライン作成 なし

VII. III (1年間の研究成果)の概要図等



- 研究班員施設から1530例のデータを収集し分析用データベースを構築し、データマイニング解析を行った。症例の67%をランダム抽出してモデルを作成し、33%で検証した。個別解析で治療効果との関連性が示されたHCV遺伝子変異を組み込んだアルゴリズムも作成した。
- 一般検査のみを用いた一般臨床医向けには血小板、年齢、HCVRNA量、性別、AFP、GGTを規定因子とする治療効果予測アルゴリズムを作成した。専門医向けにはNS5A-ISDR、Core変異、年齢、LDL-Chol、肝生検所見を規定因子とする治療効果予測アルゴリズムを作成した。さらに治療反応性を加味した解析を行い、ウイルス陰性化が遅れた場合でも薬剤投与量が十分であれば30-40%でウイルス学的著効が得られ、また48週時点での薬剤投与量が少ない症例でも延長治療により著効率が20ポイント上昇することを示した。専門医向けアルゴリズムでは、高齢とNS5A-ISDR変異0-1は治療終了後の再燃リスクが高く、Core wildでは延長治療により著効率が向上することが明らかとなり延長治療を必要とする症例の絞り込みが可能となった。
- 血球減少（高度貧血）の解析により治療前のHb、治療開始2週間後のHb減少、年齢、Ccrにより高リスク症例が同定可能であることを示し、治療中止の回避ならびに安全性の担保において重要な情報が得られた。
- モデル作成例と検証例における各グループのウイルス学的著効率は高い相関があり（相関係数0.81-0.96）モデルの安定性が検証された。
- 上記のデータマイニング解析により、治療効果・副作用予測に基づく、安全性を担保した治療のアルゴリズムを非専門医ならびに専門医向けに構築することができた。

○研究代表者の研究歴等・過去に所属した研究機関の履歴

1978年から東京医科歯科大学第二内科

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

東京医科歯科大学第二内科学教室(武内重五郎教授、丸茂文昭教授、佐藤千史教授)

東京医科歯科大学消化器内科(渡辺守教授)

近畿大学医学部消化器内科(工藤正俊教授)

山梨大学医学部第一内科(榎本信幸教授)

・主な研究課題

B型・C型慢性肝炎の病態・診断・治療

肝癌の早期診断と局所治療

・これまでの研究実績

1. Kurohaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. **J Hepatol** 2008;48:736-742
2. Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulatos involving innate immunity in antiviral response. **Gastroenterology** 2008; 134:1396-1405.
3. Izumi N, Asahina Y, Tsuchiya K, Kurohaki M, Nakanishi H, Kitamura T, Uchihara M, Miyake S. Repeated radiofrequency ablation for the distant recurrence in the liver in patients with chronic hepatitis C virus infection achieving lon-term survival. **Hep Res** 2007;37:S254-63.
4. Asahina Y Izumi N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Doi F, Tsuchiya K, Nakanishi H, Matsunaga K, Kitamura T, Kurohaki M, Uchihara M, Higaki M, Miyake S. Pharmacokinetics and enhanced PKR response in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. **J Viral Hepat.** 2007;14:396-403.
5. Tanaka Y, Mukaide M, Orito E, Yuen MF, Ito K, Kurbanov F, Sugauchi F, Asahina Y, Izumi N, Kato M, Lai CL, Ueda R, Mizokami M. Specific mutations in enhancer AII/ core promoter of hepatitis B virus subgenotypes C1/C2 increase the risk of hepatocellular carcinoma. **J Hepatol** 2006;45:646-53.
6. Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ito K, Acharya SK, Gish RG, Kramvis A, Shimada T, Izumi N, Kaito M, Miyakawa Y, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra- and extracellular expression of viral DNA and antigens. **Hepatology** 2006;44:915-24.
7. Kurohaki M, Izumi N, Onuki Y, Nishimura Y, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Kitamura T, Asahina Y, Uchihara M, Miyake S. Serum KL-6 as a novel tumor marker for hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus infected patients. **Hepatol Res** 2005;33:250-7.

厚生労働省肝硬変を含めた慢性肝炎の治療研究班に参加し、ガイドライン作成に参画

平成20年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題: データマイニング手法を用いた効果的な治療方法に関する研究

課題番号: H20-肝炎一般-007

研究代表者: 八橋 弘

I. 研究の意義

(1) ペグインターフェロン (PegIFN) とリバビリン (RBV) 併用療法の治療効果予測には、ウイルス因子、薬剤因子、宿主因子等の多因子が複雑に関与することから、それぞれの因子を独立ではなく多因子を複合させながら考察することが必要である。

(2) データマイニング (Data mining ;Dm) とは、過去のデータを解析し、その中から有効な規則性を発見して、重要な意思決定支援を促進する先進的情報解析システムである。従来の統計解析手法は、限られたサンプル数を用いて仮説を検証する方法であることから網羅性、迅速性において難点があるも、Dmでは膨大なデータから網羅的に高速に探索し、精緻な解析が可能である。本研究での治療効果予測モデルの作成には、統計解析 (重回帰分析) 以外に、Dmの決定木手法、RBF (Radial Basis Function) 手法を用いて、多因子情報から具体的な治癒確率を計算させることを目指す。また治療中の副作用に関しても、その種類、出現時期、重症度に関する調査をおこない、その予測、予見が可能かDmを用いて解析をおこなう。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) C型慢性肝炎に対するPegIFN/RBV併用療法の治療効果と副作用を明らかにした上で治療効果予測式を作成する。事前に治療効果と副作用を予測した上で、本治療法を受けることにより、より効果的かつ安全な肝炎治療が展開されることが期待される。

(2) C型慢性肝炎の自然経過、肝発癌率、発癌リスク因子、IFN治療による肝発癌抑止効果について明らかにする。IFN治療の必然性、治療の意義が明らかになる。

(3) IFN治療にかかわる患者意識調査をおこない、IFN治療の妨げとなる因子に関して解析をおこなう。IFN治療の公的助成制度が2008年4月から開始され、治療費患者負担等、経済的な問題の多くは解消されたが、IFN治療の妨げとなる因子は他にも存在する。その実態を明らかにする。

III. 1年間の研究成果

(1) PegIFN α /RBV併用療法の治療効果と副作用に関するDm解析

HCV1型高ウイルス症例に対して、2007年3月-2008年10月までの期間にPeg-IFN α 2a /RBV併用療法の導入をおこなった235例、2004年12月-2006年12月までの期間にPeg-IFN α 2b / RBV併用療法の導入をおこなった491例、2007年1月-2008年10月までの期間にPeg-IFN α 2b / RBV併用療法の導入をおこなった435例、本研究解析症例として登録された。PegIFN α 2b/RBV併用療法の治療効果に関するDm解析は2008年AASLD (H.Yatsushashi, HEPATOLOGY.535A511.2008) にて発表をおこなった。

(2) C型慢性肝炎からの肝発癌リスクに関する研究

1992年から2003年に期間に肝生検を施行した707例のC型慢性肝炎患者を対象に、平均8.2年経過観察をおこなった。うち110例 (15.6%) に肝発癌がみられた。肝発癌にかかわる因子として、多変量解析ではAFP値、年齢、肝線維化因子、IFN治療効果が (M.Tateyama, HEPATOLOGY. 650, 597A, 2008)。Dm解析でも、肝線維化因子、AFP、Alb、IFN治療効果、年齢が選択された。

(3) IFN治療にかかわる患者意識調査: IFN治療の妨げとなる因子に関する解析

国立病院機構内の肝疾患専門医療施設26施設をフィールドに、B型、C型慢性肝炎患者895名を対象に、IFN治療に関する患者意識調査をおこなった。IFN治療を妨げる因子として、1) 副作用に対する不安、2) 治療にかかわる時間確保が困難であること、などが主要な原因として抽出された。

IV. 21～22年度の課題

(1) PegIFN α /RBV併用療法を受けた患者登録は2009年3月までおこない、その後は治療効果判定をおこなうとともに、副作用による治療中止の実態を明らかにする。

(2) PegIFN α /RBV併用療法の治療効果、副作用に関する統計解析、Dm解析をおこない、治療指針を作成、提示する。

(3) C型慢性肝炎からの肝癌発生およびIFNによる発癌抑止効果について明らかにする。特にIFNによるAFPの低下の観点からIFNの発癌抑止効果について基礎的、臨床的側面から明らかにする。

(4) IFN治療の妨げとなる因子をさらに明確にする目的で、新たに国立病院機構内の肝疾患専門医療施設26施設の外来通院中のC型慢性肝炎患者を対象に患者と主治医の同時アンケート調査をおこなう。IFN治療の適応に関して医学的要因と社会的要因の2つの側面から統計解析、Dm解析をおこなう。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) Dmの解析手法のひとつの決定木法は、それぞれの因子をアルゴリズムのように具体的に提示しうることから、一般市民にも本治療のあり方を理解しやすいことが期待できる。事前に治療効果と副作用を予測した上で、本治療法を受けることが可能となり、より効果的かつ安全な肝炎治療が展開されることが期待される。

(2) 第3、4回肝炎治療戦略会議でのHCV1b型72週延長投与案件に関する参考人として、国立病院機構の集計データを提示した。今後も肝炎対策行政に本研究班成果が役立つことが予想される。

(3) 主任研究者である八橋は、厚生労働省:全国肝炎総合対策推進懇談会委員、厚生労働省:肝機能障害の評価に関する検討会委員、フィブリノゲン製剤等の納入先医療機関における製剤の使用実態及び当該製剤を使用された患者における肝炎ウイルス感染等の実態に関する研究、分担研究者を兼任した。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) H. Yatsuhashi et.al: Prediction of sustained virological response by combining data mining analysis and stepwise regression in HCV genotype 1 patients treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. HEPATOLOGY. 535 A511. 2008

(2) M. Tateyama et.al: Use of alpha-fetoprotein and platelet count for prediction of hepatocarcinogenesis in patients with chronic hepatitis C virus infection. HEPATOLOGY. 650, 597A, 2008

(3) 八橋弘、山内勉、河村佳洋: データマイニングを用いた治療効果予測 (C型肝炎のすべて) 肝胆膵 57. 851-859. 2008

(4) 八橋弘: C型肝炎: データマイニングを用いた治療効果予測、医学のあゆみ229-1. 2009 (2009年4月発刊予定)

(5) Miyaaki H, Ichikawa T, Nakao K, Yatsuhashi H, Furukawa R, Ohba K, Omagari K, Kusumoto Y, Yanagi K, Inoue O, Kinoshita N, Ishibashi H, Yano M, Eguchi K. Clinicopathological study of nonalcoholic fatty liver disease in Japan: the risk factors for fibrosis. Liver Int. 2008 Apr;28(4):519-24.

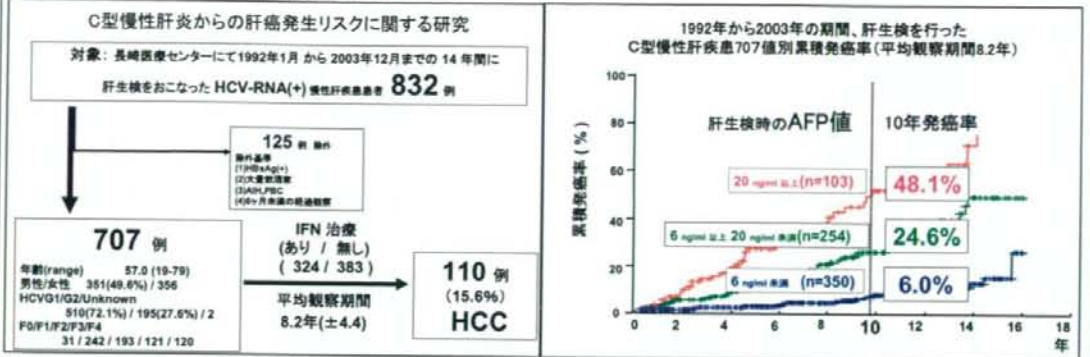
(6) Satoh T, Masumoto A. Accordion Index: A new tool for the prediction of the efficacy of peg-interferon-alpha-2b and ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. Hepatol Res 38;315-318:2008

(7) 矢野博久. 肝癌の発生・進展とインターフェロンによる制御. J Microwave Surg. 26: 21-26, 2008.

(8) Yano H. Inhibitory function of interferon on hepatocarcinogenesis. Oncology. 75: (suppl. 1), *in press*, 2008.

(9) Moriya F, Ogasawara S, Basaki Y, Akiba J, Kojiro S, Fukahori S, Ishizaki H, Nishida N, Matsuoka K, Kojiro M, Kuwano M, Yano H. Growth inhibitory effects of pegylated IFN-alpha2b and 5-fluorouracil in combination on renal cell carcinoma cell lines in vitro and in vivo. Int J Oncol. 33: 647-55, 2008.

VII. III(1年間の研究成果)の概要図等



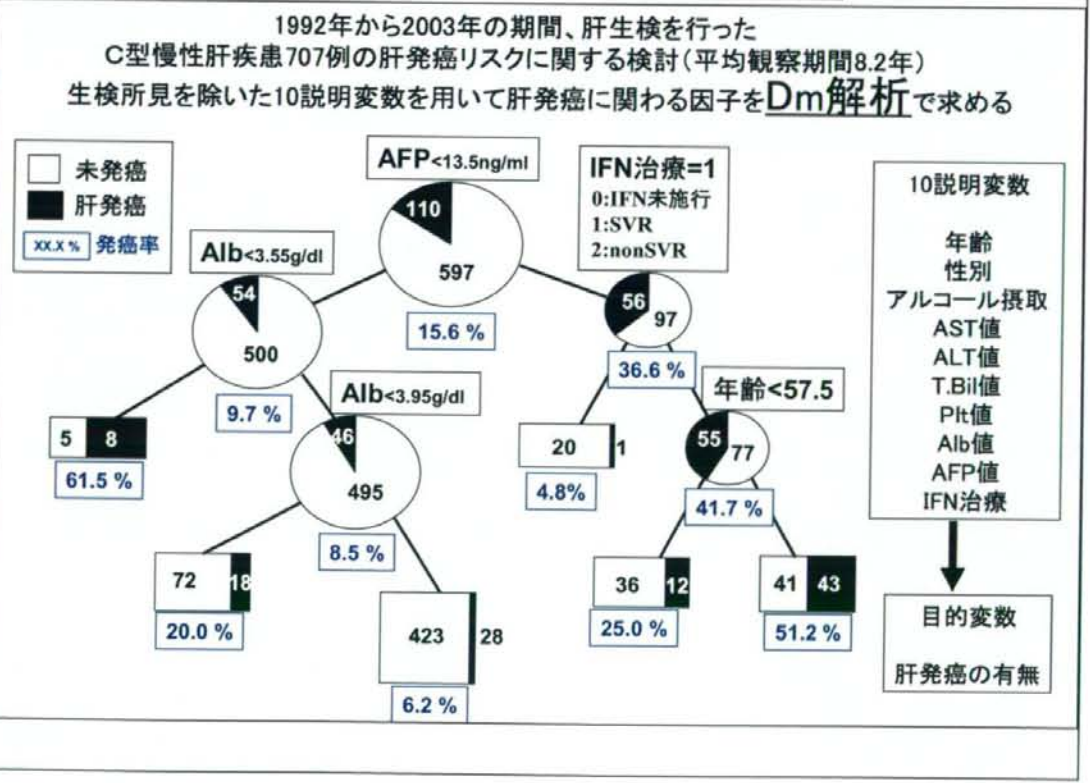
1992年から2003年の期間、長崎医療センターで肝生検を行ったC型慢性肝疾患707例の肝発癌リスクに関する検討(平均観察期間8.2年)

生検所見を除いた10説明変数を用いて肝発癌に関わる因子を**多変量解析**で求める

	Risk ratio	p値	C.I.
年齢	54.7歳未満	1	
	54.7歳以上	1.814	0.019 1.102-2.985
Plt値	15万/μl以上	1	
	15万未満	1.908	0.012 1.155-3.151
Alb値	4.2g/dl以上	1	
	4.2g/dl未満	1.706	0.015 1.107-2.629
AFP値	5ng/ml未満	1	
	5ng/ml以上	2.872	0.001 1.508-4.735
	20ng/ml未満	1	
	20ng/ml以上	5.452	<0.001 2.900-10.250
IFN治療	治療無し	1	
	Non-SVR	0.585	0.014 0.382-0.896
	SVR	0.081	<0.001 0.025-0.263

10説明変数
 年齢 性別 アルコール摂取 AST値 ALT値 T.Bil値 PIt値 Alb値 AFP値 IFN治療

目的変数
 肝発癌の有無



○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

研究歴

1988年以後、現在まで国立病院長崎医療センターに勤務

1992年学位修得(長崎大学)

1997年国立病院長崎医療センター臨床研究部ウイルス研究室室長

2000年国立病院長崎医療センター臨床研究部長

2002年国立病院機構長崎医療センター臨床研究センター治療研究部長

2002年、厚生科学研究費補助金(21世紀型医療開拓推進 研究事業)においてデータマイニングを用いての肝疾患患者の生命予後の解析結果について分担研究者として報告。疾患予後モデルの作成方法で特許登録(特許番号:第2005-7020055)

2002-2004年、厚生科学研究費補助金(肝炎ウイルス等の標準的治療困難例に対する治療法の確立に関する研究班)の主任研究者

2005-2007年、厚生科学研究費補助金(肝硬変に対する治療に関する研究班)の主任研究者。

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

矢野右人(長崎医療センター名誉院長)

・主な研究課題

1. ウイルス肝炎(C型B型)の病態と治療法に関する研究、

2. 急性ウイルス肝炎の分子疫学的研究、

3. 発癌抑制に関する研究

・これまでの研究実績 八橋 弘 英文論文:94編

- 1) Kusumoto K, Yatsuhashi H, Nakao R, Hamada R, Fukuda M, Tamada Y, Taura N, Komori A, Daikoku M, Hamasaki K, Nakao K, Ishibashi H, Miyakawa Y, Eguchi K. Detection of HBV core promoter and precore mutations helps distinguish flares of chronic hepatitis from acute hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 May;23(5):790-3.
- 2) Miyaaki H, Ichikawa T, Nakao K, Yatsuhashi H, Furukawa R, Ohba K, Omagari K, Kusumoto Y, Yanagi K, Inoue O, Kinoshita N, Ishibashi H, Yano M, Eguchi K. Clinicopathological study of nonalcoholic fatty liver disease in Japan: the risk factors for fibrosis. *Liver Int.* 2008 Apr;28(4):519-24.
- 3) Migita K, Abiru S, Tanaka M, Ito M, Miyashita T, Maeda Y, Koga T, Nakamura M, Komori A, Yatsuhashi H, Ida H, Eguchi K, Hirayama K, Yasunami M, Ishibashi H. Acute hepatitis in a patient with familial Mediterranean fever. *Liver Int.* 2008 Jan;28(1):140-2.
- 4) Komori A, Nakamura M, Fujiwara S, Yano K, Fujioka H, Migita K, Yatsuhashi H, Ishibashi H. Human intrahepatic biliary epithelial cell as a possible modulator of hepatic regeneration: Potential role of biliary epithelial cell for hepatic remodeling in vivo. *Hepatol Res.* 2007 Oct;37 Suppl 3:S438-43.
- 5) Nakamura M, Komori A, Ito M, Kondo H, Aiba Y, Migita K, Nagaoka S, Ohata K, Yano K, Abiru S, Daikoku M, Yatsuhashi H, Shimoda S, Ishibashi H. Predictive role of anti-gp210 and anticentromere antibodies in long-term outcome of primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res.* 2007 Oct;37 Suppl 3:S412-9.
- 6) Takii Y, Abiru S, Fujioka H, Nakamura M, Komori A, Ito M, Taniguchi K, Daikoku M, Meda Y, Ohata K, Yano K, Shimoda S, Yatsuhashi H, Ishibashi H, Migita K. Expression of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2007 Sep;27(7):989-96.
- 7) Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, Izumi N, Yatsuhashi H, Orito E, Joh T, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus X and core promoter mutations on hepatocellular carcinoma among patients infected with subgenotype C2. *J Clin Microbiol.* 2007 Oct;45(10):3191-7.
- 8) Migita K, Abiru S, Maeda Y, Nakamura M, Komori A, Ito M, Fujiwara S, Yano K, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Elevated serum BAFF levels in patients with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol.* 2007 Jul;68(7):586-91.
- 9) Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Okanoue T, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Suzuki F, Kobayashi M, Chayama K, Imamura M, Yotsuyanagi H, Nakaoka S, Maki N, Kawata S, Kumada H, Iino S, Kiyosawa K. Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy. *Hepatol Res.* 2007 Aug;37(8):661-6.
- 10) Tanikawa K, Kage M, Komuta M, Nakashima O, Yano H, Yatsuhashi H, Kojiro M. Pathological analysis of oxyphilic granular hepatocytes and hepatocellular mitochondria in chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2007 Jun;37(6):425-32.
- 11) Migita K, Maeda Y, Abiru S, Nakamura M, Komori A, Miyazoe S, Nakao K, Yatsuhashi H, Eguchi K, Ishibashi H. Polymorphisms of interleukin-1beta in Japanese patients with hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2007 Mar;46(3):381-6.
- 12) Migita K, Miyashita T, Maeda Y, Nakamura M, Yatsuhashi H, Kimura H, Ishibashi H, Eguchi K. Toll-like receptor expression in lupus peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol.* 2007 Mar;34(3):493-500.
- 13) Nakamura M, Kondo H, Mori T, Komori A, Matsuyama M, Ito M, Takii Y, Koyabu M, Yokoyama T, Migita K, Daikoku M, Abiru S, Yatsuhashi H, Takezaki E, Masaki N, Sugi K, Honda K, Adachi H, Nishi H, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Komatsu T, Saito A, Saoshiro T, Harada H, Sodeyama T, Hayashi S, Masumoto A, Sando T, Yamamoto T, Sakai H, Kobayashi M, Muro T, Koga M, Shums Z, Norman GL, Ishibashi H. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2007 Jan;45(1):118-27.

平成 20 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、治療法の開発に関する研究課題番号：H20-肝炎一般研究代表者：岡上 武**I. 研究の意義**

- (1) NAFLD には単純性脂肪肝 (FL) と予後不良の NASH があるが血液生化学検査での鑑別法を検討
- (2) 糖尿病患者死因のトップが肝疾患死と報告されたがその中に占める NASH の頻度明らかにする
- (3) NAFLD の 10-20% が NASH に進展するが遺伝的背景も含めてその因子を明らかにする
- (4) NASH からの肝発癌の機序や頻度を明らかにする
- (5) NASH の治療法の確立を目指す

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 糖尿病患者 5000 例の data base を作成し、肝障害の実態を明らかにし、その長期予後を解析
- (2) 肝生検で診断した NAFLD (FL と NASH) 500 例の検査所見から血液生化学的鑑別法を開発
- (3) 動物実験と臨床例から NASH (FL, NASH) の病態を明らかにする
- (4) NAFLD1000 例 (FL500 例, NASH500 例) で SNPs 解析し、FL, NASH の SNPs を明らかにする
- (5) NASH の治療ガイドラインを作成する

III. 1年間の研究成果

・研究代表者

- (1) 糖尿病患者 2500 例の data base を作成した
- (2) NAFLD150 例の肝生検を施行し、SNPs 用採血を終了し、同時に保存血清採取、組織を凍結保存

・研究分担者 (橋本悦子)

- (1) cohort study から進行 NASH 例の肝発癌リスクは 11.3%/5 年、5 年生存率 75.2% と判明

・研究分担者 (高後 裕、安居幸一郎)

- (1) FL に比して NASH では肝への鉄過剰蓄積の頻度が高く、transferin receptor (TfR1) の発現亢進

・研究分担者 (植木浩二郎)

- (1) 肝臓へのマクロファージと脂肪沈着の関連性を明らかにした

・研究分担者 (宇都浩文)

- (1) プロテオーム解析で NAFLD は健常者と異なる蛋白ピークを 30 以上を有し候補蛋白を同定中

IV. 21~22年度の課題

- (1) 糖尿病 2500 例を data base に入力し、5000 例の data base から肝障害の実態を解明
- (2) 残り 2 年間で NAFLD750 例の肝生検を施行し 1000 例 (FL 500 例, NASH 500 例) で SNPs 解析を行う
- (3) NAFLD500 例の肝生検所見と血液生化学所見から単純性脂肪肝と NASH の鑑別式を作成する
- (4) 実験モデル、臨床例から FL から NASH へ、さらには発癌に關与する因子を明らかにする
- (5) NASH の治療法のアルゴリズムを作成する

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 糖尿病の死因の第 1 を占める肝疾患の実態が明らかになり予防対策が確立できる
- (2) NAFLD の単純性脂肪肝と NASH の血液生化学的鑑別法により肝生検が減少し医療費削減に繋がる
- (3) 単純性脂肪肝と NASH の病態解明により NASH への進展に対する予防法が進歩する
- (4) NASH の治療ガイドラインが作成され、治療法が明らかになる

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者

- (1) Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue I, Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* in press
- (2) 岡上 武, 島 俊英, 水野雅之, 松本美加, 榎村敦詩. C型肝炎、脂肪性肝疾患に関する消化器内科医、一般内科医の意識調査。日消誌 105:1737-1748, 2008

研究分担者

- (1) Uchiyama A, Kim JS, Kon K, Jaeschke H, Ikejima K, Watanabe S, Lemasters JJ. "Translocation of iron from lysosomes into mitochondria is a key event during oxidative stress-induced hepatocellular injury. *Hepatology* 48 : 1644-54, 2008
- (2) Takamatsu S, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Kawamura T, Teramoto K, Igari T, Arii S. Influence of risk factors for metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease on the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 55:609-614, 2008
- (3) Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol* 43: 811-822, 2008.
- (4) Yano W, Kubota N, Itoh S, Kubota T, Awazawa M, Moroi M, Sugi K, Tamakoto T, Ogawa H, Tokuyama K, Noda T, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T. Molecular mechanism of moderate insulin resistance in adiponectin-knockout mice. *Endocr J* 55: 513-522, 2008

VII. III (1年間の研究成果)の概要図等

NASH・NAFLDの病因と研究項目



研究項目

成果

● 遺伝要因	Whole genome SNPs解析の体制を確立 倫理委員会での承認 血液サンプル収集を開始し、200例を確保	
● 自然経過・予後	前向きコホートによりNASHからの肝発癌 リスクと生存率を明らかにした	
● 糖尿病における肝障害	大規模データ・ベースの構築。目標5,000 例中、2,500例を入力	
病態	● 非B非C肝癌におけるNASH	肝癌組織での8-OHdG染色とアレイ解析
● 脂質・鉄代謝異常	} NASHで高度の鉄蓄積、肝硬変例での トランスフェリン受容体(TfR1)の発現亢進 NASHでチオレドキシシン遺伝子の発現亢進 NASHでミトコンドリアでの脂肪酸β 酸化能の低下 モデルマウスでの肝脂肪組成の差 PI3K?ノックアウトマウスでの解析 NAFLDでのcaspase依存性細胞死 NASHではコリンからメチオニンへの変換酵素活性が低下	
● 酸化ストレス		
● インスリン抵抗性		
● アポトーシス・オートファジー		

診断	● FLとNASHの鑑別診断基準 ● NASHの発症、発癌マーカー ● 肝障害合併糖尿病患者の診療指針	大規模な臨床データ・ベースの構築と前 向きコホート研究が進行 プロテオーム解析によるバイオマーカー 候補の発見
----	---	--

治療	● 薬物療法 ● 瀉血、鉄制限食	ランダム化比較臨床試験 (Pioglitazone, ARB, Ezetimibe) の予備的検討 動物モデルでの試験
----	---------------------	---

: ○研究代表者の研究歴等・ 過去に所属した研究機関の履歴

1980-1981 カリフォルニア大学デーヴィス校病理学教室 (研究員)

1981-2003 年 3 月 京都府立医科大学第三内科 (助手、講師、助教授、教授)

2003 年 4 月-2007 年 3 月 京都府立医科大学消化器病態制御学 (教授)

・ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

Samuel W French (UC, Davis, 病理学教授)

・ 主な研究課題

ウイルス性肝炎の病態解析と治療

肝発癌機構

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の病態解析

・ これまでの研究実績

- (1) Mitsuyoshi H, Yasui K, Harano Y, Endo M, Tsuji K, Minami M, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Analysis of hepatic genes involved in the metabolism of fatty acids and iron in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepato Res in press*
- (2) Umemura A, Itoh Y, Itoh Y, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanoue T, Fujita J. Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47: 493-502, 2008
- (3) Zen K, Yasui K, Nakajima T, Zen Y, Zen K, Gen Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Mitsufuji S, Tanaka S, Itoh Y, Nakamura Y, Taniwaki M, Arai S, Okanoue T, Yoshikawa T. ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulation mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 109-120, 2008
- (4) Minami M, Daimon Y, Mori K, Takashima H, Nakajima T, Itoh Y, Okanoue T. Hepatitis B virus-related mutagenesis in chronic hepatitis B patients as an early drastic changes leading to hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 24: 4340-4348, 2005
- (5) Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Brechot C, Paterlini-Brechot P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinoma. *Gut* 54(8): 1162-1168, 2005
- (6) Okanoue T, Makiyama A, Nakayama M, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Nakajima T, Yasui K, Minami M, Itoh Y. A follow-up study to determine the value of liver biopsy and need for antiviral therapy for HCV carriers with persistently normal serum aminotransferase. *J Hepatol* 43: 599-605, 2005

平成 20 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

課題番号：H20-肝炎一般-009

研究代表者：茶山一彰

I. 研究の意義

(1) ウイルス性肝炎による肝疾患は肝硬変、肝細胞癌に進展し年間 3 万人以上が死亡する重要な健康問題である。C 型肝炎ウイルス感染は患者の高齢化が進み早急に対策を講じる必要がある。B 型も日本で 150 万人、世界で数億人のキャリアが存在する世界的にも重要な感染症である。

(2) 肝炎ウイルスはヒトとチンパンジーにしか感染しないため、小動物を使った実験モデルによる研究の推進が新治療の開発に必須である。薬剤抵抗性など、難治性の肝炎ウイルス感染に対する対策を講じるためには薬剤抵抗性に特徴的な形質を有するウイルスを作製し、実験を行う必要がある。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) 治療抵抗性の C 型肝炎ウイルスの感染モデルを作製し、治療抵抗性の原因について解析するとともに、治療抵抗性を克服する治療法について検討する。

(2) 薬剤耐性の B 型肝炎ウイルスモデルを作製し、交差耐性などの特徴を明らかにすることにより有効な治療薬の選択を可能にする。

(3) ウイルスが増殖するのに必要な宿主因子をトランスクリプトーム、プロテオーム解析により網羅的に探索し、新規治療開発のシーズとなる分子を同定する。

III. 1 年間の研究成果

・研究代表者(茶山一彰)

(1) リバースジェネティックスの手法を用いて種々のインターフェロン感受性を有する HCV infectious clone を作製、キメラマウスを使用して感染実験を行い、感染性を確認した。

(2) genotype 1b でインターフェロン抵抗性 (core aa70, 91 mutant, ISDR wild)、あるいは感受性 (core aa70, 91 wild, ISDR mutant) の infectious clone を作製、感染実験に成功した。

(3) 種々の薬剤に耐性、あるいは多剤耐性の HBV clone 産生細胞株を作製、キメラマウスにも感染させることが出来た。

・研究分担者(松浦喜治)

(1) HCV 感染細胞特異的に IFN を誘導可能とし、内在性の IFN を効率よく発現させ、HCV を排除する系を構築し非感染細胞に IFN の負荷を与えることなく、感染細胞から HCV を排除できる可能性を示した。

・研究分担者(土方誠)

(1) 組換え体 HCV の粒子産生細胞からコンディショナルに粒子産生を誘導できる培養系を構築した。

(2) 感染性粒子産生を修飾する薬剤、siRNA の検討をおこない、いくつかの候補薬剤を見いだした。

・研究分担者(今村道雄・茶山一彰)

(1) 申請者らが作製した HCV 全長 KT9 クローンの core 領域に変異を加え、マウスへの感染実験を行って感染性、増殖性が同等であることを明らかにした。IFN の効果を解析中。

・研究分担者(高倉喜信)

(1) 遺伝子を含まない生理食塩水をハイドロダイナミクス法により投与することにより、あらかじめ肝細胞に導入した遺伝子が再活性化される現象を見出した。

(2) siRNA 発現ベクターを肝細胞に導入することで、RNA 干渉効果を in vivo で誘導可能であることを明らかにした。

(3) IFN- γ の持続型発現ベクターを開発し、単回投与でマウスおよびヒト IFN- γ を長期間に渡り治療有効レベルに保持できることを明らかにした

・研究分担者(本田政夫・茶山一彰)

(1) ヒト肝細胞キメラマウスに B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスを感染させ、cDNA マイクロアレイによる解析を行い、両ウイルスによる遺伝子の誘導プロファイルが異なることを明らかにした。

・研究分担者(前川伸哉)

(1) HCV 全翻訳領域の検討で、著効群と非著効群の違いは、ISDR-PKR-BD を含む NS5A2209-2285 の 77 アミノ酸領域と Core70 の 1 アミノ酸に顕著な違いが認められることを明らかとした。

・研究分担者(吉里勝利・茶山一彰)

(1) 茶山研究代表者研究室で作製された精製用のタグを含む HCV core タンパク質 mutant を導入した細胞を用いて、Interactome 探索を実施し、いくつかの候補タンパク質の同定に成功した。

IV. 21~22年度の課題

- (1) IFN 抵抗性の HCV に対するプロテアーゼ阻害剤併用の効果、プロテアーゼ耐性株に対する IFN 併用の効果を検証し、難治例に対する対策を明らかにする。
- (2) 多剤耐性の B 型肝炎ウイルスに有効な薬剤を明らかにする。多剤併用の効果も明らかにする。
- (3) ウイルス増殖に必要な宿主蛋白を引き続き探索する。同定された蛋白をターゲットとした治療薬を探索する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 小動物を用いた薬剤開発のツールを提供し国民的問題である肝炎の新規治療の開発に貢献できるようになった。
- (2) 創薬のシーズを複数分子発見し、日本発の新規治療薬開発の可能性を示した。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者 茶山一彰、研究分担者 吉里勝利、研究分担者 今村道雄

1. Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato Y, Chayama K. G to A hypermutation in hepatitis B virus and clinical course of patients with chronic hepatitis B. *J Inf Dis* 2009(in press).
2. 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
3. Utoh R, Tateno C, Yamasaki C, Hiraga N, Kataoka M, Shimada T, Chayama K, Yoshizato K. Susceptibility of chimeric mice with livers repopulated by serially subcultured human hepatocytes to hepatitis B virus. *Hepatology* 2008

研究分担者 金子周一

1. Ura S, Honda M, Yamashita, Kaneko S. Differential miRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to HCC. *Hepatology* (in press)
2. R Teramoto, H Minagawa, M Honda, K Miyazaki, Y Tabuse, K Kamiyo, T Ueda, S Kaneko. Protein expression profile characteristic to hepatocellular carcinoma revealed by 2D-DIGE with supervised learning. *Biochim Biophys Acta* 1784(5):764-772, 2008.
3. H Minagawa, M Honda, K Miyazaki, Y Tabuse, R Teramoto, T Yamashita, R Nishino, H Takatori, T Ueda, K Kamiyo, and S Kaneko. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 366(1):186-192, 2008.

研究分担者 高倉喜信

1. M Nishikawa, A Nakayama, Y Takahashi, Y Fukuhara, Y Takakura. Reactivation of Silenced Transgene Expression in Mouse Liver by Rapid, Large-volume Injection of Isotonic Solution. *Human Gene Therapy*, in press (2008)

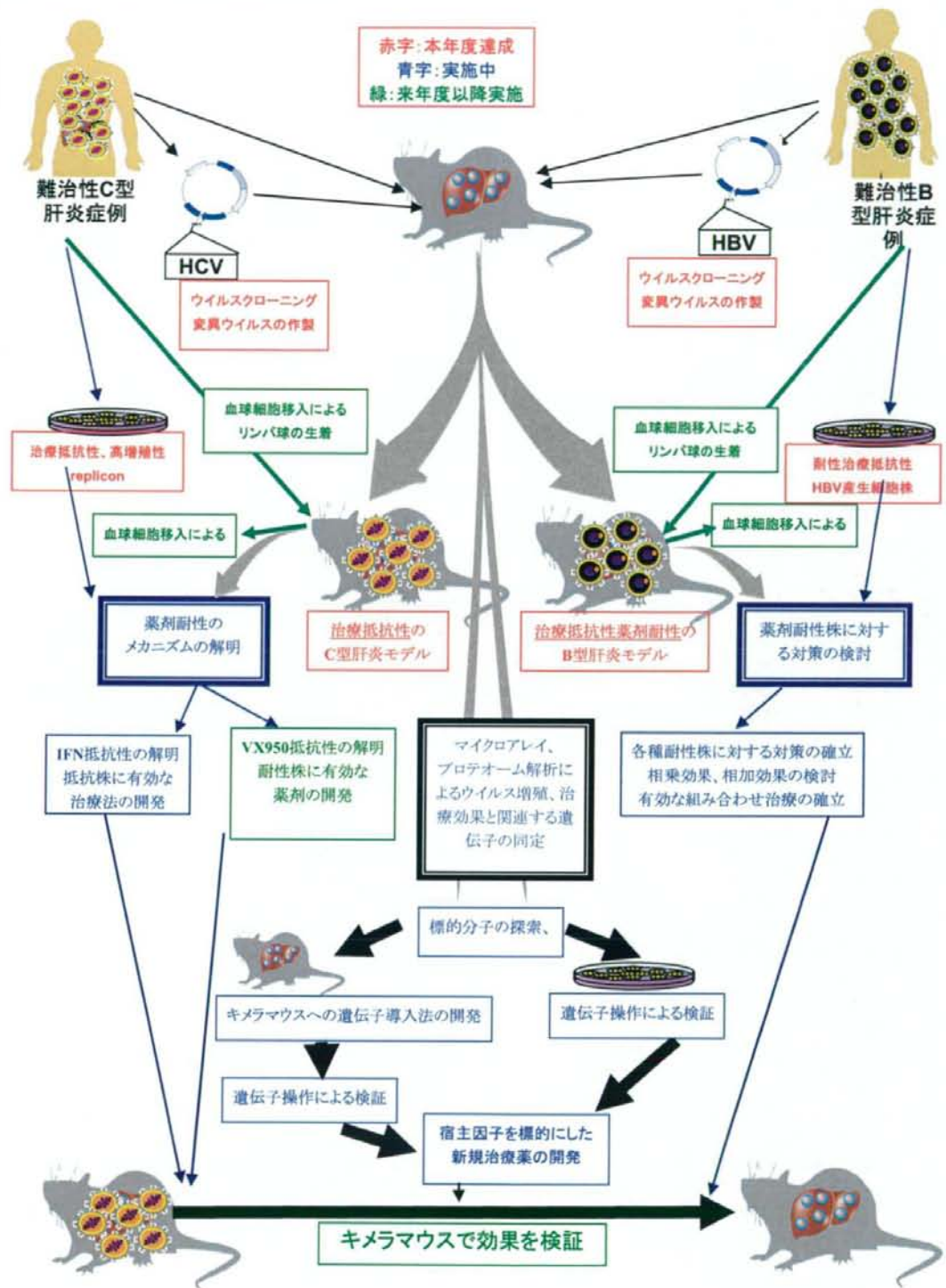
研究分担者 前川伸哉

1. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, 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 Inf Dis*. 2008
2. 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

研究分担者 松浦善治

1. Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Hanada K, Matsuura Y, Lai M. M. C, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol* 2008
2. Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J Virol* 2008.
3. Tagawa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol* 2008.

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等



○研究代表者の研究歴等**・過去に所属した研究機関の履歴**

1981年-1986年、耳原病院消化器科医員、
 1986年-2000年、虎の門病院消化器科、医員、医長
 2000年9月-2002年3月、広島大学内科学第一講座教授
 2002年4月-現在、広島大学大学院、医歯薬学総合研究科教授

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

熊田博光(虎の門病院分院院長)、吉澤浩司(広島大学名誉教授)、脇田隆字(国立感染症研究所ウイルス第2部部長)、Jake Liang (Chief of the Liver Diseases Branch, HIDDK, NIH)、中村祐輔(東京大学医科学研究所教授)、松浦善治(大阪大学微生物学研究所所長)、溝上雅史(国立国際医療センター国府台病院・肝炎・免疫研究センター長)、金子周一(金沢大学教授)、Jia-Hong Kao(Professor of National Taiwan University)。

・主な研究課題

1. B型肝炎ウイルスの増殖と制御に関する研究
2. C型肝炎ウイルスの増殖とインターフェロン治療効果との関連の研究
3. 慢性肝炎の治療に関する研究
4. 肝細胞癌の治療と再発防止に関する研究
5. 消化器癌の形態学的、分子病理学的研究、内科学(消化器、循環器内科学)に関する研究

・これまでの研究実績

特許申請

(特願2008-305643)インターフェロン療法の効果予測用マーカーおよびインターフェロン作用増強剤のスクリーニング方法

(特開2007-332103) 発明の名称 HCVの治療剤または予防剤

(特許番号2869759) C型肝炎ウイルスの検査方法およびそれに用いるプライマーセット

論文

1. Tsukada H, Chayama K et al. Polymorphism in MAPKAPK3 gene affects interferon therapy for chronic hepatitis C. Gastroenterology 2009 (in press)
2. Mori N, Chayama K et al. A randomized trial of high-dose interferon-alpha-2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C. J Med Virol 2009(in press)
3. Noguchi C, Chayama K et al. Title: G to A hypermutation in hepatitis B virus and clinical course of patients with chronic hepatitis B. J Inf Dis 2009 (in press)
4. Utoh R, Chayama K. et al. Susceptibility of Chimeric Mice with Livers Repopulated by Serially Subcultured Human Hepatocytes to Hepatitis B Virus. Hepatology 2008
5. Kimura T, Chayama K et al. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. Journal of General Virology 2008
6. Kodama M, Chayama K et al. Vascular endothelial growth factor C stimulates progression of human gastric cancer via both autocrine and paracrine mechanisms. Clin Cancer Res. 2008
7. Hiraga N, Chayama K et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. FEBS Lett. 2007
8. Tsuge M, Chayama K, et al A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers. Nature Genetics. 2005
9. Soetikno R, Chayama K, et al. Nonpolypoid colorectal neoplasms. Gastroenterology. 2006
10. Imamura M, Chayama K, et al. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. Gastroenterology. 2005;
11. Hatakeyama T, Chayama K. et al Serum HBV RNA is a predictor of early emergence of the YMDD mutant in patients treated with lamivudine. Hepatology. 2007;
12. Tsuge M, Chayama K, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. Hepatology. 2005
13. Noguchi C, Chayama K. et al. G to A hypermutation of hepatitis B virus. Hepatology. 2005
14. Higashi Y, Chayama K. et al. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. New England Journal of Medicine. 2002
15. Chayama K, Suzuki F. et al. Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. Hepatology. 2000

平成20年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝炎ウイルスワクチン実用化のための基盤的研究

課題番号：H20-肝炎一般-010

研究代表者：石井 孝司

I. 研究の意義

- (1) C型肝炎ウイルス(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る。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少しているが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待され、HCVのワクチン開発が望まれている。
- (2) HCVワクチンが、HCV感染に対する新たな予防法および治療法となれば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できると考えられる。また、予防用ワクチンを世界に先駆けて開発することにより、HCVキャリア率の高い国々への国際協力が可能となる。医療関係者だけでなく、薬物常用者などへの接種も考えられる。最近ではHIV感染においてHCVの重感染が問題となっている。このためHIV感染者に対する感染防御も必要である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) ワクチン実用化に向けたウイルス産生法および精製法向上
- (2) 効果的な免疫法の検討
- (3) Genotypeに関わらず感染中和活性を誘導できるワクチンの開発
- (4) ウイルス様中空粒子産生系およびウイルス抗原を用いた安全な組換えワクチンの開発
- (5) ワクチン効果を実証できる動物モデルの開発
- (6) 感染中和機構に重要なHCVの初期感染過程の解析

III. 1年間の研究成果

・研究代表者(石井孝司)

- (1) ヒト肝癌由来細胞を用いて、HCV中空粒子を恒常的に産生する系を確立した。
- (2) 上記の中空粒子に感染性があることを証明した。
- (3) 中空粒子中に外来遺伝子を包埋し、感染細胞で目的遺伝子を発現させることに成功した。

・研究分担者(脇田隆宇、中村紀子)

- (1) 細胞培養系で作製したJ6/JFH1ウイルスを用いて、新しい精製方法の検討を行った。J6/JFH1ウイルスを効率よく除蛋白する手法を確立した。さらに、これらのサンプルを密度勾配分画することにより効率よく精製でき、これまでの精製方法と比較して、純度の向上が認められた。
- (2) JFH-1ウイルスで免疫したマウス由来モノクローナル抗体を用いてJFH1の感染阻害活性を測定したところ、ウイルスの細胞への結合阻害活性を持つ抗体を得た。また、本抗体の中和エピトープを同定したところ、HCVの遺伝子型間で相同性の高い箇所であることが分かった。

・研究分担者(明里宏文)

- (1) GBV-B急性感染期を経たサル個体について長期経過観察を行ったところ、2頭のGBV-B接種マーマセットにおいて3年以上の長期に渡り回帰的に血中ウイルスRNAが検出され、高い抗体価を維持していること、また回帰的に増加する血中ウイルス量と相関して肝炎マーカーの上昇が認められたことから、GBV-Bはマーマセットにおいて長期持続感染し慢性肝炎を呈することが明らかとなった。

・研究分担者(加藤孝宣)

- (1) HCVの細胞内での複製やウイルス分泌を増加させる適応変異の同定のため、JFH-1株を培養細胞に導入し、長期培養することで適応変異の誘導を検討した。いくつかの適応変異の候補が同定されたが複製増殖能への影響は認めず、他の何らかのファクターが関与していると考えられた。チンパンジー感染実験で認めた生体内での適応変異についても培養細胞内での検討を行った。この変異の導入により培養細胞内でのJFH-1株のウイルスのアセンブリ効率の上昇が確認されたが、この効果はJ6/JFH-1のキメラ株では認めず、適応変異の影響はHCVの株ごとに異なっていると考えられた。

・研究分担者(松本美佐子)

- (1) HCV/JFH1株を用いた感染実験より、HCVの樹状細胞への感染は認められなかったが、アボトーシスを起こしたHCV感染肝細胞を骨髄系樹状細胞が取り込み、TLR3-TICAM-1依存的シグナルでNK細胞を活性化することを明らかにした。

IV. 21~22年度の課題

- (1) ウイルス培養系におけるウイルス産生の向上とウイルス精製法の改良。
- (2) キメラマウスを用いた、生体における中和抗体の感染防御能の検討。
- (3) GBV-B 急性・慢性肝炎発症サルにおける中和抗体価や細胞性免疫応答能の定量的解析システムを確立する。
- (4) JFH-1 株の長期培養により得られた適応変異を持った JFH-1 株を限界希釈法でクローニングすることにより、マイナークローンの影響を排除し単独で強い複製増殖能を持った株の確立を目指す。
- (5) HCV の自然免疫応答を明らかにし、TLR、RLR の分布と肝実質細胞の HCV 感染と IFN 応答の関係を解析する。HCV 感染実験は JFH1 株を用いるが、他の増殖性クローンが確立されればそれも用いる。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 感染予防が可能なワクチンが開発できれば、医療従事者などのハイリスクグループに対処することが可能となる。
- (2) 中和抗体による感染防御が可能となれば、針刺し事故などの医療事故にも対処可能となる。
- (3) 予防用ワクチンを世界に先駆けて開発することができれば HCV キャリアー率の高い国々への国際協力が可能となる。特に海外に多い薬物常用者の HCV 感染や HIV 感染者の HCV 重感染の予防が可能となりその意義は大きい。
- (4) 治療用ワクチンの開発も期待されている。HCV の新たな治療法となれば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

主任研究者 石井孝司

1. Ishii K., Murakami K., Hmwe S., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 446-450 (2008)
2. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection*, 9, 515-521 (2007)
3. Murakami K., Ishii K., Ishihara Y., Yoshizaki S., Tanaka K., Gotoh Y., Aizaki H., Kohara M., Yoshioka H., Mori Y., Manabe N., Shoji I., Sata T., Bartenshalager R., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology* 351: 381-392 (2006)

分担研究者 脇田隆子

1. 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: 7964-76.
2. 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: 5715-24.
3. Murayama A., Date T., Morikawa K., Akazawa D., Miyamoto M., Kaga M., Ishii K., Suzuki T., Kato T., Mizokami M., Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J Virol.* 2007 81: 8030-40.

分担研究者 明里宏文

1. Akari H., Iwasaki Y., Yoshida T., Iijima S. Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection. *Microbiology and Immunology*, in press.
2. Yokota T., Iijima S., Kubodera T., Ishii K., Katakai Y., Aageyama N., Chen Y., Lee Y.-J., Unno N., Nishina K., Iwasaki Y., Maki N., Mizusawa H. and Akari H.: Efficient regulation of viral replication by systemically administered siRNA with cationic liposome in a non-human primate surrogate model for hepatitis C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361, 294-300 (2007)
3. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Aageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Terao K., Miyamura T. and Akari H.: GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues *in vivo*. *Microbes and Infection* 9, 515-521 (2007)

分担研究者 加藤孝宣

1. Kato T., Choi YK, 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*, 48: 732-740 2008.
2. Kato T, Matsumura T, Heller T, Saito S, Sapp RK, Murthy K, Wakita T, Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J Virol*, 81: 4405-4411 2007.
3. Kato T, Date T, Murayama A, Morikawa K, Akazawa D, Wakita T. Cell culture and infection system for hepatitis C virus. *Nat Protoc*, 1: 2334-2339 2006.

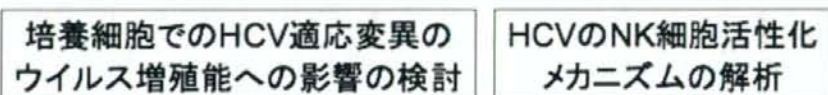
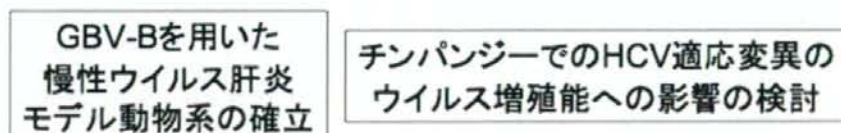
分担研究者 中村紀子

1. Akazawa D., Date T., Morikawa K., Murayama A., Omi N., Takahashi H., Nakamura N., Ishii K., Suzuki T., Mizokami M., Mochizuki H. and Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371: 747-751 (2008)

分担研究者 松本美佐子

1. Oshiumi, H., M. Matsumoto, S. Hatakeyama, and T. Seya. 2008. Riplet/RNF135, a RING-finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon- β induction during the early phase of viral infection. *J. Biol. Chem.* (in press).
2. Matsumoto M., and T. Seya. 2008. TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *ADDD* 60: 805-812.
3. Ebihara, T., M. Shingai, M. Matsumoto, T. Wakita, and T. Seya. 2008. Hepatitis C virus (HCV)-infected apoptotic cells extrinsically modulate dendritic cell function to activate T cells and NK cells. *Hepatology*. 48: 48-58.

VII. III (1年間の研究成果)の概要図等

C型肝炎ワクチン候補の作成と検討**細胞培養系での感染防御メカニズムの検討****HCV感染動物モデルの作成と応用**

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

(所属)	(職 名)	(在職期間)
帝人生物医学研究所	研究員	平成1年～6年
国立予防衛生研究所 (現・国立感染症研究所)	研究員	平成7年～11年
米国衛生研究所 (NIH)	research fellow	平成11年～13年
国立感染症研究所	主任研究官	平成13年～20年
国立感染症研究所	室長	平成20年～現在

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

帝人生物医学研究所	所長：島 武男
国立予防衛生研究所	部長：宮村達男
米国衛生研究所 (NIH)	Director: Bernard Moss
国立感染症研究所	部長：脇田隆宇

・主な研究課題

- C型肝炎ウイルス(HCV)の研究
 - C型肝炎の動物モデルに関する研究
 - HCVの粒子形成機構に関する研究
- ボックスウイルスの研究
 - ボックスウイルスのベクターとしての応用研究

・これまでの研究実績

1. Ishii K., Murakami K., Hmw S., Zhang B., Li J., Shirakura M., Morikawa K., Suzuki R., Miyamura T., Wakita T. and Suzuki T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 371: 446-450 (2008)
2. Ishii K., Iijima S., Kimura N., Lee Y.-J., Ageyama N., Yagi S., Yamaguchi K., Maki N., Yoshizaki S., Machida S., Suzuki T., Iwata N., Sata T., Miyamura T. and Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: Distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. **Microbes and Infection**, 9, 515-521 (2007).
3. Ishii K. Vaccines for severe acute respiratory syndrome. **SARS**, Mizutani T. ed.: 107-117, Transworld Research Network, Kerala, India (2006).
4. Ishii K., Hasegawa H., Nagata N., Mizutani T., Morikawa S., Tashiro M., Suzuki T., Taguchi F., Takemori T., Tsunetsugu-Yokota Y. and Miyamura T. Induction of Protective Immunity against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus (SARS-CoV) Infection using Highly Attenuated Recombinant Vaccinia Virus DIs. **Virology** 351: 368-380 (2006).
5. Ishii K., and Moss B. Mapping Interaction Sites of the A20R Protein, a Component of the Vaccinia Virus DNA Replication Complex. **Virology** 303: 232-239 (2002).
6. 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).
7. Ishii K., and Moss B. Role of vaccinia virus A20R protein in DNA replication: Construction and characterization of temperature-sensitive mutants. **Journal of Virology** 75: 1656-1663 (2001).
8. Ishii K., Tanaka Y., Yap C.-C., Aizaki H., Matsuura Y., and Miyamura T. Expression of hepatitis C virus NS5B protein: Characterization of its RNA polymerase activity and RNA binding. **Hepatology** 29:1227-1235 (1999).
9. Ishii K., Rosa D., Watanabe Y., Katayama T., Kiyosawa K., Aizaki H., Matsuura Y., Houghton M., Abrignani S., and Miyamura T. High titres of envelope neutralizing antibodies correlate with spontaneous resolution of chronic hepatitis C. **Hepatology** 28: 1117-1120 (1998).
10. Ishii K., Yamagami S., Tanaka H., Motoki M., Suwa Y., and Endo N. Full active Baculovirus expressed human monocyte chemoattractant protein 1 with the intact N-terminus. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 206: 955-961 (1995).
11. Ishii K., Iwasaki M., Inoue S., Kenny P.T.M., Komura H., and Inoue Y. Free sialooligosaccharides found in the unfertilized eggs of a freshwater trout, *Plecoglossus altivelis*. A large storage pool of complex-type bi-, tri-, and tetraantennary sialooligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry** 264: 1623-1630 (1989).