

200933010B

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

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

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 金子周一

平成22 (2010) 年3月

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

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

平成19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 金子 周一

平成22（2010）年 3月

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

研究組織

研究代表者		
金子 周一	金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	教授
研究分担者		
竹原 徹郎	大阪大学大学院医学系研究科・消化器内科学	准教授
坪内 博仁 (平成19年度)	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座 消化器疾患・生活習慣病学	教授
宇都 浩文 (平成20年度～)	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座 消化器疾患・生活習慣病学	講師
前川 伸哉	山梨大学大学院医学工学総合研究部	講師
田中 靖人	名古屋市立大学大学院医学研究科	教授
花田 賢太郎	国立感染症研究所・生化学	部長
菅 裕明	東京大学先端科学技術研究センター	教授
堀本 勝久	独立行政法人産業技術総合研究所生命情報工学研究センター 生体ネットワークチーム	研究チーム長

目 次

I. 総合研究報告

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

金子 周一 ----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 23

I. 総合研究報告

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

研究代表者：金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系 教授

研究要旨：

ウイルス性肝炎における包括的転写産物および蛋白解析、包括的脂質解析、包括的薬物探索、統計的ジェノミクス解析を実施した。研究の技術的要素は、1) トランスクリプトーム（翻訳）研究、2) プロテオームおよびリピドーム研究、3) ジェノミクス情報処理の研究に分類され、解析対象は治療前後のウイルス肝炎肝組織（肝細胞）、キメラマウス肝臓、肝細胞がん、血液、および免疫系を用いた。

B型とC型慢性肝炎における発現遺伝子のプロファイルに加えてmicro-RNAの発現プロファイルが両者で有意に異なっており、疾病の進行と関連するmicro-RNAが見いだされた。インターフェロン感受性とインターフェロン誘導遺伝子との関係を明らかにし、診断に用いる候補マーカーを抽出した。IL28B領域の遺伝子多型とインターフェロン誘導遺伝子の関係を示した。これらの結果を用いることによって末梢血を用いた新しい診断法が開発できることを示した。末梢血を用いた発現遺伝子およびプロテオーム解析によって肝がん診断が可能であることを示した。治療薬の標的を探索する研究として、ウイルス複製における脂肪代謝、およびオートファジーの分子機構が抗HCV薬の標的となりうることを明らかにした。B型肝炎ウイルス感染キメラマウスを用いることによって、肝線維化の進展阻止を標的とする可能性を見いだした。肝硬変及び肝がん細胞において計測されたデータに適用し進展要因遺伝子ネットワーク群を同定することに成功した。C型肝炎ウイルスの標的蛋白質に対する環状特殊ペプチド薬物候補を獲得することができた。

A. 研究目的

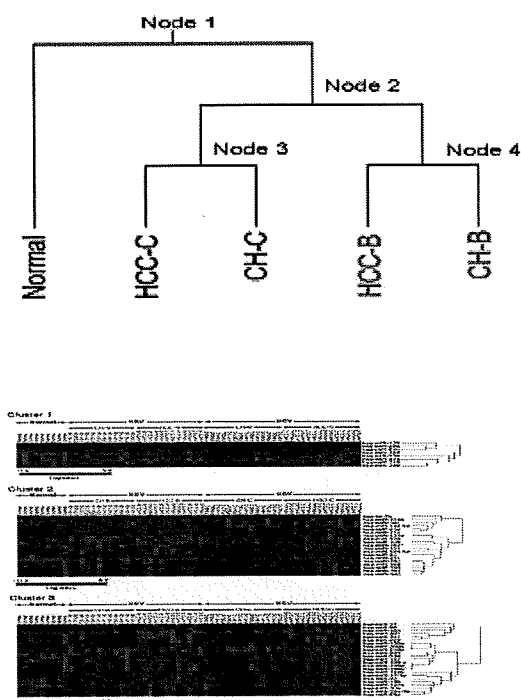
ウイルス性慢性肝炎に対する治療法は、高額で長期にわたり、また副作用も大きい。しかるにその治療効果は限られており、個々の患者に適した治療法を選択することはむずかしい。そこで本研究は、最新の科学技術を用い、1) 最適の治療法を選択する

ための分子指標を用いた診断法の開発、2) 治療効果の正確な予測を行うための分子を用いた診断法の開発、3) 分子を用いた新たな治療法の研究開発を行うことを目的とした。

B. 研究方法と結果

(1) B型およびC型肝炎におけるmicro-RNA分子の解析 (金子)

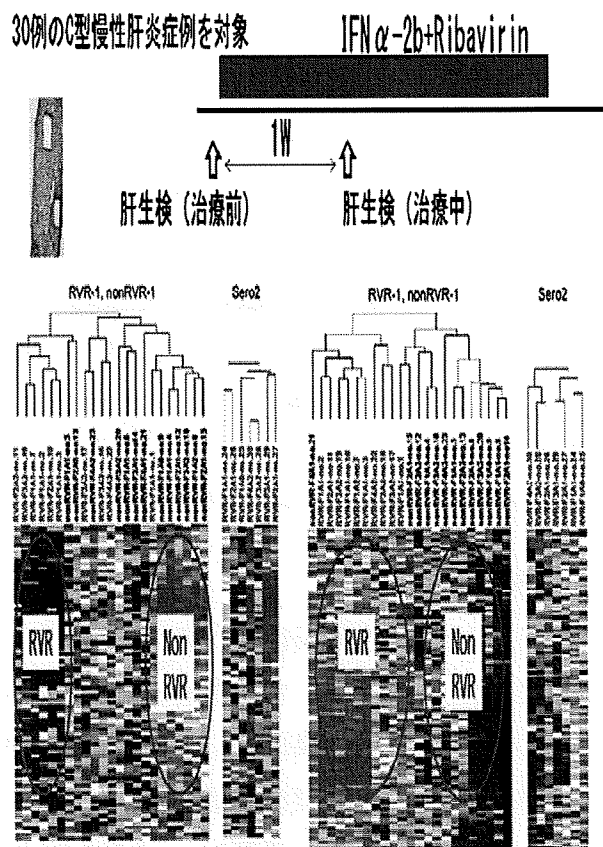
12例のB型慢性肝炎、14例のC型慢性肝炎における肝細胞がんおよび背景肝病変を対象として188種類のmicro-RNAを解析した。包括的な解析では下図に示すように hierarchical clustering解析にても、B型およびC型の慢性肝炎および肝細胞がんが分類された。



それらは、上図に示すように、正常と慢性肝疾患はcluster 1 micro-RNAによって、B型とC型はcluster 2 micro-RNAによって、さらに慢性肝炎と肝細胞がんはcluster 3 micro-RNAによって分類されていた。このように、B型およびC型の慢性肝炎および慢性肝炎と肝細胞がんの病態はmicro-RNAによっても分類されることから、micro-RNAの発現が疾病の成立に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(2) C型慢性肝炎に対するインターフェロンの投与によって変動する遺伝子の解析 (金子)

インターフェロン α ・リバビリン療法を行ったC型慢性肝炎症例30例を対象に治療前と治療後1週における肝生検を行いレーザーキャプチャーダイセクションを用いて肝細胞と浸潤リンパ球組織を得て核酸を抽出し、DNAチップを用いて包括的に発現している遺伝子を解析した。インターフェロン投与によって変動する遺伝子を抽出し (interferon stimulated genes: ISGs)、治療開始4週後における血液中ウイルス量の変動から rapid viral response (RVR) 群と、それ以外 non-RVR 群に分けて検討を行った。



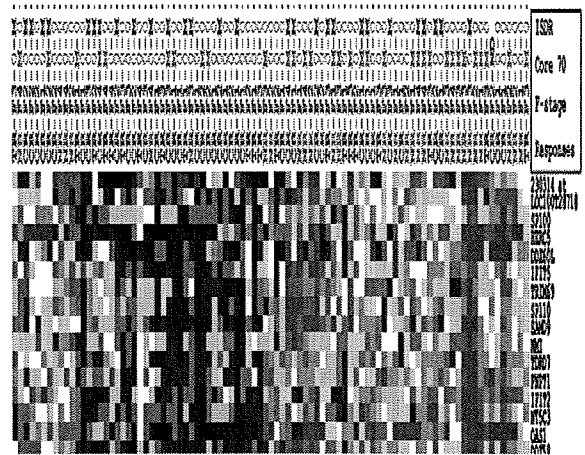
インターフェロン投与によってウイルス

量が低下する serotype 1 の RVR 群は上図の左に示すように治療前の肝細胞において ISGs の発現が高くないものの、投与後は右のように ISGs の発現が高くなっていた。一方、ウイルス量が低下しない Non-RVR 群では上図の左のようにインターフェロン治療前においてすでに肝細胞における ISGs の発現が高く、インターフェロンが投与されても ISGs の発現上昇は低かった。しかし、serotype 2 の症例では治療前の ISGs 発現量にかかわらず RVR を示した。リンパ球においては治療後に ISGs の上昇が認められるものの、その変動幅は大きくなく、また、治療効果との関係もなかった。

即ち、C型慢性肝炎に対するインターフェロンの抗ウイルス効果は ISGs によって引き起こされると考えられるが、ウイルス量が8週の早期に低下しない群では、治療前から ISGs の発現が上昇しておりインターフェロン投与後の ISGs 発現の誘導が小さいことが有効性の低下に関連していることが示唆された。

(3) C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン療法の治療効果と関連する分子の解析 (金子)

48週のペグインターフェロン・リバビリン療法を行った168例を対象に治療前に肝生検を行った。核酸を抽出しDNAチップを用いて ISGs の発現を解析した。治療効果の判定は治療終了後、6ヶ月に行った。臨床背景に加え、肝組織における線維化、血液中 HCV 量、HCV コア領域、ISDR 領域を加えて統計解析を行った。



上図には ISGs の発現量を示したが、著効が得られた群は左の ISGs が低い群に多く、無効であった群は右の高い群が多かった。このことは、先に示したインターフェロン投与8週の抗ウイルス効果だけでなく、ペグインターフェロン・リバビリン療法が終了後の効果においても、インターフェロン投与前の ISGs の発現量が寄与していることを示していた。

	Odds	95% CI	P value
SVR に寄与する因子			
ISGs (Mx, IFI44, IFIT1) ≤ 3.5	5.50	(2.40-14.5)	0.0002
ISDR (≥ 2)	5.09	(2.50-14.3)	0.0002
HCV-RNA (≤ 1900 KIU/ml)	3.10	(1.31-6.04)	0.0073
F stage (F1-2)	2.73	(1.23-6.80)	0.0336
Age (≤ 58)	2.36	(1.32-6.04)	0.0481

NR に寄与する
因子

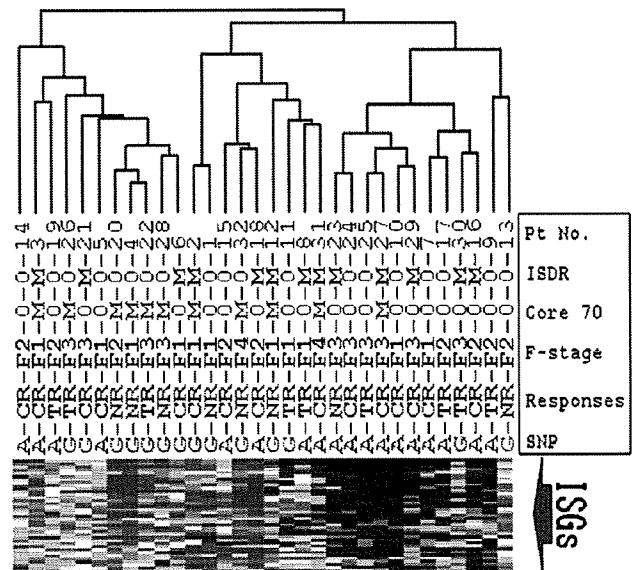
ISGs (Mx, IFI44, IFIT1) >3.5	8.65	(3.92- 20.2)	<0.0001
Core 70M	2.43	(1.08- 5.55)	0.0313

多変量ロジスティック回帰を用いて解析すると 48 週のペグインターフェロン・リバビリン療法の治療効果 SVR に寄与する因子は ISGs、ウイルス ISDR、ウイルス量、線維化、年齢であった。治療効果 NR に寄与する因子は ISGs とウイルスコア 70 番目の変異であった。

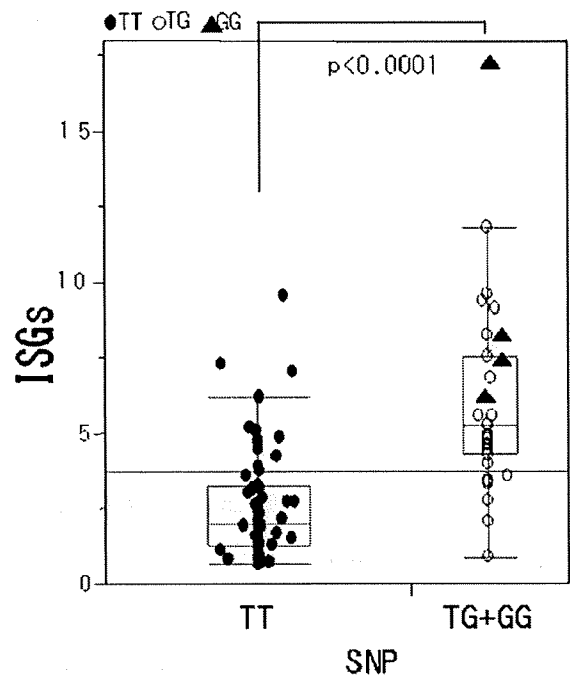
患者の末梢血から核酸を抽出し DNA チップを用いて治療効果との関連を解析した。肝臓を用いた解析と同様に治療効果との関連を認めるプロファイルが得られた。しかし、治療効果との相関は高いものでなかった。診断アルゴリズムを作成し、異なる集団を用いて解析すると、その正解率はさらに低下した。

(4) IL28 領域の遺伝子多型とインターフェロン誘導遺伝子 (ISGs) の関連 (金子)

この解析に用いた症例について IL28 領域の遺伝子多型解析を名古屋市立大学の田中教授班において解析していただき、ISGs を含む各種の因子と治療効果との関連を解析した。



上図に示すように、IL28 領域の遺伝子多型と ISGs の発現量および治療効果の 3 者は良く相関していた。続いて、その変異と ISGs の発現量の関係を解析した。



IL28B 領域の多型が TT を示す群はインターフェロン投与前の ISGs の発現量が低く治療効果が良かった。TG および GG を示す群は ISGs の発現量が高く、治療効果が悪かったことが示された。多変量解析を用いても、IL28B 領域の多型と相関する因子

は ISGs だけとなり、その Odds 比は 17.8 ($p < 0.0001$) という高いものであった。

(5) C型肝炎におけるインターフェロン治療と免疫細胞のシグナル伝達 (竹原)

C 型慢性肝炎患者 (遺伝子型 1 型、高ウイルス量; CHC) を対象とし、末梢血単核球を単離した。IFN- α によって伝達される細胞内シグナルを phospho-STAT1 (pSTAT1)、pSTAT4 の誘導量で FACS にて解析した。IFN- α により誘導される遺伝子発現の程度を、IFN 誘導遺伝子 (ISG) の一つである STAT1 の発現量で FACS 解析にて、*Socs1*、*Perforin*、*Granzyme-b*、*Inf-g* 遺伝子発現で Real-time PCR にて評価した。

細胞内 STAT1 発現量は、NK 細胞において HC に比し CHC で有意に高かった。NK 細胞における IFN- α 刺激で誘導される pSTAT の程度は、HC に比し CHC で pSTAT1 は有意に増強、pSTAT4 は有意に減弱し、STAT1 発現量とそれぞれ有意な正相関、逆相関関係を示した。NK 細胞における IFN- α 刺激による誘導遺伝子発現は、HC に比し CHC で、pSTAT4 シグナル下流の *Inf-g* が有意に減弱し、pSTAT1 シグナル下流の *Socs1* が有意に増強し、*Perforin*、*Granzyme-b* は減弱傾向を認めた。

STAT1 自身がインターフェロン誘導遺伝子 (ISG) の一つであることから治療開始前後の STAT1 発現量の変化を投与されたインターフェロンによって誘導された遺伝子発現とみなした。C 型肝炎患者において、治療開始前の NK 細胞内 STAT1 発現量と、治療開始後 NK 細胞において誘導される遺伝

子発現量とは逆相関関係を示した。すなわち、治療開始前 NK 細胞内 STAT1 発現量が高いほど、誘導される遺伝子発現が減弱していた。

また、治療前 NK 細胞内 STAT1 発現量が比較的高い症例においては、治療開始後 8 週目の血中 HCV-RNA が残存する傾向を、比較的低い症例においては、消失する傾向を認めた。

(6) 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 (前川)

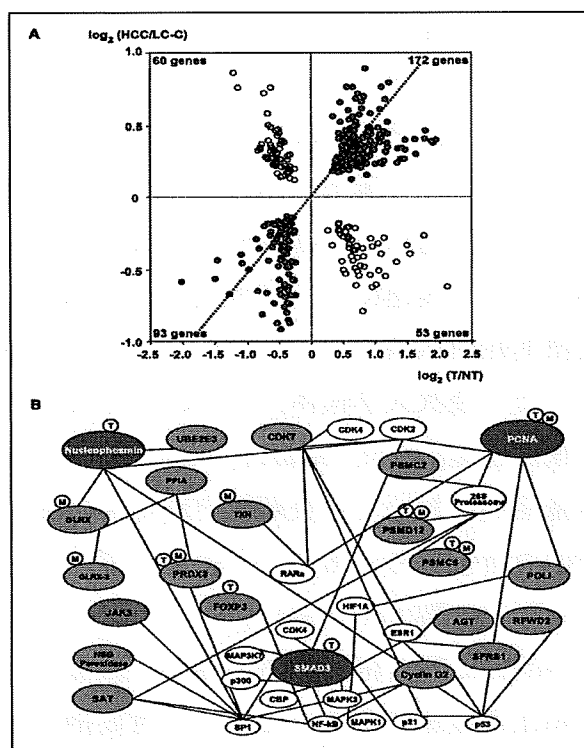
PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した Genotype 1b、高ウイルス量 HCV 患者において末梢血単核球内自然免疫遺伝子群の発現と治療奏効率との関連について検討した症例群の治療開始前血清を用い、HCV 全ゲノムを解析した (武蔵野赤十字病院検体)。PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した Genotype 1b、高ウイルス量 HCV 患者において末梢血単核球発現遺伝子の網羅的発現解析と治療奏効率との関連について検討した症例群の治療開始前血清を用い、HCV 全ゲノムを解析した (金沢大学検体)。PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した Genotype 1b、高ウイルス量症例におい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

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。

PEG-IFN/RBV 併用療法を行った山梨大学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 50 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を行った（山梨大学症例群）。その結果 IL-8、RANTES の治療前の血中濃度が治療反応性に大きく関連することが明らかとなった。

(7) 肝がん組織および血液における発現遺伝子の解析（金子）



肝細胞がん浸潤しているリンパ球と末梢血単核球における発現遺伝子プロファイル解析した。外科切除を行った12例のC型慢性肝炎を背景として発症した肝細胞が

ん材料と、肝細胞がんを伴ったC型慢性肝炎30例、肝細胞がんを伴わない32例の末梢血単核球を解析した。

それらは上図に示すように、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法を用いて、肝細胞がん細胞および浸潤リンパ球を分離し、それぞれにおける発現遺伝子解析を行った。

その結果、末梢血単核球における発現遺伝子のプロファイルは肝細胞がん浸潤しているリンパ球のプロファイルを反映しており、そのスクータープロットを図のAに示した。さらに、個々の遺伝子発現の解析から、Bに示すごとく、肝細胞がん浸潤しているリンパ球と末梢血単核球は相互に関連していた。

(8) ヒト肝組織および末梢血を用いたプロテオーム診断法の開発（宇都）

SELDI TOF/MS プロテオーム解析装置を用いて肝臓患者および非肝臓慢性肝炎患者の血清中に出現するタンパクを網羅的に解析した。検出したタンパクの一部はアミノ酸解析などを行うとともにバイオマーカーとしての有用性を検討した。

初代培養ヒト肝細胞に過酸化水素あるいはPBSを添加し、24時間培養後に細胞質タンパク質を抽出した。抽出した細胞質タンパク質をNBS試薬で標識し、MALDI-TOF/MS解析を行った。6 Da 差のペアピークの同定はMS/MSイオンサーチ法にて行った。

C型肝炎ウイルス関連の肝細胞癌(HCC)患者血清を解析し、HCCで増加も

しくは減少する特異的なタンパクピークを多数見出し、そのうちの7つのタンパクピークを用いてマルチマーカー診断法（決定木）を作成した。作成した診断法（決定木）は、既存のHCCマーカーであるAFPやPIVKA-IIよりもHCCの診断能が優れていた。

HCCで発現が上昇するタンパクの一つがC3aの断片（C3af-8100）で、このC3af-8100の慢性肝疾患におけるHCCの診断能（ROC下面積）は、AFPやPIVKA-IIよりも高かった。さらに、C3af-8100とAFP、PIVKA-IIを同時に測定することにより、HCCを高感度（96%）で検出できた。

初代培養ヒト肝細胞に過酸化水素を用いて酸化ストレスを負荷し、誘導されたタンパクのうちの一つをMnSODと同定した。また、血清MnSOD濃度は健常者もしくは慢性肝炎患者と比較し、肝癌患者で高かった。

血清MnSOD濃度は肝癌患者の中ではChild AよりもChild BもしくはCの患者で、Liver Damage AよりもLiver Damage BもしくはCの患者で高く、肝予備能と関連していた。一方、C型慢性患者ではインターフェロン治療により、血清中のMnSODは低下し、インターフェロン治療による酸化ストレスの改善を反映していると考えられた。

（9）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（花田）

HCVコアタンパク質発現により変動する宿主タンパク質のプロテオーム解析を行った。培養細胞は、Huh7細胞由来のUc321

（コントロール用コアタンパク質非発現細胞）、Uc39-2及びUc39-6細胞（コアタンパク質発現細胞）等を用いた。HCV感染培養細胞系はHuh7.5.1細胞にHCV（JFH-1株）を感染させる系を用いた。

脂肪滴産生・リポファジーに関与するオートファジー関連分子のHCV産生に対する影響について、RNAiによるオートファジー分子のノックダウンによる細胞内HCVmRNA・HCV関連タンパク質産生およびHCV粒子産生への影響を調べた。

Uc321及びUc39-6細胞の脂質ラフト画分（界面活性剤不溶性画分）を用いた比較プロテオーム解析の結果、Uc39-6細胞（コアタンパク質発現細胞）においてvimentinの顕著な減少、ケラチン19の増加を見いだした。

vimentin発現抑制細胞ではプロテアソーム依存的なコアタンパク質の分解が強く阻害されていることが明らかとなった。また、vimentinとコアタンパク質が細胞内で相互作用することも明らかとなった。vimentin発現量をsiRNAにより抑制すると、ウイルス産生量が上昇し、ベクターによりvimentinを過剰発現した細胞ではウイルス産生量が低下していることが明らかとなった。

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 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。

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。

オートファゴソームのマーカ分子である LC3-リン脂質結合体 (LC3-II) の蓄積が認められた。リソソームの主要タンパク質分解酵素群 (カテプシン B、D、L) の阻害剤を用いて LC3-II のリソソーム分解を調べたところ、リソソームにおける LC3-II 分解が抑制されていた。

Atg7 ノックダウンにより、培地中に放出される HCV 粒子の量が減少していた。オートファジー関連分子は分泌経路には影響せず、HCV 粒子細胞外放出に特異的に影響することが示唆された。

(10) 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 (田中)

臨床病態の違いが知られている HBV 遺伝子型 3 種類 (A、B、C) をクローン化し、ウイルス粒子を作製した。それらを一旦キメラマウスに感染させて、感染血清を回収し感染源として保存した。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 遺伝子型が肝臓に及ぼす影響を比較検討した。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。HBV 感染による線維化進展群と非進展群、HBV の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い、見出された遺伝子経路について、リアルタイム PCR や組織

染色を実施して、確認実験を行った。

各 HBV 遺伝子型が感染したキメラマウスの血中ウイルス量を定量したところ、HBV/C が感染した群では有意差を持って早期にウイルスが増殖し、HB コア抗原の産生量が最も高かった。逆に HBV/A ではウイルスの増殖は遅いものの、HBs 抗原が最も高い値を示し、各遺伝子型により違いが認められた。それらの肝組織像にも違いが認められ、コア抗原の高いもので線維化の進展が観察された。肝臓内での活性酸素種の発現を定量したところ、線維化群で高発現を確認した。

線維化進展群と非進展群についてマイクロアレイによる解析を実施し、TLR4 経路が線維化に寄与することを見出した。TLR4 と下流に位置する遺伝子について発現解析を実施したところ、線維化群において有意に発現上昇が認められ、IL6 とその下流に位置する TIMP1 についても発現上昇を確認した。他にも、MMPs、COL1A2 といった線維化関連遺伝子の有意に高い発現上昇を確認した。CD163 と TLR4 に対する抗体で蛍光染色を実施したところ、一致した蛍光を確認でき、主な発現を担う細胞は単核球であると考えられ、好中球の浸潤も確認できた。コントロールとして、TLR3、9 を定量したがこれらの発現に差は認められなかった。

(11) 統計的因果推定法に基づくジェノミクス解析法の研究 (堀本)

グラフィカルモデル及び代数的手法に基づくネットワーク推定法を肝臓がんについて

計測されたデータに適用し、表現型変化に対応する分子ネットワーク変化をグラフ表現する。

グラフィカル連鎖モデルと経路整合性アルゴリズムの組み合わせによる細胞変化の要因遺伝子ネットワークの同定法、ガウシアンネットワークによる既知大規模ネットワークから特定条件下で活性化されるサブネットワークの同定法、代数算法によるネットワーク動態における（特に非計測分子を含む場合）パラメータ最適化の推定精度向上法を開発した。

（12）ジェノミクス技術による新規薬剤リードの探索研究（菅）

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、薬剤探索にあてた。その技術をディスプレイ法と組み合わせた RaPID ディスプレイ法を開発し、標的蛋白質への阻害剤の迅速探索を行った。

開発した RaPID ディスプレイ法を用いて、HCV 関連標的 NS5A (His)、LEL (GST-biotin) ドメイン（括弧内は固定タグを示す）への特殊環状ペプチド阻害剤探索を行った。また、La 蛋白質 (His) の発現・精製も平成 21 年度に行った。NS5A に対しては特殊環状ペプチドの濃縮に成功し、特殊ペプチドの配列情報を取得した。代表的なペプチドに関して化学合成を行い、ヴィトロでの結合活性を観測した結果、最も良い結合能力をもつもので、約 50nM の解離定数をもっていることが判明した。

（倫理面の配慮）

臨床試験に関わる研究、ヒト材料を用いる研究、および動物実験は各種の指針を遵守して行った。

C. 考察

2009 年に国内外の 3 カ所のグループから同時に IL28B 領域の遺伝子多型と 48 週のペグインターフェロン・リバビリン療法の治療効果との密接な関係が示された。この結果は生まれつきインターフェロン療法の治療効果が規定されていることを示しており、大きな衝撃を持って迎えられた。しかし、その機序は不明であり、これまで治療効果との関係が示されたウイルス量、ウイルス変異、肝線維化との関連が問題となった。

C 型慢性肝炎に対するインターフェロンの治療効果はインターフェロン誘導遺伝子 (ISGs) の発現に引き続くタンパクによって高ウイルス効果が示されることがわかっている。

今回の研究によって、IL28B 領域の遺伝子多型と ISGs とが Odds 比 17.8 で相関していることが示され、両者の密接な関係が明らかとなった。

ISGs が治療前から発現量が多い状態はウイルスに対する反応が高まっていることを示唆する。効ウイルス活性を示すタンパクの活性が高まっているかを確認する必要があるものの、ISGs が高い状態ではウイルスコア 70 番が変異を示す可能性が考えられた。これらの結果と関連して、末梢血の発現遺伝子、サイトカイン、発現タンパ

クを用いて、インターフェロン治療の効果を予測する診断法が開発される可能性が示された。

さらに、血液のタンパクを用いる方法によって従来は診断が困難であった肝細胞癌の早期診断や経過観察が出来る可能性が明らかとなった。また、酸化ストレスのマーカーが見いだされたことは今後の展開が期待される。

肝がん周囲に浸潤している単核球の発現遺伝子プロファイルは末梢血における発現遺伝子プロファイルと相同していた。このことは、末梢血の発現遺伝子プロファイルの解析によって、肝がんの存在診断、病態診断、予後の解析などの診断法を開発できる可能性が示している。

活性酸素種が脂質を酸化し TLR4 のリガンドとなることが知られていることから、線維化群で見られた活性酸素種の高発現がこの線維化進展に寄与していることが考えられたため、今後は過酸化脂質の定量とリガンドとしての機能を評価する必要がある。

vimentin-コアタンパク質相互作用部位が抗 HCV 薬の標的となりうること、オートファジー分子に注目した HCV 治療法・薬剤の研究はきわめてユニークなものになる可能性が示された。

RaPID ディスプレイ法を用いることで、HCV 関連標的への環状特殊ペプチドの探索が可能であることが示された。TLR4 経路は線維化群において高発現しており、有力な原因経路であると考えられた。

ウィルス感染や疾患進展など表現型変化に伴う細胞内分子ネットワーク構造変化を

推定する 3 つの数的手法を開発することで、表現型変化に対応する分子ネットワーク変化解析が可能となった。

D. 結論

- (1) B 型と C 型慢性肝炎肝組織における micro-RNA の発現プロファイルは両方で有意に異なっており、疾病の進行と関連する micro-RNA が見いだされた。
- (2) インターフェロン感受性と関与する C 型肝炎におけるインターフェロン誘導遺伝子を明らかにし診断の候補マーカーを抽出した。
- (3) IL28B 領域の遺伝子多型とインターフェロン誘導遺伝子の関係を明らかにした。
- (4) 末梢血を用いてインターフェロン反応性予測、および肝がん診断が可能であることを示した。
- (5) C 型肝炎患者の末梢血ではインターフェロンシグナルが障害されていた。
- (6) NK 細胞内 STAT1 発現量が高い症例においては、治療初期の応答性が減弱していることを示した。
- (7) vimentin-コアタンパク質相互作用部位が抗 HCV 薬の標的となりうることを見出した。
- (8) 高度不飽和脂肪酸代謝物などが培養細胞レベルでの HCV 産生を阻害する事を明らかにした。
- (9) オートファジー分子機構は HCV 粒子のアセンブリあるいは HCV 粒子特異的な細胞外への放出に関与している可能性を示した。

- (10) 肝線維化の進展には活性酸素種を介した TLR4 経路の活性化が重要であることが示唆された。
- (11) 細胞内ネットワーク変化を推定する手法の開発により、生物現象に忠実な疾患機序の解明が可能となり、実験研究との緊密な連携が可能となった。
- (12) 標的蛋白質に対しての環状特殊ペプチドを獲得することができた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

「研究成果の刊行に関する一覧」に記載

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

II. 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
宇都浩文、上村修司、坪内博仁	肝疾患の血清プロテオミクスを用いた診断	林紀夫、日比紀文、上西紀夫、下瀬川徹	Annual Review 消化器	中外医学社	東京	2009	200-208
Nakatsui M, (堀本)	Parameter Optimization in network dynamics including unmeasured variables by the symbolic-numeric approach.	Zhang,X-S, Chen,L,Wu, L-Y, Wang,Y	OSB 2009 (Lecture Notes in Operation Research 11)	World Publishing Corporation	Beijing	2009	245-253
Saito S, (堀本)	Detection of network structure changes by graphical chain modeling: a case study of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma.	C. L. Philip Chen & Yo-Ping Huang	2009 IEEE International Conference on Systems, Man & Cybernetics	The Institute of Electrical and Electronics Engineers	New York	2009	5624-5630
Tominaga D, (堀本)	Analysis of network dynamics including hidden variables by symbolic-numeric approach.	Zhang,X-S, Chen,L,Wu, L-Y, Wang,Y	OSB 2008 (Lecture Notes in Operation Research 9)	World Publishing Corporation	Beijing	2008	242-248
Morioka R, (堀本)	Phase Shifts of Circadian Transcripts in Rat Suprachiasmatic Nucleus	Zhang,X-S, Chen,L,Wu, L-Y, Wang,Y	OSB 2008 (Lecture Notes in Operation Research 9)	World Publishing Corporation	Beijing	2008	109-114
Nakatsui M, (堀本)	An Algebraic-Numeric Algorithm for the Model Selection in Network Motifs in Escherichia coli.	Zhang,X-S, Chen,L,Wu, L-Y, Wang,Y	OSB 2008 (Lecture Notes in Operation Research 9)	World Publishing Corporation	Beijing	2008	257-264
Zhang Z Y, (堀本)	Time Series Segmentation for Gene Regulatory Process with Time-Window-Extension Technique	Zhang,X-S, Chen,L,Wu, L-Y, Wang,Y	OSB 2008 (Lecture Notes in Operation Research 9)	World Publishing Corporation	Beijing	2008	198-203
Wu Z K, (堀本)	Revealing Disease Related Interactions by Correlation Analysis.	Zhang,X-S, Chen,L,Wu, L-Y, Wang,Y	OSB 2008 (Lecture Notes in Operation Research 9)	World Publishing Corporation	Beijing	2008	341-349
Sato T, (堀本)	Inference of Protein-Protein Interactions by Using Co-evolutionary Information	Anai,H, Horimoto,K, Kutsia,T	Algebraic Biology 2007 (Lecture Notes in Computer Science 4545)	Springer	Heidelberg	2007	322-333

Yoshida H, (堀本)	Exact parameter determination for Parkinson's disease diagnosis with PET using an algebraic approach	Anai,H, Horimoto,K, Kutsia,T	Algebraic Biology 2007 (Lecture Notes in Computer Science 4545)	Springer	Heidelberg	2007	110-124
Yoshida H, (堀本)	An Algebraic-Numeric Algorithm for the Model Selection in Kinetic Networks	Ganza,GV, Mayer,EW, Vorozhtsov, E	CASC 2007 (Lecture Notes in Computer Science 4770)	Springer	Heidelberg	2007	433-447
Hayashida M, (堀本)	Integer Programming-based Approach to Allocation of Reporter Genes for Cell Array Analysis	Zhang,X-S, Chen,L,Wu, L-Y, Wang,Y	OSB 2007 (Lecture Notes in Operation Research 7)	World Publishing Corporation	Beijing	2007	288-301

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、堀本)	Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma.	Hepatology	49(4)	1098-1112	2009
T Yamashita, (金子)	EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features.	Gastroenterology	136(3)	1012-1024	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
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)	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
R Nishino, (金子、堀本)	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
Oishi N, (金子)	Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells.	Cancer Sci	98(10)	1540-1548	2007
Takamura T, (金子)	Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes.	Biochem Biophys Res Commun	361(2)	379-384	2007
Hiraga N, (金子)	Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon.	FEBS Lett	581(10)	1983-1987	2007
Tateno M, (金子)	Expression profiling of peripheral-blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C undergoing interferon therapy.	J Infect Dis	195(2)	255-267	2007
Yamaguchi S, (竹原)	EphA2 derived peptide vaccine with amphiphilic poly (γ -glutamic acid) nanoparticles elicits an antitumor effect against mouse liver tumor.	Cancer Immunol Immunother	(in press)		
Uemura A, (竹原)	Natural killer cell is a major producer of interferon gamma that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice.	Cancer Immunol Immunother	59(3)	453-463	2010
Kohga K, (竹原)	Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma.	Cancer Res	69(20)	8050-8057	2009