

平成 21 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-008研究代表者：岡上 武**I. 研究の意義**

(1) DM・高血圧患者の肝障害の実態の解明、(2)SNPs 解析、(3)adipocytokine その他臨牀病理学的検討から単純性脂肪肝 (SS) から NASH 進展因子が解明、(4) 血液検査での SS/NASH の鑑別可能 (5)NASH 治療アルゴリズム作成などから、NAFLD の診断、治療、予防法が進歩し実地臨床と医療経済に極めて有益。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) 生活習慣病からの NAFLD 発症の実態と進展因子の解明、(2) 血液検査での SS, NASH 鑑別は日常臨床と検診に応用可能、(3)NAFLD の予後の解明により肝硬変・肝癌への予防に有用で治療法の選択も可能になり、日常臨床と医療経済上きわめて有益である。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者(岡上)：(1) DM4, 369 例の database が完成し、DM 患者肝障害の実態解明、(2) SS 157 例、NASH 351 例の SNPs 解析で adiponurin 他複数の遺伝子が NASH 発症要因と判明 (松田と共同研究)、(3)NAFIC スコア (ferritin, IRI, 4 型コラーゲン 7s のスコア化) で SS と NASH の鑑別可能 (論文作成中)、(4)NAFLD573 例 (SS143, NASH430 例) 例の database 完成、(5) DM 患者、非 DM 患者 NAFLD 各 250 例の解析で DM 患者では線維化進展 NASH 例が多い、(6)老化マーカー SMP-30 は NASH 発症に関与し、SS, NASH の鑑別にも有用。

研究分担者(高後)：(1)線維化進展例で鉄過剰蓄積、肝細胞トランスフェリン受容体 (TfR1) 発現亢進。TfR1、ヘプシンジンなどの遺伝子発現異常が NAFLD の病態に関与、(2)NAFLD 患者では血清非トランスフェリン結合鉄 (NTBI) が高値。河田：(1)ALT 上昇は肥満、インスリン抵抗性やアディポネクチン低値などメタボリックシンドロームと関連、(2) ARB 投与で肝 TG 量・血中アディポネクチン値が低下。アンジオテンシン II の肝での新標的分子 (SCD-1) が判明。小池：(1)ob/ob マウスと HCV コア遺伝子トランスジェニックマウスを比較し、多価不飽和脂肪酸比は HCV マウスで高値、(2)非 B 非 C 肝癌症例を対応分析で高齢・女性・肝予備能低下を特徴とする一群が NASH の症例群と考えられた。植木：高脂肪食下でも脂肪肝を呈さない PI3Ky ノックアウトマウス肝の検討で、マクロファージ浸潤で肝細胞での PPAR γ 発現が誘導。渡辺：(1) KK-A y マウスは高レプチン血症、低アディポネクチン血症を呈し、肝切除で肝組織中 TNF- α mRNA 誘導・STAT-3 リン酸化が亢進し、アディポカイン発現バランス異常によるシグナル伝達変調が肝再生不全の原因。

(2)本マウスは肝内 NKT 細胞分画が低下し、高脂肪食摂取で脂肪性肝炎を呈し、ピオグリタゾン投与で NKT 細胞分画上昇、脂肪性肝炎改善。橋本：NASH 合併肝細胞癌 (NASH-HCC) は C 型 HCC (C-HCC) と比較し生存率・再発率に有意差なく、NASH-HCC 再発に、腫瘍径と背景肝線維化の程度が関与。有井：NBNC-HCC では B, C-HCC と比較し生活習慣病合併が高率。NASH 由来 HCC は NBNC-HCC37 例中 3 例。篁：(1)NAFLD は血糖コントロールで肝線維化改善し、DM 患者に肥満が加わると肝でのミトコンドリア酸化的リン酸化と活性酸素産生系を構成する遺伝子群が協調的に発現亢進、(2)マウス肝代謝異常評価の遺伝子群搭載 DNA チップ開発、(3)脂肪食による肥満とインスリン抵抗性発症に先行し、肝臓と脂肪組織で活性酸素が生じる、(4)種々のインスリン抵抗性改善薬が各々ユニークな機序で NASH 病理を改善。安居幸一郎：NASH/NAFLD 患者の慢性腎臓病 (CKD) の合併頻度とその危険因子を解明。松田文彦：50 万 SNP をマーカーとするゲノムワイド関連解析 (GWAS) システムを構築し、SS(100 検体)、NASH(176 検体)で多数の候補遺伝子を選出、(2)同 GWAS で染色体 22 番上に NASH 関連遺伝子を同定。竹原徹郎：(1)NASH 患者では血清 caspase-3/7 活性が有意に増加し、NASH 肝細胞傷害に caspase 依存性アポトーシスが関与、(2)invariant NKT 細胞欠損マウスに高脂肪食で肝傷害、線維化が増強し、NKT 細胞は NASH の病態に抑制的。西原利治：NASH 高危険群特定の指標を作成し、NASH への進展に関連する 4 分子特

定。宇都浩文:糖代謝異常による脂肪肝で肝再生は遅延。

IV. 22年度の課題

全体研究:継続推進が主で DM5,000 例のフォロー、新たに高血圧 700 例の database 作成、SNPs 解析推進、NAFIC score の validation、外科的治療、瀉血療法、内服薬での治療効果比較検討。個別研究:高後:(1) NASH の病態形成における鉄・高脂肪食の役割検討。河田:ミトコンドリア傷害による脂肪酸 β -酸化を検討し標的分子(SCD-1)に至るアンジオテンシン II 細胞内シグナル解明。小池:ob/ob マウスと HCV コア遺伝子トランスジェニックマウスの比較・解析の推進。NBNC-HCC で肝組織所見、脂質関連遺伝子発現解析。植木:マクロファージから分泌される物質が肝細胞 PPAR γ 発現を高め脂肪を蓄積する機序を検討。小胞体ストレスと NAFLD の関連を小胞体ストレス反応マウスで解析。橋本:発癌に寄与する risk factor 解析と発癌寄与 molecule 解明。渡辺:病態進展における組織損傷修復機転と肝内自然免疫機構の関与検討。有井:HCC 切除標本非癌部で鉄沈着、8OHdG 高発現と関連する遺伝子群を DNA マイクロアレイ、ネットワーク解析、クラスター解析。篁:肥満、DM 患者の肝での包括的発現遺伝子解析から同定した代謝パスウェイを検証。肥満症、DM、インスリン抵抗性に関連して発現変動する肝臓由来生理活性分子(ヘパトカイン)遺伝子機能解析。安居:慢性腎臓病(CKD)の肝機能障害の実態と NASH/NAFLD の合併頻度の調査。松田:SS, NASH のゲノムワイド関連解析で、新たな関連遺伝子同定を図り、臨床情報との連携強化し、同定された関連遺伝子の周辺領域を詳細に調査し、発症機序解明。岡上:soluble CK18 定量、肝組織での CK8, CK18 染色で SS, NASH の鑑別を行う。竹原:脂肪化でのアポトーシス誘導機構解明、NAFLD 病態進展における invariant NKT 細胞の保護的作用機序の解明。西原:進展関連分子の特異的阻害剤やリガンド使用で治療効果を後ろ向き調査。宇都:NASH 診断マーカーと同定した血清 MnSOD 濃度の臨床的有用性検証。生活習慣病の NAFLD の病態進展への影響を実験的・臨床的に検討。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 多くの医療従事者に種々の新知見を提示でき、国民の健康保持と医療経済に有益。
- (2) 日本肝臓学会と共同で本症診療の手引きを平成 22 年 6 月上梓予定(責任者:岡上)。
- (3) 研究成果は特定健診での肝障害の進展度を加味した要精査・要受診基準作成に有用。
- (4) 小児 NAFLD が増加しており、小児のメタボリック症候群における肝障害の対策にも有用。

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(岡上 武)

- (1) Park H, Ishigami A, Shima T, Mizuno M, Maruyama N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. Hepatic senescence marker protein-30 is involved in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* in press
- (2) 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. *Hepatol Res* 2009; 39: 366-373
- (3) 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* 2008; 47: 493-502

研究分担者(高後 裕)

- (1) Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol.* 2008;88:7-15
メタルフリー-HPLC システムによる血清非トランスフェリン結合鉄測定系の開発(特許出願中)

研究分担者(河田 純男)

- (1) Saito T, Nishise Y, Makino N, Haga H, Ishii R, Okumoto K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Takeda H, Togashi H, Kubota I, Daimon M, Kato T, Kawata S: Impact of metabolic syndrome on elevated serum alanine aminotransferase levels in the Japanese population. *Metabolism* 2009; 58: 1067-1075

研究分担者(小池和彦)

- (1) 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. *Hepatology* 2009;50:378-386

研究分担者(植木浩二郎)

(1) *Awazawa M, Ueki K, Inabe K, Yamauchi T, Kaneko K, Okazaki Y, Bardeesy N, Ohnishi S, Nagai R, Kadowaki T: Adiponectin suppresses hepatic SREBP1c expression in an AdipoR1/LKB1/AMPK dependent pathway. Biochem Biophys Res Commun 382:51-56, 2009*

研究分担者(渡辺純夫)

(1) *Aoyama T, Ikejima K, Kon K, Okumura K, Arai K, Watanabe S. Pioglitazone promotes survival and prevents hepatic regeneration failure after partial hepatectomy in obese and diabetic KK-A^y mice. Hepatology 2009;49:1636-44.*

研究分担者(橋本悦子)

(1) *Tokushige K, Hashimoto E, Noto H, Yatsuji S, Tobari M, Torii N, Taniai M, Shiratori K, Murayama H. Clinical significance of serum ornithine carbamoyltransferase in patients with non-alcoholic steatohepatitis. Hepatol Res 2009;39:939-943*

研究分担者(有井滋樹)

(1) *Takamatsu S, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Kawamura T, Teramoto K, Igari T, Arai S. Influence of risk factors for metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease on the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. Hepatogastroenterology, 2008;55:609-614*

研究分担者(篁 俊成)

(1) *Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. J Biol Chem 2009;284:14809-14818*

(2) *Uno M, Kurita S, Misu H, Ando H, Ota T, Matsuzawa-Nagata N, Kita Y, Nabemoto S, Akahori H, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S, Takamura T. Tranilast, an antifibrogenic agent, ameliorates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2008;48:109-118*

研究分担者(安居幸一郎)

(1) *Yasui K, Harano Y, Mitsuyoshi H, Tsuji K, Endo M, Nakajima T, Minami M, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus. J Gastroenterol. in press.*

研究分担者(松田文彦)

(1) *Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Chen C, Goodman G., Field JK, Liloglou T, Xinarianos G, Cassidy A, McLaughlin J, Liu G., Narod S, Krokan HE, Skorpen F, Elvestad MB, Hveem K, Vatten L, Linseisen J, Clavel-Chapelon F, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Lund E, Martinez C, Bingham S, Rasmussen T, Hainaut P, Riboli E, Ahrens W, Benhamou S, Lagiou P, Trichopoulos D, Holcátová I, Merletti F, Kjaerheim K, Agudo A, Macfarlane G., Talamini R, Simonato L, Lowry R, Conway DI, Znaor A, Healy C, Zelenika, D, Boland A, Delepine M, Foglio M, Lechner D, Matsuda F, Blanche H, Gut, I, Heath S, Lathrop M, Brennan P. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. Nature 2008; 452: 633-637.*

研究分担者(竹原徹郎)

(1) *Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. J Gastroenterol 2008; 43: 811-822*

研究分担者(西原利治)

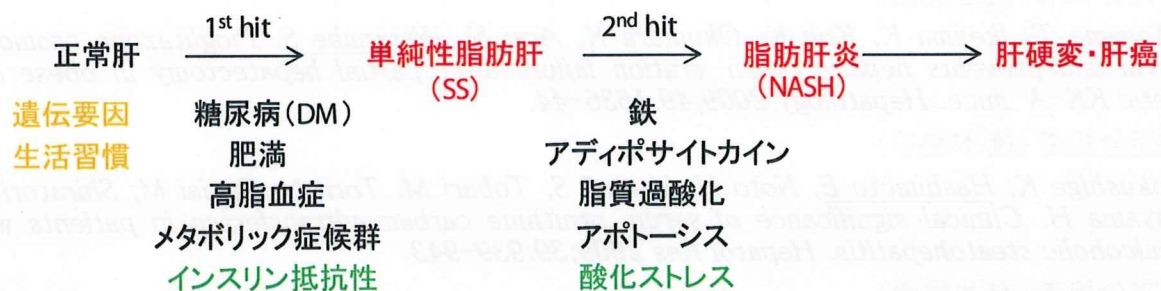
(1) *Asanuma T, Ono M, Kubota K, Hirose A, Hayashi Y, Saibara T, Inanami O, Ogawa Y, Enzan H, Onishi S, Kuwabara M, Oben JA. Super paramagnetic iron oxide MRI shows defective Kupffer cell uptake function in non-alcoholic fatty liver disease. Gut in press*

研究分担者(宇都浩文)

(1) *Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y, Ishida Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanoue T, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope labeling method. Hepatol Res, in press.*

VII. III(2年間の研究成果)の概要図等

NASH・NAFLDの成因



研究成果

全体研究

テーマ	目的・方法	2年間の成果	3年間の目標
● DMデータベース作成	DM患者における肝障害の実態を明らかにする	4,369 例入力	5,000例登録
● 肝生検施行NALFDの長期フォロー	肝生検で確定診断したNALFD (NASH+SS) 患者を前向きに長期間フォローし、予後を明らかにする	531 例登録	1,000例登録 (NASH 500 + SS 500)
● NAFLDのSNP解析	50万SNPsをマーカーとするゲノムワイド関連解析で、NASH発症の遺伝的要因を解明する	450サンプル収集	1,000例解析 (NASH 500 + SS 500)

個別研究

テーマ	成果
● 遺伝要因	----- SS 100例、NASH 176 例のゲノムワイド関連解析で候補遺伝子を複数選出、染色体22番上にNASH関連遺伝子を同定
● DMにおける肝障害	--- DM患者、非DM患者NAFLD各250例の解析で、DM患者では線維化進展NASH例が多い
● 鉄代謝異常	----- メタルフリーHPLCシステムによる血清非トランスフェリン結合鉄測定系の開発 (特許出願中)
● NASHからの肝発癌	● 脂質代謝異常 ● 酸化ストレス
● メタボリック症候群	● 免疫異常 ● インスリン抵抗性
● NASHとSSの鑑別診断法	----- NAFICスコア (ferritin、IRI、4型コラーゲン7sのスコア化)の構築とその有用性の検証
● 新規マーカーの探索	----- 老化マーカーSMP-30 はNASH発症に関与し、SSとNASHの鑑別に有用
● 薬物療法	{ ピオグリタゾン (Pioglitazone) は肥満とDMマウス (KK-A ^y マウス) における肝再生を促進する。 抗線維化薬 Tranilast はラットNASHモデルを改善する
● 瀉血療法	

○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: Department of Pathology, University of California, Davis

1981.7-2007.3: 京都府立医科大学第三内科学教室

2003.4-2007.3: 京都府立医科大学大学院消化器病態制御学

2007.4~: 京都府立医科大学(特任教授)、大阪府済生会吹田病院(院長)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

1980-1981: Samuel W French (Professor, Dept. of Pathol, UC, Davis)

1981-1989: 瀧野辰朗(京都府立医科大学第三内科教授)

1992-2009 現在: 伊藤義人(2009 現在、京都府立医科大学消化器内科准教授)

1993-2009 現在: 南 祐仁(2009 現在、京都府立医科大学消化器内科講師)

1996-2009 現在: 安居幸一郎(2009 現在、京都府立医科大学消化器内科寄附講座准教授)

・主な研究課題

アルコール性肝障害の病態解析

ウイルス性肝炎の病態解析と治療

B型肝炎における発癌機構

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の疫学・病態解析と治療

・これまでの研究実績

研究代表者 岡上 武

1. Yasui K, Harano Y, Mitsuyoshi H, Tsuji K, Endo M, Nakajima T, Minami M, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Steatosis and hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in Japanese patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol* in press
2. *Park H, Ishigami A, Shima T, Mizuno M, Maruyama N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. Hepatic senescence marker protein-30 is involved in the progression of nonalcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol in press*
3. Okanoue T, Itoh Y, Hashimoto H, Yasui K, Minami M, Takehara T, Tanaka E, Onji M, Toyota J, Chayama K, Yoshioka K, Izumi N, Akuta N, Kumada H. Predictive value of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study. *J Gastroenterol* 2009; 44: 952-963
4. Gen Y, Yasui K, Zen K, Nakajima T, Tsuji K, Endo M, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y,

- Tanaka S, Taniwaki M, Arie S, Okanoue T, Yoshikawa T. A novel amplification target, ARHGAP5, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009; 275: 27-34
5. Sumida Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Role of hepatic iron in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2009; 39: 212-222
6. *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. *Hepatol Res* 2009; 39: 366-373*
7. Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, Kuramitsu T, Kawata S, Tanaka E, Izumi N, Okuse C, Kakumu S, Okanoue T, Hino K, Hiasa Y, Sata M, Maeshiro T, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1476-1483
8. Kobashi H, Fujioka S, Kawaguchi M, Kumada H, Yokosuka O, Hayashi N, Suzuki K, Okanoue T, Sata M, Tsubouchi H, Sato C, Kiyosawa K, Tanikawa K, Seriu T, Ishikawa H, Takaki A, Iwasaki Y, Osawa T, Takaki T, Sakaguchi K, Shiratori Y, Yamamoto K, Tenney DJ, Omata M. Two cases of development of entecavir resistance during entecavir treatment for nucleoside-naïve chronic hepatitis B. *Hepatol Int* 2009; 3: 403-410
9. Zen K, Yasui K, Gen Y, Dohi O, Wakabayashi N, Mitsufuji S, Itoh Y, Zen Y, Nakanuma Y, Taniwaki M, Okanoue T, Yoshikawa T. Defective expression of polarity protein PAR-3 gene (PARD3) in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2009; 28: 2910-2918
10. Kunimoto K, Nojima H, Yamazaki Y, Yoshikawa T, Okanoue T, Tsukita S. Involvement of IQGAP3, a regulator of Ras/ERK-related cascade, in hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration and development. *J Cell Physiol* 2009; 220: 621-631
11. Sumida Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Role of hepatic iron in non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2009; 39: 213-222
12. Tai A, Hamada S, Kataoka K, Yasukawa S, Sonoyama T, Okanoue T, Yanagisawa A. Correlations between p53 gene mutations and histologic characteristics of pancreatic ductal carcinoma. *Pancreas* 2009; 38: e60-67
13. Nishikawa T, Nakajima T, Katagishi T, Okada Y, Jo M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y, Yoshikawa T. Oxidative stress may enhance the malignant potential of human hepatocellular carcinoma by telomerase activation. *Liver Int* 2009; 29: 846-8569
14. Shindo M, Chayama K, Mochida S, Toyota J, Tomita E, Kumada H, Yokosuka O, Sata M, Hayashi N, Suzuki K, Okanoue T, Sata M, Tsubouchi H, Kiyosawa K, Tanikawa K, Seriu T,

- Ishikawa H, Takaki A, Iwasaki Y, Osawa T, Takaki T, Sakaguchi K, Shiratori Y, Yamamoto K, Tenney DJ, Omata M. Antiviral activity, dose-response relationship, and safety of entecavir following 24-week oral dosing in nucleoside-naive Japanese adult patients with chronic hepatitis B: a randomized, double-blind, phase II clinical trial. *Hepatol Int* 2009; 3: 445-452
15. Inagaki Y, Yasui K, Endo M, Nakajima T, Zen K, Tsuji K, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arii S, Okanoue T. CREB3L4, INTS3, and SNAPAP are targets for the 1q21 amplification frequently detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 180: 30-36
16. Okanoue T, Itoh Y, Minami M, Hashimoto H, Yasui K, Yotsuyanagi H, Takehara T, Kumada T, Tanaka E, Nishiguchi S, Izumi N, Sata M, Onji M, Yamada G, Okita K, Kumada H. Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum aminotransferase based on platelet count. *Hepatol Res* 2008; 38: 27-36
17. Hiramatsu N, Kurashige N, Oze T, Takeraha T, Tamura S, Kasaraha A, Oshita M, Katayama K, Yoshihara H, Imai Y, Kato M, Kawata S, Tsubouchi H, Kumada H, Okanoue T, Kakumu S, Hayashi N. Early decline of hemoglobin can predict progression of hemolytic anemia during pegylated interferon and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2008; 38: 52-59
18. Mitsuyoshi H, Itoh Y, Sumida Y, Minami M, Yasui K, Nakashima T, Okanoue T. Evidence of oxidative stress as a cofactor in the development of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2008; 38:348-353
19. *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* 2008; 47: 493-502*
20. Nakajima T, Yasui K, Zen K, Inagaki Y, Fujii H, Minami M, Tanaka S, Taniwaki M, Itoh Y, Arii S, Inazawa J, Okanoue T. Activation of B-Myb by E2F1 in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2008; 38: 886-895
21. 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, Arii 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* 2008; 48: 109-120
22. Miyagawa M, Minami M, Fujii K, Sendo R, Mori K, Shimizu D, Nakajima T, Yasui K, Itoh Y, Taniwaki M, Okanoue T, Yoshikawa T. Molecular characterization of a variant virus that caused de novo hepatitis B without elevation of hepatitis B surface antigen after

chemotherapy with rituximab. J Med Virol 2008; 80: 2069-2078

23. Ishii M, Iwai M, Harada Y, Kishida T, Asada H, Shin-Ya M, Itoh Y, Imanishi J, Okanoue T, Mazda O. Soluble TRAIL gene and actinomycin D synergistically suppressed multiple metastasis of TRAIL-resistant colon cancer in the liver. Cancer Lett 2007; 245: 134-143
24. Sakaura C, Miyakawa K, Fukuda H-I, Nakashima S, Yoshikawa T, Kin S, Nakase Y, Ida H, Yazumi S, Yamagishi H, Okanoue T, Cjiba T, Ito K, Hagiwara A, Ito Y. Frequent silencing of RUNX3 in esophageal squamous cell carcinoma is associated with radioresistance and poor prognosis. Oncogene 2007; 26: 5927-5938
25. Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Okanoue T, Yatsushashi 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; 37: 661-666
26. Hamaguchi M, Kojima T, Itoh Y, Harano Y, Fujii K, Nakajima T, Kato T, Takeda N, Okuda J, Ida K, Kawahito Y, Yoshikawa T, Okanoue T. The severity of ultrasonographic findings in nonalcoholic fatty liver disease reflects the metabolic syndrome and visceral fat accumulation. Am J Gastroenterol 2007; 102: 2708-2715
27. Kudo M, Okanoue T: Japan Society of Hepatology. Management of hepatocellular carcinoma in Japan: consensus-based clinical practice manual proposed by the Japan Society of Hepatology. Hepatol Res Supple 2007; 1: 2-15
28. 慢性肝炎の治療ガイド 2008, 編集 社団法人日本肝臓学会(編集責任者 岡上 武)、文光堂、東京、2007年10月19日発行
29. 癌診療マニュアル。編集 社団法人日本肝臓学会(編集責任者 岡上 武)、医学書院、東京、2007年3月15日発行
30. NASH・NAFLD の診療ガイド。編集 社団法人日本肝臓学会(編集責任者 岡上 武)、文光堂、東京、2006年8月22日発行

厚生労働省科学研究補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業研究発表会

研究課題名

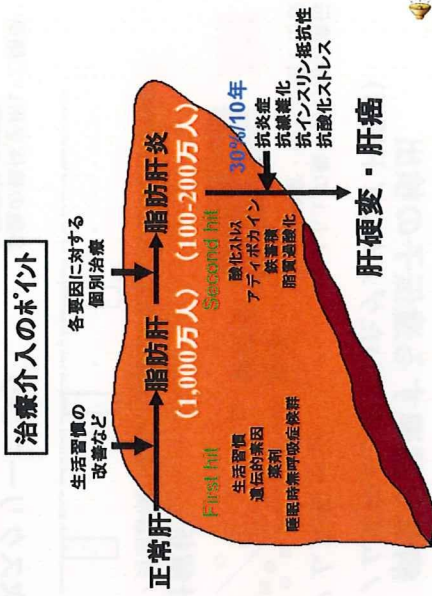
非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解析と診断法
治療法の開発に関する研究(H20-肝炎-一般-008)

平成22年1月20日(国立感染症研究所)

大阪府済生会吹田病院

岡上 武

非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD) とNASH
の発症進展、疫学、予後と治療介入



メタボリック症候群と肝障害の臨床的トピックス

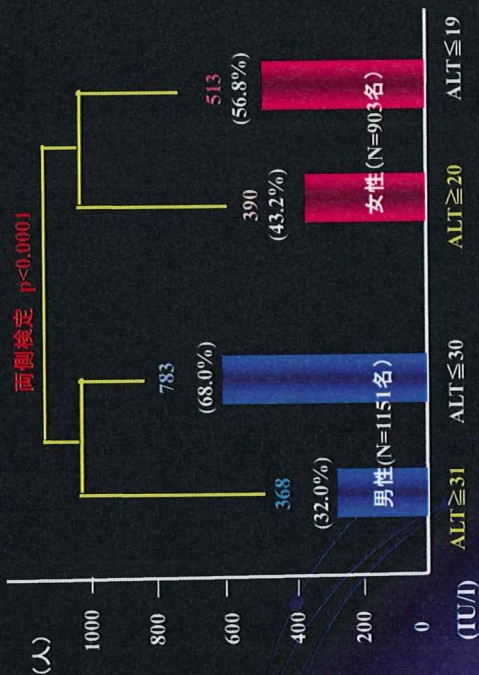
- BMI 35以上の肥満者は35未満の者に比して肝癌発生率が4.52倍
- 糖尿病患者は非糖尿病患者に比し肝癌発生率が3倍以上高率
N Engl J Med 2003
- 高血圧患者ではdipperで2倍、non-dipperで4倍非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)罹患率が高い
Gastroenterology 2004
- 本邦では非B非C型肝炎が過去10年間で2倍増加
J Hypertens 2008
- 糖尿病患者死因のトップは肝癌(8.6%)で、肝硬変死4.7%を合わせると糖尿病患者の13.3%が肝疾患関連死
日本肝癌研究会 2003
- 糖尿病 2007

研究班で3年間にいうこと

- 糖尿病患者5,000例data base作成 (4,369例入力)
- NAFLD 1,000例(SS 500例、NASH 500例)のSNPs解析 (SS 157例、NASH 351例)
- 高血圧700例database作成 (400例)
- NASH肝症例のdatabase作成
- NAFLDの長期フォロー (SS 143例、NASH 430例)
- NASHの血液生化学的診断法の確立(特異的マーカーの探索、鑑別式の作成) (NAFIC score)
- 病態解明
- 発癌機構解明
- 治療法の確立

(赤字:2009.11.15現在)

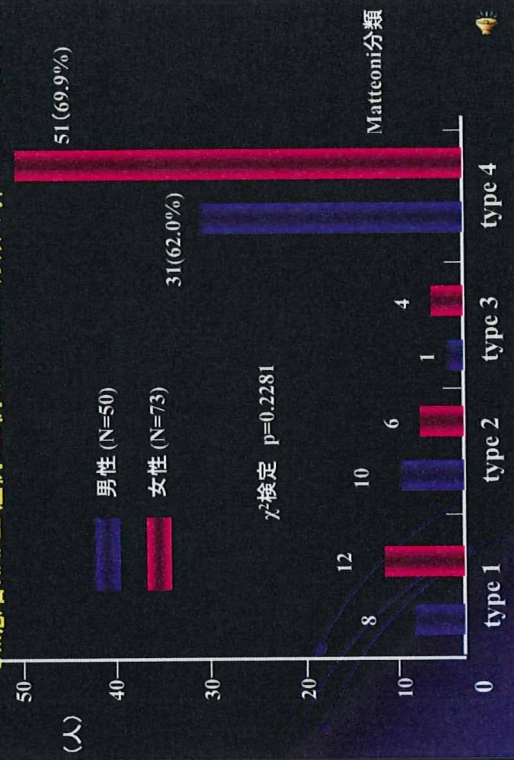
済生会吹田病院糖尿病外来患者2,054名の血清ALT値の分布



済生会吹田病院糖尿病外来患者2,054例の肝炎ウイルスマーカー陽性率

HBs抗原	男性 (1,151名)	女性 (903名)
(-)	927 (98.5%)	754 (98.6%)
(+)	14 (1.5%)	11 (1.4%)
HCV抗体		
(-)	780 (94.8%)	638 (96.2%)
(+)	43 (5.2%)	25 (3.8%)

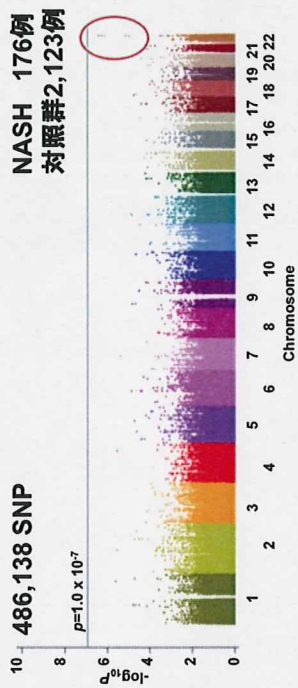
DM患者NAFLD症例123例のMatteoni分類 (type 1~4) の分布



病気と関連する遺伝子の検出 (ゲノムスキャンを用いたゲノムワイド解析)

1. ゲノムスキャン
 - ゲノム上の数十万カ所の遺伝子型を患者・健常者間で比較
2. 統計解析
 - 患者・対照群間で遺伝子型頻度が有意に異なる領域を同定
3. 2次スクリーニング
 - 多数の検体を用いて結果の再現性を確認

ゲノムスキヤンの結果 (2) NASH 対 対照群



京大ゲノム医学センターの、健常者のゲノムスキヤンデータ (2,123例) を対照群として使用

ゲノムワイド有意差に近いマーカー群 ($3.8 \times 10^{-7} \sim 2.4 \times 10^{-6}$) を染色体22番に同定

NAFIC score (NASH, ferritin, insulin, typeIV collagen 7S)

Variables	0点	1点
1. Ferritin (ng/ml) female	<200	≥ 200
male	<300	≥ 300
2. IRI ($\mu\text{U/ml}$)	<10	≥ 10
3. TypeIV collagen 7S (ng/ml)	<5.0	≥ 5.0

合計点数を0~3点の4段階で評価

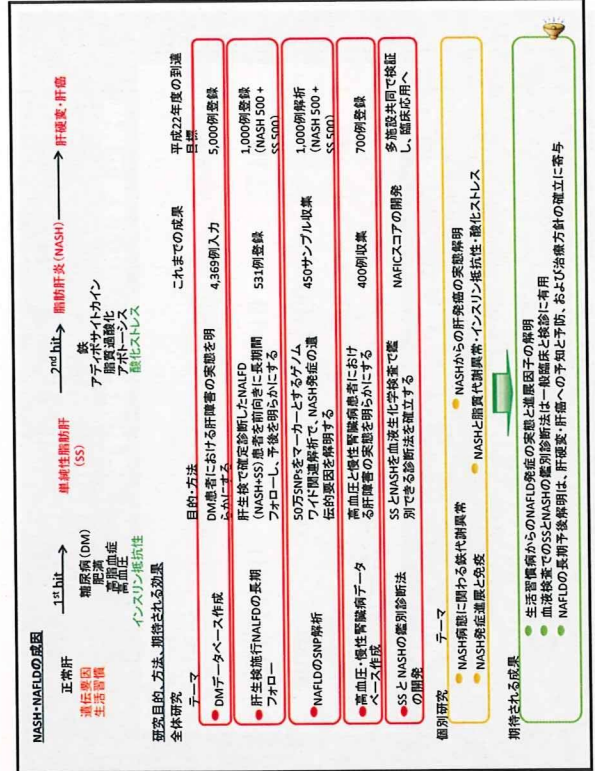
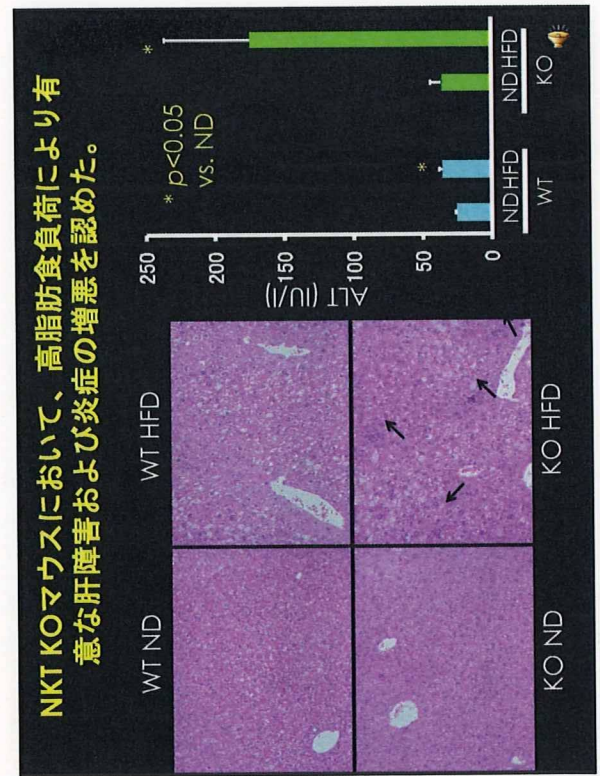
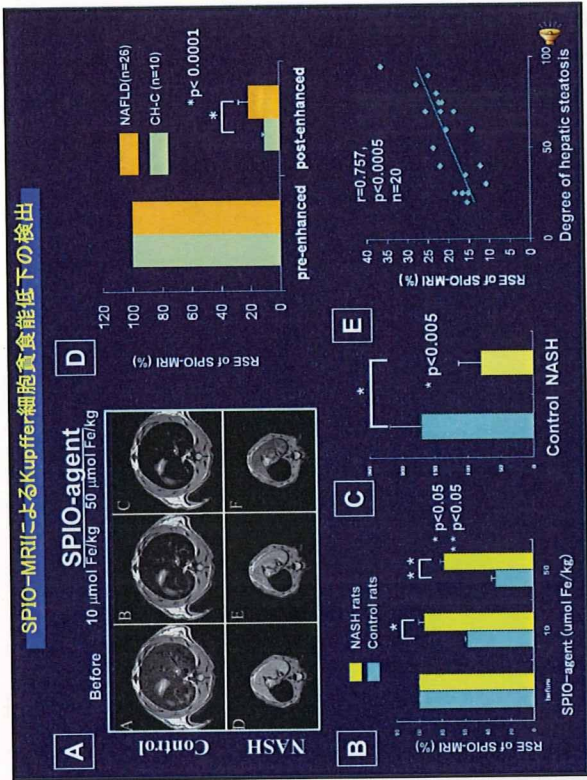
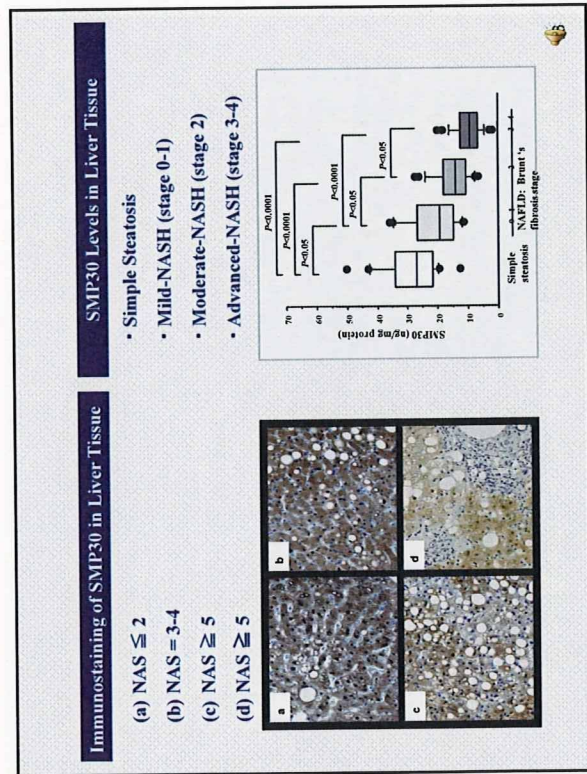
SSとNASH鑑別のためのNAFIC scoreと他のscoring systemsとの有用性の比較 — ROC curveでの検討

	Simple steatosis vs. NASH	Simple steatosis +NASH stage 0-1 vs. NASH stage2-4	Simple steatosis +NASH stage 0-2 vs. NASH stage3-4
NAFIC	Estimation (n=177) Validation (n=442)	0.849 0.766	0.817 0.795
HAIR (IR index≥ 5)	Estimation (n=177) Validation (n=432)	0.632 0.636	0.549 0.620
Palekar et al.	Estimation (n=173) Validation (n=390)	0.784 0.711	0.794 0.798
Gholam et al.	Estimation (n=177) Validation (n=442)	0.829 0.758	0.784 0.787

JSG-NAFLD

加齢指標蛋白質30(SMP30)の同定、加齢変化





平成 21 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-肝炎一班 -009

研究代表者：茶山 一彰

I. 研究の意義

(1) 我々は HBV、HCV の治療薬の開発に資する小動物モデル、ヒト肝細胞キメラマウスの実験系を構築し、新規治療の開発を行っている。(2) 肝細胞培養系とウイルス感染系の開発も併せて行っている。(3) これら in vitro、in vivo の系を利用し、前臨床試験として種々の薬剤のスクリーニングを行っている。(4) 最近開発された低分子治療薬は耐性ウイルスの出現が必発である。薬剤耐性ウイルスの検討には、infectious clone の作製と耐性変異を導入する reverse genetics の構築が必要である。(5) HCV の増殖に必要な宿主因子を同定し、耐性出現の可能性が低い新規創薬の標的を同定する必要がある。(6) キメラマウスの肝臓で種々の遺伝子発現ができれば標的を評価する有用な手法となる。

II. 研究の目的、期待される成果

(1) ヒト肝細胞キメラマウスモデルを作製し、種々の薬剤の効果を検討した。JFH1 のみならず、genotype 1b が増殖可能な培養系の構築を試みた。(2) HBV、HCV の各種 genotype の reverse genetics を実施すべく infectious clone の cloning を行い、HBV では genotype A, B, C、HCV に関しては現在利用可能な genotype 2a, 1a に加え、genotype 1b, 2b のクローニングを試みた。(3) 薬剤耐性 HBV に対する種々の核酸アナログの治療効果の検証を行った。さらに HCV に対する感染阻害薬、IFN 効果増強薬の効果の検証を行った。(4) HCV の増殖に必要な遺伝子同定、肝臓における遺伝子の長期発現系の構築を試みた。

III. 2年間の研究成果

- ・研究代表者(茶山一彰)、研究分担者(今村道雄) (1) HBV の種々の薬剤耐性株を作製し、新たな核酸アナログの治療効果を検証した。(2) HCV の感染予防剤(PS-ON)、soya sapogenol B の効果を検証した。(3) genotype 1a, 2a, 1b, 2b の infectious clone を作製、reverse genetics の系を構築した。1b では core70, 91, ISDR の変異体を作製し、増殖能力、感染性、IFN, protease inhibitor, pol inhibitor の効果を検証した。

- ・研究分担者(土方誠) (1) 新規不死化肝細胞と中空系を用いた立体培養で血清中の HCV の感染系を構築した。(2) HCV core2 量体が粒子の形成に重要であることを見いだした。

- ・研究代表者(茶山一彰)、研究分担者(大段秀樹) (1) 肝 NK 細胞に抗 HCV 活性があることを見だし、肝移植後投与すると、抗腫瘍、抗 HCV 活性を発揮することを明らかにした。

- ・研究分担者(松浦善治) HCV の増殖と密接に関連する宿主因子の VAP-C 等を見いだした。

- ・研究代表者(茶山一彰)、研究分担者(金子周一) (1) HCV 感染によって引き起こされる肝内の遺伝子発現を検討しインターフェロン誘導遺伝子が誘導されることを示した。

- ・研究分担者(高倉喜信) CpG 配列を極度に減少させた plasmid と hydrodynamic injection を用いて、肝内でインターフェロン遺伝子を長期間発現させることに成功した。

- ・研究代表者(茶山一彰)、研究分担者(吉里勝利) HBV, HCV と結合する肝細胞因子の screening を行い、PC と HCV 蛋白の結合の可能性を示した。

IV. 22 年度の課題

(1) HBV の各種薬剤耐性株、多剤耐性株の生物学的特性を明らかにし、耐性株に対する治療戦略を確定する。(2) HCV に対する新たな治療薬の効果を検証し、プロテアーゼインヒビター耐性株の生物学的特性を明らかにし、耐性に対する対策を確

立する。(3) HCV に対する新規薬剤の組み合わせを検討し、IFN を併用しなくても HCV が排除できるような治療法について検討する。(4) 新規 HCV 培養系、ヒト肝細胞キメラマウスを利用した抗肝炎ウイルス薬の seeds 発見を引き続き行う。(5) NK 細胞の抗ウイルス活性を利用した治療法についてヒト肝細胞キメラマウスを用いてさらに検証し、臨床応用を促進する。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 多剤耐性 HBV の生物学的特性が明らかになり、治療の必要性、治療法が明確になれば、新規治療薬開発(治験)の必要性が明らかになり、医療経済への資源投資の必要性が推測できる。(2) HCV に対する新たな治療薬の効果を検証し、プロテアーゼインヒビター耐性株の生物特性を明らかにすることにより、新規開発中の治療薬の重要性の序列が明らかになる。このことにより、より効果の高い新規治療薬の開発が促進される。(3) 新たな治療薬の seeds の発見は、日本の創薬開発に貢献し、国民の健康に寄与するのみならず我が国における医療経済の活性化、雇用の促進にも貢献する。

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・茶山一彰、分担者今村・道雄

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

(1) Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Doskali M, Tashiro H, Hiraga N, Imamura M, Asahara T, Chayama K, Ohdan H. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 2009.

(2) Kamatani Y, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, Kubo M, Tsunoda T, Kamatani N, Kumada H, Puseenam A, Sura T, Daigo Y, Chayama K, Chantratita W, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet* 2009

(3) Matsumura T, Hu Z, Kato T, Dreux M, Imamura M, Hiraga N, Cosset FL, Chayama K, Vaillant A, Liang TJ. Amphipathic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. *Gastroenterology* 2009

(4) Tsukada H, Ochi H, Maekawa T, Chayama K. Polymorphism in MAPKAPK3 gene affects interferon therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2009

(5) Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol*. 2009

(6) 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 K, Chayama K. G to A hypermutation in hepatitis B virus and clinical course of patients with chronic hepatitis B. *J Infectious Dis* 2009

研究分担者・吉里勝利

(1) Yoshizato K, Tateno C. A human hepatocyte-bearing mouse: an animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans. *PPAR Res*. 2009

(2) Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B and C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol*. 2009

研究分担者・金子周一

(1) Kamijo K, Kaneko S. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008.

研究分担者・土方誠

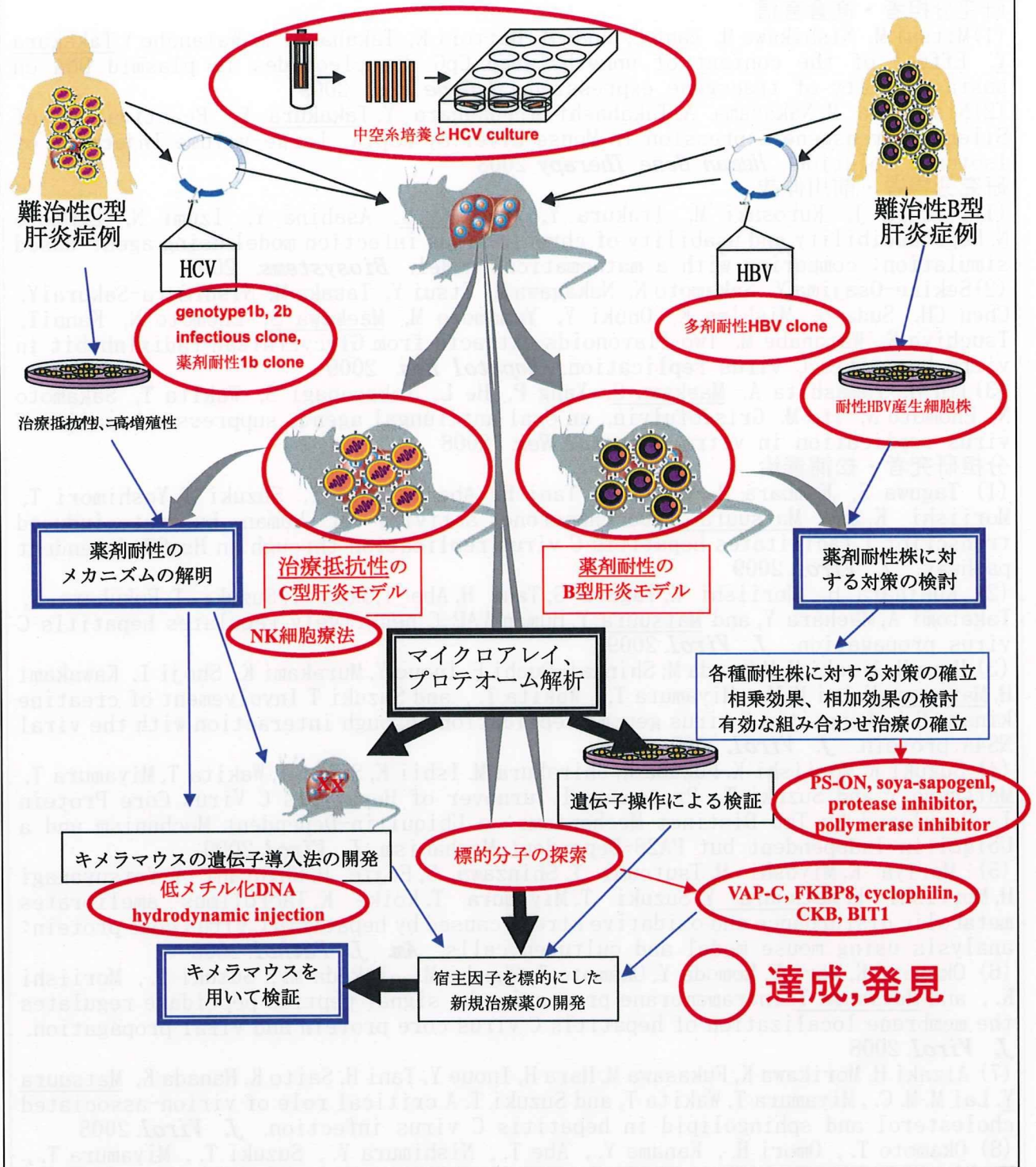
(1) Hussein A, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Tanaka Y, Mizogami M, Shimotohno K, Hijikata M. Strain-dependent viral dynamics and virus cell interactions observed in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood HCV. *Hepatology*, 2009

(2) Hussein H. Aly, Shimotohno K, Hijikata M. 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2009

(3) Sugiyamao K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Kumiko

- W. Shimotohno K, Suzuki T, Shimizu Y, Tobita S, Hijikata M, Shimotohno K: Genetic analysis of HCV with defective genome and its infectivity in vitro. *J. Virol* 2009.
- (4) Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K: Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Science*, 2009.
- 研究分担者・高倉喜信
- (1) Mitsui M, Nishikawa M, Zang L, Ando M, Hattori K, Takahashi Y, Watanabe Y, Takakura Y. Effect of the content of unmethylated CpG dinucleotides in plasmid DNA on sustainability of transgene expression. *J Gene Med.* 2009
- (2) Nishikawa M, Nakayama A, Takahashi Y, Fukuhara Y, Takakura Y. Reactivation of Silenced Transgene Expression in Mouse Liver by Rapid, Large-volume Injection of Isotonic Solution. *Human Gene Therapy* 2008
- 研究分担者・前川伸哉
- (1) Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N. Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. *Biosystems.* 2009.
- (2) 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.* 2009
- (3) 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
- 分担研究者・松浦善治
- (1) Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, and Matsuura Y. Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J. Virol.* 2009
- (2) Kukihara H, Moriishi K, Taguwa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, and Matsuura Y. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J. Virol.* 2009.
- (3) Hara H, Aizaki H, Matsuda M, Shinkai-Ouchi F, Inoue Y, Murakami K, Shoji I, Kawakami H, Matsuura Y, Lai M. M., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J. Virol.* 2009
- (4) Suzuki R, Moriishi K, Fukuda K, Shirakura M, Ishii K, Shoji I, Wakita T, Miyamura T, Matsuura Y, and Suzuki T. Proteasomal Turnover of Hepatitis C Virus Core Protein Is Regulated by Two Distinct Mechanisms: a Ubiquitin-Dependent Mechanism and a Ubiquitin-Independent but PA28-Dependent Mechanism. *J. Virol.* 2009
- (5) Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K. Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. *Am. J. Pathol.* 2009
- (6) Okamoto K, Mori Y, Komoda Y, Okamoto T, Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 2008
- (7) 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, and Suzuki T. A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 2008
- (8) Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 2008.
- (9) Taguwa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 2008
- (10) 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

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等



図に赤文字、赤丸で示した事項は達成できた。そのほかの項目については引き続き研究を行い、新規分子の探索、新規治療法の開発を行っていく。

○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-Horng Kao(Professor of National Taiwan University)。

・ 主な研究課題

慢性肝疾患の治療に関する研究

肝炎ウイルスに関する研究

・ 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

(特願2006-167871) 発明の名称 HCVの治療剤または予防剤

(特開平05-337000、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)Hamada T, Yokota K, Ayada K, Hirai K, Kamada T, Haruma K, Chayama K, Oguma K. Detection of Helicobacter hepaticus in human bile samples of patients with biliary disease. Helicobacter. 2009

(2)Noda I, Kitamoto M, Nakahara H, Hayashi R, Okimoto T, Monzen Y, Yamada H, Imagawa M, Hiraga N, Tanaka J, Chayama K. Regular surveillance by imaging for early detection and better prognosis of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus. J Gastroenterol. 2009

(3)Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. J Hepatol. 2009

(4)Higashi Y, Miyazaki M, Goto C, Sanada H, Sueda T, Chayama K. Sarpogrelate Hydrochloride, a Selective 5-HT_{2A} Antagonist, Augments Autologous Bone-Marrow Mononuclear Cell Implantation-induced Improvement in Endothelium-Dependent Vasodilation in Patients with Critical Limb Ischemia. J Cardiovasc Pharmacol. 2009

- (5) Yamaguchi T, Yoshida S, Tanaka S, Takemura Y, Oka S, Yoshihara M, Yamada H, Chayama K. Predicting the clinical response to cytopheresis in steroid-refractory or -dependent ulcerative colitis using contrast-enhanced ultrasonography. *Scand J Gastroenterol.* 2009
- (6) Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Doskali M, Igarashi Y, Tashiro H, Hiraga N, Imamura M, Sakamoto N, Asahara T, Chayama K, Ohdan H. *Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. J Clin Invest.* 2009
- (7) Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hatakeyama T, Tsuge M, Kitamura S, Kimura T, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Fujimoto Y, Takahashi S, Nakamura Y, Kumada H, Chayama K. Effects of structural variations of APOBEC3A and APOBEC3B genes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res.* 2009
- (8) Fukuhara T, Hiyama T, Tanaka S, Oka S, Yoshihara M, Arihiro K, Chayama K. Characteristics of Esophageal Squamous Cell Carcinomas and Lugol-voiding Lesions in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Gastroenterol.* 2009
- (9) Hiyama T, Matsuo K, Urabe Y, Fukuhara T, Tanaka S, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Meta-analysis used to identify factors associated with the effectiveness of proton pump inhibitors against non-erosive reflux disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009
- (10) Oka S, Tanaka S, Kanao H, Oba S, Chayama K. Therapeutic strategy for colorectal laterally spreading tumor. *Dig Endosc.* 2009.
- (11) Tanaka S, Oka S, Chayama K, Kawashima K. Knack and practical technique of colonoscopic treatment focused on endoscopic mucosal resection using snare. *Dig Endosc.* 2009
- (12) Matsumoto Y, Ito M, Tsuge M, Matsuo T, Tanaka S, Haruma K, Chayama K. Ecabet sodium induces neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide synthesis and gastric adaptive relaxation in the human stomach. *J Gastroenterol.* 2009
- (13) Wada Y, Ito M, Takata S, Kitamura S, Takamura A, Tatsugami M, Imagawa S, Matsumoto Y, Tanaka S, Yoshihara M, Chayama K. Little necessity of acid inhibition against proton pump inhibitor rebound effects and prior helicobacter pylori eradication therapy in gastric ulcer patients: a randomized prospective study. *Hepatogastroenterology.* 2009
- (14) Kodama H, Aikata H, Takaki S, Azakami T, Katamura Y, Kawaoka T, Hiramatsu A, Waki K, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Chayama K. Evaluation of portosystemic collaterals by MDCT-MPR imaging for management of hemorrhagic esophageal varices. *Eur J Radiol.* 2009
- (15) Soe NN, Ishida T, Ishida M, Sawano M, Abe K, Miho N, Chayama K, Kihara Y, Yoshizumi M. Nifedipine interferes with migration of vascular smooth muscle cells via inhibition of Pyk2-Src axis. *J Atheroscler Thromb.* 2009
- (16) Okanoue T, Itoh Y, Hashimoto H, Yasui K, Minami M, Takehara T, Tanaka E, Onji M, Toyota J, Chayama K, Yoshioka K, Izumi N, Akuta N, Kumada H. Predictive values of amino acid sequences of the core and NS5A regions in antiviral therapy for hepatitis C: a Japanese multi-center study *J Gastroenterol.* 2009
- (17) Tahara H, Tanaka Y, Ishiyama K, Ide K, Shishida M, Irei T, Ushitora Y, Ohira M, Banshodani M, Tashiro H, Itamoto T, Asahara T, Imamura M, Takahashi S, Chayama K, Ohdan H. Successful hepatitis B vaccination in liver transplant recipients with donor-specific hyporesponsiveness. *Transpl Int.* 2009
- (18) Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Nishida K, Kato M, Sakai H, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis C in patients co-infected with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *Hepatol Res.* 2009
- (19) Kawaoka T, Aikata H, Takaki S, Katamura Y, Hiramatsu A, Waki K, Takahashi S, Hieda M, Toyota N, Ito K, Chayama K. Transarterial infusion chemotherapy using cisplatin-lipiodol suspension with or without embolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2009
- (20) 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 K, Chayama K. *G-to-A hypermutation in hepatitis B virus and clinical course of patients with chronic HBV infection. J Infect Dis.* 2009
- (21) Higashi Y, Goto C, Hidaka T, Soga J, Nakamura S, Fujii Y, Hata T, Idei N, Fujimura N, Chayama K, Kihara Y, Taguchi A. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2009
- (22) Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Chayama K. Deletion of angiotensin II type I receptor

reduces hepatic steatosis. *J Hepatol.* 2009

(23)Matsumura T, Hu Z, Kato T, Dreux M, Zhang YY, Imamura M, Hiraga N, Juteau JM, Cosset FL, Chayama K, Vaillant A, Liang TJ. *Amphipathic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. Gastroenterology.* 2009

(24)Sumida T, Kitadai Y, Hiyama T, Shinagawa K, Tanaka M, Kodama M, Masuda H, Ito M, Tanaka S, Yoshihara M, Chayama K. Antibodies to Helicobacter pylori and CagA protein are associated with the response to antibacterial therapy in patients with H. pylori-positive API2-MALT1-negative gastric MALT lymphoma. *Cancer Sci*

(25)Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, Kubo M, Tsunoda T, Kamatani N, Kumada H, Puseenam A, Sura T, Daigo Y, Chayama K, Chantratita W, Nakamura Y, Matsuda K. *A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. Nat Genet.* 2009

(26)Takata S, Ito M, Wada Y, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Pathogenetic role of the tyrosine-phosphorylated CagA EPIYA sequence of Helicobacter pylori in histological gastritis in Japanese patients. *J Gastroenterol.* 2009

(27)Urabe Y, Hiyama T, Tanaka S, Oka S, Yoshihara M, Arihiro K, Chayama K. Metachronous multiple esophageal squamous cell carcinomas and Lugol-voiding lesions after endoscopic mucosal resection. *Endoscopy.* 2009

(28)Ito M, Takata S, Tatsugami M, Wada Y, Imagawa S, Matsumoto Y, Takamura A, Kitamura S, Matsuo T, Tanaka S, Haruma K, Chayama K. Clinical prevention of gastric cancer by Helicobacter pylori eradication therapy: a systematic review. *J Gastroenterol.* 2009

(29)Katamura Y, Aikata H, Takaki S, Azakami T, Kawaoka T, Waki K, Hiramatsu A, Kawakami Y, Takahashi S, Kenjo M, Toyota N, Ito K, Chayama K. Intra-arterial 5-fluorouracil/interferon combination therapy for advanced hepatocellular carcinoma with or without three-dimensional conformal radiotherapy for portal vein tumor thrombosis. *J Gastroenterol.* 2009

(30)Kanao H, Tanaka S, Oka S, Hirata M, Yoshida S, Chayama K. Narrow-band imaging magnification predicts the histology and invasion depth of colorectal tumors. *Gastrointest Endosc.* 2009

(31)Mitsui F, Aikata H, Azakami T, Katamura Y, Kimura T, Kawaoka T, Saneto H, Takaki S, Hiraga N, Tsuge M, Waki K, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S, Arihiro K, Chayama K. The first Japanese case of COACH syndrome. *Hepatol Res.* 2009

(32)Kuroda T, Ito M, Wada Y, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshida K, Yoshihara M, Haruma K, Merdh S, Chayama K. Presence of poorly differentiated component correlated with submucosal invasion in the early diffuse-type gastric cancer. *Hepatogastroenterology.* 2008

(33)Tsuiji K, Kawakami Y, Aimitsu S, Kohno H, Aisaka Y, Kimura S, Nagata S, Ohgoshi H, Kitamoto M, Hidaka T, Kawakami H, Nakanishi T, Chayama K. Predicting the response to 48-week combination therapy with peginterferon alpha-2b plus ribavirin from the estimated HCV RNA load index after negative serum change in genotype 1b hepatitis C patients. *Hepatol Res.* 2009

(34)Nakamura S, Kimura M, Goto C, Noma K, Yoshizumi M, Chayama K, Kihara Y, Higashi Y. Cigarette smoking abolishes ischemic preconditioning-induced augmentation of endothelium-dependent vasodilation. *Hypertension.* 2009

(35)Mori N, Imamura M, Kawakami Y, Saneto H, Kawaoka T, Takaki S, Aikata H, Takahashi S, Chayama K. Hiroshima Liver Study Group Randomized trial of high-dose interferon-alpha-2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C: Correlation between amino acid substitutions in the core/NS5A region and virological response to interferon therapy. *J Med Virol.* 2009

(36)Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Haruma K, Chayama K. Effectiveness of prokinetic agents against diseases external to the gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009

(37)Tsukada H, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Fujimoto Y, Tsuge M, Takahashi H, Kumada H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. *A polymorphism in MAPKAPK3 affects response to interferon therapy for chronic hepatitis C. Gastroenterology.* 2009

(38)Kawaoka T, Aikata H, Takaki S, Uka K, Azakami T, Saneto H, Jeong SC, Kawakami Y, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Hirokawa Y, Chayama K. FDG positron emission tomography/computed tomography for the detection of extrahepatic metastases from hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2009

(39)Katamura Y, Aikata H, Kimura Y, Azakami T, Kawaoka T, Takaki S, Waki K, Hiramatsu A, Kawakami Y, Takahashi S, Chayama K. Successful treatment of pulmonary metastases associated with advanced hepatocellular carcinoma by systemic 5-fluorouracil combined with interferon-alpha in a

hemodialysis patient. *Hepatol Res.* 2009

(40) Ohira M, Ishifuro M, Ide K, Irei T, Tashiro H, Itamoto T, Ito K, Chayama K, Asahara T, Ohdan H. Significant correlation between spleen volume and thrombocytopenia in liver transplant patients: a concept for predicting persistent thrombocytopenia. *Liver Transpl.* 2009

(41) Mouri R, Yoshida S, Tanaka S, Oka S, Yoshihara M, Chayama K. Evaluation and validation of computed virtual chromoendoscopy in early gastric cancer. *Gastrointest Endosc.* 2009

(42) Fukumoto A, Tanaka S, Shishido T, Takemura Y, Oka S, Chayama K. Comparison of detectability of small-bowel lesions between capsule endoscopy and double-balloon endoscopy for patients with suspected small-bowel disease. *Gastrointest Endosc.* 2009

(43) Hirata D, Yamabuki T, Miki D, Ito T, Tsuchiya E, Fujita M, Hosokawa M, Chayama K, Nakamura Y, Daigo Y. Involvement of epithelial cell transforming sequence-2 oncoantigen in lung and esophageal cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2009

(44) Kawaoka T, Takahashi S, Aikata H, Azakami T, Saneto H, Takaki S, Jeong SC, Asahara T, Ito K, Chayama K. Beneficial effects of living-donor liver transplantation on esophageal varices. *J Gastroenterol.* 2008

(45) Tashiro H, Itamoto T, Fudaba Y, Ohdan H, Fukuda S, Kohashi T, Amano H, Ishiyama K, Ide K, Ogawa T, Shishida M, Irei T, Ushitora Y, Ohira M, Takahashi S, Chayama K, Asahara T. Prophylaxis against recurrence of HBV hepatitis after living-donor liver transplantation. *Hepatogastroenterology.* 2008

(46) Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Trend in Japanese malpractice litigation involving gastrointestinal endoscopy. *Am J Gastroenterol.* 2009

(47) Kodama H, Aikata H, Takaki S, Takahashi S, Toyota N, Ito K, Chayama K. Evaluation of patients with esophageal varices after endoscopic injection sclerotherapy using multiplanar reconstruction MDCT images. *AJR Am J Roentgenol.* 2009

(48) Mouri R, Yoshida S, Tanaka S, Oka S, Yoshihara M, Chayama K. Usefulness of endoscopic ultrasonography in determining the depth of invasion and indication for endoscopic treatment of early gastric cancer. *J Clin Gastroenterol.* 2009

(49) Ito M, Tanaka S, Maeda M, Takamura A, Tatsugami M, Wada Y, Matsumoto Y, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Role of the gastrin-gastrin receptor system in the expansive growth of human gastric neoplasms. *Digestion.* 2008

(50) Kawaoka T, Kawakami Y, Tsuji K, Ito H, Kitamoto M, Aimitsu S, Kawakami H, Jeong SC, Imamura M, Aikata H, Takahashi S, Chayama K. Dose comparison study of pegylated interferon-alpha-2b plus ribavirin in naïve Japanese patients with hepatitis C virus genotype 2: a randomized clinical trial. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009

(51) Nakao M, Yoshida S, Tanaka S, Takemura Y, Oka S, Yoshihara M, Chayama K. Optical biopsy of early gastroesophageal cancer by catheter-based reflectance-type laser-scanning confocal microscopy. *J Biomed Opt.* 2008

(52) Noma B, Sasaki T, Fujimoto Y, Serikawa M, Kobayashi K, Inoue M, Itsuki H, Kamigaki M, Minami T, Chayama K. Expression of multidrug resistance-associated protein 2 is involved in chemotherapy resistance in human pancreatic cancer. *Int J Oncol.* 2008

(53) Ishida H, Wong JB, Hino K, Kurokawa F, Nishina S, Sakaida I, Okita K, Tamesa T, Oka M, Torimura T, Sata M, Takahashi S, Chayama K, Inoue Y. Validating a Markov model of treatment for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Methods Inf Med.* 2008

(54) Hyogo H, Tazuma S, Arihiro K, Iwamoto K, Nabeshima Y, Inoue M, Ishitobi T, Nonaka M, Chayama K. Efficacy of atorvastatin for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis with dyslipidemia. *Metabolism.* 2008

(55) Kodama M, Kitadai Y, Tanaka M, Kuwai T, Tanaka S, Oue N, Yasui W, Chayama K. Vascular endothelial growth factor C stimulates progression of human gastric cancer via both autocrine and paracrine mechanisms. *Clin Cancer Res.* 2008

(56) Fukumoto A, Tanaka S, Imagawa H, Shishido T, Oka S, Yoshida S, Yamada H, Chayama K. Usefulness and limitations of transabdominal ultrasonography for detecting small-bowel tumors. *Scand J Gastroenterol.* 2009

(57) Soga J, Nakamura S, Nishioka K, Umemura T, Jitsuiki D, Hidaka T, Teragawa H, Takemoto H, Goto C, Yoshizumi M, Chayama K, Higashi Y. Relationship between augmentation index and flow-mediated vasodilation in the brachial artery. *Hypertens Res.* 2008