



図10 TAA誘発マウス肝炎モデルにおける線維化関連遺伝子発現に対するマウスIFN- β の作用検討：
 マウスにTAA 100 mg/kgを2回（48時間間隔）腹腔内投与し、2回目の投与48時間後の肝臓中のmRNA
 発現の変化について、遺伝子マイクロアレイにより網羅的解析を行った。そのうちMMP関連遺伝子
 にフォーカスして解析した。normal：無処置群； Control：溶媒対照投与群； IFN3000： IFN- β 3000
 U/body投与群； IFN30000： IFN- β 30000 U/body投与群

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）

インターフェロンの抗肝線維化分子機構の解明とその応用

分担研究報告書

C型慢性肝炎における肝内マイクロ RNA 発現解析

分担研究者 村上善基 京都大学・ゲノム医学センター 産学官連携准教授

研究要旨

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性化し、慢性肝炎、肝硬変をへて肝細胞癌に発育する。慢性C型肝炎患者肝組織中のマイクロRNA発現解析により、インターフェロン応答、肝線維化の進展、肝発癌に関係するマイクロRNAを同定した。特に肝細胞癌においてマイクロRNAは肝組織だけではなく末梢血でも発現の変化が見られた。またマウス慢性肝障害モデルを用いた肝組織マイクロRNA発現解析ではヒトの解析結果と同様のマイクロRNAが肝線維化と関係する事が明らかになり、種を超えて共通したマイクロRNAが慢性肝疾患と関係する事が明らかになった。慢性肝疾患の病態解析にマイクロRNA情報基盤を作成する事は診断、治療を目指した臨床応用に直結し非常に有用である。

A. 研究目的

我が国のHCV感染者は約300万人と推定されている、HCVは感染すると高率に慢性化し年余をへて結果肝硬変に移行し、肝細胞癌を発生する事が知られている。肝の線維化は病期の進展に深く関係するだけではなく、線維化の程度は肝疾患の最終段階である肝細胞癌発生の素因となっている。特に肝硬変からの発癌は年率8%に上っている。本邦における慢性肝疾患の年間死亡者数は約3.4万人に至っている事から感染対策や、肝線維化の制御策は急務である。しかし現状では満足のいくHCV感染者に対する治療結果が得られていない。この原因としてウイルスの増殖メカニズムが十分に解明されていないことがある。また慢性肝炎において炎症を持続するメカニズム、線維化を進展するメカニズムを明らかにする事、または抗ウイルス剤に対する応答を規定する宿主、ウイルス側因子それぞれを明らかにし、慢性肝疾患を制御方法の確立が必要である。我々は今までに慢性肝

炎から肝硬変、肝細胞癌に至る慢性肝疾患のマイクロRNA発現プロファイルを作成した。これらのデータを基盤として、本解析では(1)慢性C型肝炎の薬剤応答に関与するマイクロRNAを同定し、治療効果予測アルゴリズムの作成する事、(2)肝線維化の程度と相関するマイクロRNAを明らかにし、線維化進展に関係するマイクロRNA発現プロファイルの作成、(3)末梢血マイクロRNAを利用して、肝疾患の新たなバイオマーカーの作成、これらの解析を行い、包括的に慢性肝疾患を制御する治療方法、診断方法を開発する事を目標としている。

B. 研究方法

C型肝炎患者肝組織におけるマイクロRNA発現解析
pegインターフェロン+リバビリン併用療法前に採取した肝生検組織99例よりからマイクロRNA発現プロファイルをマイクロアレイ解析に

て治療効果別に作成した。

さらに今までに抗ウイルス療法を行っていない慢性C型肝炎患者105例よりマイクロRNA発現プロファイルをマイクロアレイ解析で取得した。

肝細胞癌に関係する末梢血マイクロRNA発現解析

肝細胞癌患者22例の血清を肝細胞癌の治療前と治療後からそれぞれ採取した。末梢血より血清を分離しtotal RNAを抽出しリアルタイムPCR法にてマイクロRNAの発現を解析した。平行してがん組織標本においてマイクロRNAの発現をin situ hybridizationにて解析した。

(倫理面への配慮)

既にこの解析に関する臨床研究[京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会より平成18年、G-188「肝発癌に関与しているmiRNAをコードしている領域のSNP解析」承認]、平成19年、G-219「miRNA発現プロファイルを利用したC型肝炎ウイルス遺伝子型別治療法の新規開発」、組み換えDNA実験計画平成19年、070102「マイクロを用いたHCV複製制御の試み」について検体採取機関と当施設の倫理申請を行い、承認を受けている(平成19-23)。

この中で肝疾患患者などからの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮している。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供資料や個人

情報を適正に管理保存する。動物実験に関しては、「動物の保護及び管理に関する法律」や「実験動物の飼育及び保管に関する基準」及び「大学等における実験動物について」の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮した。当該所属機関の動物実験倫理委員会に申請し承認を受けた後、実施している。

C. 結果

マイクロRNAによるC型肝炎治療効果予測

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法効果別のマイクロRNA発現プロファイルを作成した。NRとSVR症例で比較した場合3種のマイクロRNA(miR-27、miR-422b、miR-378)がSVRで発現が亢進しており、5種のマイクロRNA(miR-18a、miR-652、miR-34b、miR-143、miR-145)がNRで発現が亢進していた。発現プロファイル結果をMonte Carlo Cross Validationを用いて治療効果をシミュレーションした。SVRとnon-SVRの予測は70.5%、RとNRの予測は70.0%と高い確率で行なう事が出来た。さらに治療効果別に発現に差が見られたマイクロRNAの標的遺伝子候補を数種同定した。

肝線維化と関係するマイクロRNAの解析

慢性C型肝炎患者105例を用いて線維化の程度別に肝組織中マイクロRNA発現プロファイルを作成した。その結果線維化の程度に応じて発現の変化するマイクロRNAを数種同定した。ヒト肝組織のデータを検証するためにマウス慢性肝疾患モデルを用い線維化を四塩化炭素で誘導し線維化進展に関与しているマイクロRNAを解析した。対照としてオリーブオイルと投与し、組織学的に

肝線維化を誘導していないマウスを用いた。ヒトとマウス共通して線維化のステージが進行するにつれて、発現が亢進するマイクロ RNA を4種得た(miR-199a, miR-199a*, miR-200a, miR-200b)。この4種のマイクロ RNA はヒト肝星細胞株のLX-2 に過剰発現した所、線維化に関係する遺伝子(procollagen α 1, MMP13, TIMP1)の発現を亢進させた。ウイルス感染などで肝に炎症が起きると肝組織は TGF α を放出し肝星細胞は刺激を受け線維化が亢進するが、その際にも procollagen α 1, MMP13, TIMP1 の発現は亢進したため、miR-199a, miR-199a*, miR-200a, miR-200b の過剰発現は肝線維化を亢進するマイクロ RNA であると考えられた。

またF0/F1, F1/F2, F2/F3それぞれの肝線維化ステージをleave one out cross-validationを用いて分別すると80%以上の確率でそれぞれを識別する事ができた。

肝発癌と関係する末梢血マイクロRNAの解析

肝細胞癌22例の治療前後の血清より抽出した total RNAを用いて解析した所miR-92a/miR-638の比が癌のある場合には値が低く、癌の切除またはラジオ波などで治療した後にはその値が亢進している事を明らかにした。外科的に切除したがん組織を用いてmiR-92aの発現をin situ hybridization法を用いて解析した所、miR-92aの発現は癌部で亢進していた。miR-92a/miR-638の発現比を肝細胞癌患者と慢性肝炎患者で比較すると、がん患者で発現比が低下していた。さらに肝癌細胞株にmiR-92aを過剰発現すると細胞株の増殖能が亢進し、miR-92aの機能を抑制すると細胞の増殖能は亢進しなかった。

D. 考察

ペグインターフェロン+リバビリン併用療法効果に関係したマイクロ RNA はプロファイル解析より治療効果予測を行う事ができる。またマイクロ RNA の機能解析を行う事により従来の解析で明らかにならなかった生体の抗ウイルス作用のメカニズムにアプローチできる可能性があり、その事は新たな治療方法を作成する事ができる。またマイクロ RNA はHCVの複製を制御する事を示した (Murakami Y et al. 2009. J. Hepatol)。この事はマイクロ RNA そのものが抗ウイルス薬としてのポテンシャルが有る事を示しており、マイクロ RNA はウイルス側、宿主側の両面からウイルス感染を制御する可能性がある。

線維化の程度別にマイクロ RNA 発現が異なり、in vitro 解析で肝線維化の際に最も活動する肝星細胞の活性を増殖する事が明らかになった。慢性炎症とそれにより続発する肝線維化に対してマイクロ RNA もこの一連の現象に関与しており、肝線維化そのものを制御する可能性をもっていると考えられる。線維化程度別に慢性肝炎のマイクロ RNA 発現プロファイルを構築した事により、肝線維化進行のメカニズム解析の有用な情報となった。現状の肝線維化の評価は専門の病理診断によるものが golden standard であり、簡便に診断が出来ない点、病理医間での診断の差、再現性、等が問題となっている。血液検査や画像診断ではF4とそれ以外を分別する事が出来るが、F0, 1, 2, 3それぞれを分別する事が出来ない。今回我々は任意の二群間を抽出し、それらを高い正確性で分別ができることを示したため、客観的に診断できる新たな線維化マーカーの実現への布石を示した。

末梢血のマイクロ RNA は現在の所その存在意義は十分に明らかになっていないが、肝細胞癌と相関してその発現が変化している事がわかった。従来の腫瘍マーカーとの感度、特異性と比較する必要が有るが、新たなバイオマーカーとしての利用が期待される。

E. 結論

慢性肝疾患の状態においてマイクロ RNA 発現プロファイルはそれぞれ固有のものをもっている事が明らかになった。この情報を利用した新たな診断ツールとして用いる事ができる可能性を示した。患者別に治療効果、副作用回避を元に治療方法の選択ができ、テーラーメイド医療として期待される。また肝線維化や肝炎、肝発癌などのときに見られる生体内の、またはウイルスの情報伝達をマイクロ RNA 発現が深く関与しているために、情報伝達経路を制御する新たな遺伝子治療の開発の布石となる事が期待される。

F. 健康危険情報
特記事項なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y. Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in

chronic hepatitis C PLoS One. (in press).

2. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis. PLoS One. 2011 Jan 24;6(1):e16081.

3. Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K. Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C. BMC Medical Genomics. 2010; 3: 48

4. Arimoto K, Fumani K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K. Polyubiquitin conjugation to NEMO by TRIM23 is critical in antiviral defense. PNAS 2010; 107: 15856-61

5. Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. Pathol Int. 2010; 60: 351-357

6. Murakami Y, Ali HH, Tajima A, Inoue I, and Shimotohno K. Novel approach for HCV regulation by miR-199a*. Journal of

Hepatology. 50: 453-460, 2009

7. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. Biomarkers. 2009; 14: 529-38.

8. Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, and Murakami Y. Impact of Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Integration in Liver Tissue on Hepatocellular Carcinoma Development in Serologically HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients. Journal of Hepatology. 48: 43-50, 2008

9. Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, and Inoue I. Integration of Hepatitis B Virus DNA into the Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia (*MLL4*) Gene and Rearrangements of *MLL4* in Human Hepatocellular Carcinoma. Hum Mutat. 2008;29:703-8

10. 村上善基、安田 剛 マイクロアレイを用いた miRNA の大規模発現解析 RNA 実験ノート 羊土社 2008

11. 村上善基 マイクロ RNA の発現異常と肝発癌の関与 細胞 42 (6) 2010

regulation by using miRNA. JCA 66th Annual meeting, Yokohama October 3-5, 2007

2. Murakami Y, Okanoue T and Shimotohno K. Aberrant expression of miR-224 has a potential for hepatocarcinogenesis. JCA 67th Annual meeting, Nagoya October 3-5, 2008

3. 村上善基、豊田秀徳、下遠野邦忠。マイクロ RNA 発現プロファイルを用いた慢性 C 型肝炎ウイルス治療効果予測。第 13 回日本肝臓学会大会

平成 21 年 10 月 14-17 日 京都市

4. 第 32 回日本分子生物学会年会バイオテクノロジーセミナー

平成 21 年 12 月 11 日 横浜市

5. AACR 101st annual meeting 2010

Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. April 17-21, Washington, DC

6. 村上善基、Over expression of miR-199 and 200 families is associated to the progression of liver fibrosis 第 69 回日本癌学会学術総会

平成 22 年 9 月 22 日 大阪市

7. 村上善基、インターフェロン関連遺伝子解析発現パターンを利用した慢性 C 型肝炎治療効果予測

第 75 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会

平成 22 年 6 月 25 日 北九州市

2) 学会発表

1. Murakami Y, Ali HH, Hijikata M, and Shimotohno K. Novel approach for HCV

H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

- | | |
|--|---------------------------|
| 1. 遺伝子発現解析を用いた肝線維化の評価方法. 村上善基. 特願 2010-86966 (H22-4-5) | 2. 実用新案登録
なし
3. その他 |
| 2. 慢性 C 型肝炎の治療効果予測方法. 村上善基. 特願 2009-229977 (H21-9-7) | なし |

研究成果の刊行に関する一覧表

研究代表者 河田 則文

書籍 なし

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
<u>Kawada N</u>	Evolution of hepatic fibrosis research.	Hepatol Res.	41	199-208	2011
Tamori A, Koike T, Goto H, Waikita S, Tada M, Morikawa H, Enomoto M, Inaba M, Nakatanishi T, Hino M, <u>Kawada N</u>	Prospective study of reactivation of hepatitis B virus in patients with rheumatoid arthritis who received immunosuppressive therapy: evaluation of both HBsAg-positive and HBsAg-negative cohorts.	J Gastroenterol.	46	556-64	2011
Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, <u>Kawada N</u>	Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon-β-induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation.	J Cell Physiol.		In press	
Enomoto M, Mori M, Ogawa T, Fujii H, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Sawada A, Takeda S, Habu D, Shiomi S, <u>Kawada N</u>	Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B: Regression of liver stiffness during entecavir therapy.	Hepatol Res.	40	853-61	2010
Morikawa H, Fujikuda K, Kobayashi S, Fujii H, Iwai S, Enomoto M, Tamori A, Sakaguchi H, <u>Kawada N</u>	Real-time tissue elastography as a tool for the noninvasive assessment of liver stiffness in patients with chronic hepatitis C.	J Gastroenterol.	46	350-8	2011
Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, <u>Kawada N</u>	A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits.	Am J Pathol.	177	153-65	2010
Spector I, Honig H, <u>Kawada N</u> , Nagler A, Genin O, Pines M	Inhibition of pancreatic stellate cell activation by honofuginone prevents pancreatic xenograft tumor development.	Pancreas.	39	1008-15	2010

Enomoto M, Tamori A, Kawada N	Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus.	Rev Recent Clin Trials	4	179-84	2009
Mu YP, Ogawa T, Kawada N	Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet.	Lab Invest.	90	245-56	2010
Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N	Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells.	Biochem Biophys Res Commun.	391	316-21	2010
Tamori A, Enomoto M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Sakaguchi H, Habu D, Shiomi S, Imanishi Y, Kawada N	Add-on combination therapy with adefovir dipivoxil induces renal impairment in patients with lamivudine-refractory hepatitis B virus.	J Viral Hepat.	17	123-9	2010
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N	Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis.	Hepatol Int.	3	378-83	2009
Ogawa T, Kawada N, Ikeda K	Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells.	Hepatol Int.	3	497-503	2009
Tamori A, Hayaishi T, Shinzaki M, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Morikawa H, Sakaguchi H, Shiomi S, Takemura S, Kubo S, Kawada N	Frequent detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma of patients with sustained virologic response for hepatitis C virus.	Med Virol.	81	1009-14	2009
Smedsrød B, LeCouteur D, Ikejima K, Jaeschke H, Kawada N, Naito M, Knolle P, Nagy L, Senoo H, Vidal-Vanaclocha F, Yamaguchi N	Hepatic sinusoidal cells in health and disease: update from the 14th International Symposium.	Liver Int.	29	490-501	2009

研究分担者 池田 一雄

書籍 なし

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
Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N	Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- β -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation.	Hepatol Res.		In press	
Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N	Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells.	Biochem Biophys Res Commun.	391	316-21	2010
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N	Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis.	Hepatol Int.	3	378-83	2009
Ogawa T, Kawada N, Ikeda K	Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells.	Hepatol Int.	3	497-503	2009
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Kawada N	Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet.	Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.	294	R311-20	2008

研究代表者 小川 智弘

書籍 なし

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
Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N	Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- β -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation.	J Cell Physiol.		In press	2010
Enomoto M, Mori M, Ogawa T, Fujii H, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Sawada A, Takeda S, Habuda D, Shiomi S, Kawada N	Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B: Regression of liver stiffness during entecavir therapy.	Hepatol Res.	40	853-61	2010

Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, Kawada N	A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits.	Am J Pathol.	177	153-65	2010
Mu YP, Ogawa T, Kawada N	Reversibility of fibrosis, inflammation, and endoplasmic reticulum stress in the liver of rats fed a methionine-choline-deficient diet.	Lab Invest.	90	245-56	2010
Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N	Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells.	Biochem Biophys Res Commun.	391	316-21	2010
Ogawa T, Kawada N, Ikeda K	Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells.	Hepatol Int.	3	497-503	2009
Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N	Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis.	Hepatol Int.	3	378-83	2009
小川智弘, 河田則文	【肝の線維化を探る】線維化のMechanism 肝線維化と細胞間ネットワーク	肝・胆・膵	57	205-209	2008

研究代表者 田守 昭博

書籍 なし

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
Noguchi N, Tamori A, Ogura N, Hori Y, Ikeda S, Nishiguchi S.	Investigation of Interferon- α Response by a Single Amino Acid Substitution of Nonstructural Protein 5A in Hepatitis C Virus Infected Patients.	J Interferon Cytokine Res.		in press	2011

Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, <u>Tamori A</u> , Nishimura-Saku rai Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Ito Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M.	Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C.	J Med Virol.	83	871-878	2011
Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, <u>Tamori A</u> , Nakagawa M, Izumi N.	Sequences in the Interferon Sensitivity Determining Region and Core Region of Hepatitis C Virus Impact Pretreatment Prediction of Response to Peg-interferon Plus Ribavirin: Data Mining Analysis.	J Med Virol.	83	445-52	2011
Morikawa H, Fukuda K, Kobayashi S, Fujii H, Iwai S, Enomoto M, <u>Tamori A</u> , Sakaguchi H, Kawada N.	Real-time tissue elastography as a tool for the noninvasive assessment of liver stiffness in patients with chronic hepatitis C.	J Gastroenterol.	46	350-358	2011
Izumi N, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, <u>Tamori A</u> , Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M.	Management of hepatitis C: Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009).	Hepatol Res.	40	347-368	2010
Habu D, Nishiguchi S, Nakatani S, Lee C, Enomoto M, <u>Tamori A</u> , Takeda T, Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Kawamura E, Shiomi S.	Comparison of the effect of BCAA granules on between decompensated and compensated cirrhosis.	Hepatogastroen terology.	56	1719-1723	2009

<u>Tamori A</u> , Enomoto M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Sakaguchi H, Habu D, Shiomi S, Imanishi Y, Kawada N.	Add-on combination therapy with adefovir dipivoxil induces renal impairment in patients with lamivudine-refractory hepatitis B virus.	J Viral Hepat.	17	123-129	2010
Enomoto M, <u>Tamori A</u> , Kawada N.	Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus.	Rev Recent Clin Trials	4	179-184	2009
Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, <u>Tamori A</u> , Sakaguchi H, Kawada N.	Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD.	Gut	58	1566-1567	2009
Kawamura E, Habu D, Morikawa H, Enomoto M, Kawabe J, <u>Tamori A</u> , Sakaguchi H, Saeki S, Kawada N, Shiomi S.	A randomized pilot trial of oral branched-chain amino acids in early cirrhosis: validation using prognostic markers for pre-liver transplant status.	Liver Transpl..	15	790-797	2009
Morimoto K, Yamagami H, Hosomi S, Ohira M, Suekane T, Kamata N, Sogawa M, Watanabe K, Tominaga K, Watanabe T, Fujiwara Y, <u>Tamori A</u> , Oshitani N, Arakawa T.	Development of pouchitis with combination therapy with peg-interferon alpha-2b and ribavirin for chronic hepatitis C in a patient with ulcerative colitis who underwent pouch surgery.	Am J Gastroenterol.	104	1609-1610	2009
Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Ohfuji S, Mori M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, <u>Tamori A</u> , Sakaguchi H, Ikura Y, Ueda M, Kawada N.	Noninvasive laboratory tests proposed for predicting cirrhosis in patients with chronic hepatitis C are also useful in patients with non-alcoholic steatohepatitis.	J Gastroenterol.	44	608-614	2009

<u>Tamori A</u> , Hayashi T, Shinzaki M, Kobayashi S, Iwai S, Enomoto M, Morikawa H, Skaguchi H, Shiomi S, Takemura S, Kubo S, Kawada N.	Frequent detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma of patients with sustained virologic response for hepatitis C virus.	J Med Virology	81	1009-1014	2009
Shinkawa H, Nakai T, <u>Tamori A</u> , Tanaka H, Takemura S, Ohba K, Uenishi T, Ogawa M, Yamamoto S, Hai S, Ichikawa T, Kodai S, Hirohashi K, Wakasa K, Kubo S.	Hepatocellular carcinoma (HCC) recurring 10 years after clearance of hepatitis B surface antigen and 20 years after resection of hepatitis B virus-related HCC.	Int J Clin Oncol.	13	562-566	2008
Enomoto M, Sakaguchi H, Ominami M, Iwai S, Morikawa H, <u>Tamori A</u> , Kawada N.	Sildenafil-induced severe cholestatic hepatotoxicity.	Am J Gastroenterol.	104	254-255	2009
Enomoto M, Nakamishi T, Ishii M, <u>Tamori A</u> , Kawada N.	Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis.	Ann Intern Med.	149	912-913	2008
Enomoto M, Yamane T, Hino M, Ohnishi M, <u>Tamori A</u> , Kawada N.	Platelet-associated IgG for the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura during peginterferon alpha and ribavirin treatment for chronic hepatitis C.	Liver Int.	28	1314-1315	2008
Ohfuji S, Fukushima W, Tanaka T, Habu D, Takeda T, <u>Tamori A</u> , Sakaguchi H, Seki S, Kawada N, Nishiguchi S, Shiomi S, Hirota Y.	Does a late evening meal reduce the risk of hepatocellular carcinoma among patients with chronic hepatitis C?	Hepatol Res.	38	860-868	2008

Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, Hayashi T, Morikawa H, Jomura H, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Shiomi S, Nishiguchi S.	Optimal duration of additional therapy after biochemical and virological responses to lamivudine in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: a randomized trial.	Hepatol Res.	38	954-959	2008
Hayashi T, Tamori A, Nishikawa M, Morikawa H, Enomoto M, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Kubo S, Nishiguchi S, Shiomi S.	Differences in molecular alterations of hepatocellular carcinoma between patients with a sustained virological response and those with hepatitis C virus infection.	Liver Int.	29	126-132	2009
Takahara Y, Takahashi M, Zhang QW, Wagatsuma H, Mori M, Tamori A, Shiomi S, Nishiguchi S.	Serial changes in expression of functionally clustered genes in progression of liver fibrosis in hepatitis C patients.	World J Gastroenterol.	14	2010-2022	2008
Hennig BJ, Fry AE, Hirai K, Tahara H, Tamori A, Moller M, Hopkin J, Hill AV, Bodmer W, Beverley P, Tchilian E.	PTPRC (CD45) variation and disease association studied using single nucleotide polymorphism tagging.	Tissue Antigens.	71	458-463	2008
松本健二、高橋峰子、田守昭博、西口修平.	大阪市における C 型肝炎ウイルス検診と肝炎フォローアップ事業の検討.	日本公衆衛生学会	7	35-39	2008

研究代表者 榎本 大

書籍 なし

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
Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, Hayashi T, Morikawa H, Jomura H, Sakaguchi H, Habu D, Kawada N, Shiomi S, Nishiguchi S	Optimal duration of additional therapy after biochemical and virological responses to lamivudine in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B: a randomized trial	Hepatol Res	38	954-9	2008

Enomoto M, Yamane T, Hino M, Ohnishi M, Tamori A, Kawada N	Platelet-associated IgG for the diagnosis of immune thrombocytopaenic purpura during peginterferon alpha and ribavirin treatment for chronic hepatitis C	Liver Int	28	1314-5	2008
Enomoto M, Kanamishi T, Ishii M, Tamori A, Kawada N	Entecavir to treat hepatitis B-associated cryoglobulinemic vasculitis	Ann Intern Med	149	912-3	2008
Enomoto M, Sakaguchi H, Ominami M, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Kawada N	Sildenafil-induced severe cholestatic hepatotoxicity	Am J Gastroenterol	104	254-5	2009
Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Ohfuji S, Mori M, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Ikura Y, Ueda M, Kawada N	Noninvasive laboratory tests proposed for predicting cirrhosis in patients with chronic hepatitis C are also useful in patients with non-alcoholic steatohepatitis	J Gastroenterol	44	608-14	2009
Fujii H, Enomoto M, Fukushima W, Tamori A, Sakaguchi H, Kawada N	Applicability of BARD score to Japanese patients with NAFLD	Gut	58	1566-7	2009
Enomoto M, Tamori A, Kawada N	Emerging antiviral drugs for hepatitis C virus	Rev Recent Clin Trials	4	179-84	2009
Enomoto M, Mori M, Ogawa T, Fujii H, Kobayashi S, Iwai S, Morikawa H, Tamori A, Sakaguchi H, Sawada A, Takeda S, Habuda D, Shiomi S, Kawada N	Usefulness of transient elastography for assessment of liver fibrosis in chronic hepatitis B: regression of liver stiffness during entecavir therapy	Hepatol Res	40	853-61	2010
榎本大, 根来伸夫, 藤井英樹, 小林佐和子, 岩井秀司, 森川浩安, 田守昭博, 坂口浩樹, 羽生大記, 塩見進, 河田則文	HBV関連クリオグロブリン血症における抗ホスファチジルセリン・プロトロンビン複合体抗体の意義	肝臓	51	454-456	2010
榎本大, 田守昭博, 西口修平, 河田則文	核酸アナログ/IFN sequential治療の有用性とその限界	日本消化器病学会雑誌	52	115-119	2011

研究代表者 鈴木 知比古

書籍 なし

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
木綿しのぶ, 鈴木知比古	IL-1 β とその内在性アンタゴニストIL-1Ra のバランスから考える I 型インターフェロンの作用の違い(The difference between Type I Interferons in the balance of IL-1 β and IL-1Ra).	細胞	43	349-352	2010
西村和美, 鈴木知比古	I 型インターフェロンの肝線維化改善メカニズム (The mechanism of action of type I interferon to improve liver fibrosis)。	細胞	41	35-38	2009

研究代表者 村上 善基

書籍 なし

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
Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno K, Fujita T, and Murakami Y.	Dysregulation of IFN system can lead to poor response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C	PLoS One.		in press	
Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K.	Overexpression of miR-199 and 200 families is associated with the progression of liver fibrosis.	PLoS One.	6(1)	e16081.	2011

Murakami Y, Tanaka M, Toyoda H, Hayashi K, Kuroda M, Tajima A, and Shimotohno K.	Hepatic microRNA expression is associated with the response to interferon treatment of chronic hepatitis C.	BMC Medical Genomics.	3	48	2010
Arimoto K, Fumani K, Saeki Y, Tanaka K, Okawa K, Takeuchi O, Akira S, Murakami Y, Shimotohno K.	Polyubiquitin conjugation to NEMO by TRIM23 is critical in antiviral defense.	PNAS	107	15856-61	2010
Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito S, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M.	Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development.	Pathol Int	60	351-357	2010
Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T.	MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma.	Biomarkers.	14	529-38	2009
Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K.	Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a(*)	<i>J Hepatology</i>	50	453-460	2009

Toyoda H, Kumada T, Kaneoka Y, and Murakami Y.	Impact of Hepatitis B Virus (HBV) X Gene Integration in Liver Tissue on Hepatocellular Carcinoma Development in Serologically HBV-Negative Chronic Hepatitis C Patients.	J hepatology	48	43-50	2008
Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, and Inoue I.	Integration of Hepatitis B Virus DNA into the Myeloid/Lymphoid or Mixed-Lineage Leukemia (MLL4) Gene and Rearrangements of MLL4 in Human Hepatocellular Carcinoma.	Human mutation	29	703-708	2008
村上善基、安田剛	マイクロアレイを用いた miRNA の大規模発現解析	稲田利文、塩見春彦	RNA 実験ノート	羊土社	2008
村上善基	マイクロ RNA の発現異常と肝発癌の関与	細胞	42	244-247	2010

Review Article**Evolution of hepatic fibrosis research**

Norifumi Kawada

Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Japan

Molecular analysis of hepatic fibrogenesis has progressed with respect to both fibrosis progression and regression by using cell biological, molecular biological and (epi)genetic approaches. Recent researches have revealed sources of collagen-producing cells other than hepatic stellate cells in the liver, and the involvement of the innate immune system and oxidative stress in the fibrotic process has attracted new attention. Together with these advancements in basic knowledge on the cellular and molecular biology of hepatic fibrosis, clinical researches have linked the clarification of the relationship between progression of the fibrosis stage and therapeutic efficacy for chronic viral hepatitis and non-alcoholic

steatohepatitis and validation of the regression of advanced fibrosis, even cirrhosis, of appropriate therapies using modern medicines. Furthermore, non-invasive assessment of liver fibrosis using an ultrasound-based modality has become a focus in the clinical diagnosis of liver fibrosis instead of liver biopsy. Taken together, liver fibrosis research has been evolving both basically and clinically in the past three decades.

Key words: collagen, cytokine, growth factor, stellate cell, transient elastography

INTRODUCTION

LIVER FIBROSIS HAS been investigated actively since hepatic stellate cells (HSC) were identified by Dr Scott Friedman in 1985¹ as the principal collagen producing cells in the liver. According to a PubMed search, 3304 related papers were published in 2009 and 15 377 have appeared in the past 5 years. In particular, the latest investigation on liver fibrosis introduced information on epithelial-mesenchymal transition, the innate immune response, and genetic and epigenetic mutations and single nucleotide polymorphisms (SNP) of genes, particularly for the analysis of human liver fibrosis.² Liver fibrosis research has gained global attention because of its close relationship with disease progression triggered by hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV) infection, which leads to end-stage liver cirrhosis and ultimately to hepatocellular carcinoma (HCC).³ Although the number of deaths from HCC has tended to gradually decrease, it still exceeds 30 000 cases in Japan and its incidence has been increasing in the

USA and Europe, presumably by the spread of HCV infection and the occurrence of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus, resulting in enthusiastic research on liver fibrosis as the origin of HCC development.⁴ In particular, it is an urgent problem for future health care in Asia and Africa where a huge number of patients are infected with HCV and/or HBV. However, in spite of the progression of basic liver fibrosis research, effective medicines for liver fibrosis that can be applied in clinical practice have not yet been developed while the eradication of hepatitis viruses, in particular HCV, has greatly progressed.⁵ In contrast, clinical diagnosis of the stage of liver fibrosis has evolved in the area of non-invasive assessment of liver fibrosis using serum markers and ultrasound-based technology instead of the “gold standard” liver biopsy. In this review, the recent evolution of hepatic fibrosis investigation will be discussed.

Evolution of molecular analyses of liver fibrosis

Liver fibrosis is initiated by the accumulation of extracellular matrix materials (ECM), including type I collagen which are generated by activated HSC and hepatic myofibroblasts (MFB). Accordingly, their regulation of ECM production is logical with respect to developing therapeutic strategies for liver fibrosis.

Correspondence: Dr Norifumi Kawada, Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan. Email: kawadanori@med.osaka-cu.ac.jp
Received 1 December 2010; revision 20 December 2010; accepted 23 December 2010.