

201030009B (1/2)

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

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

平成 20 年度～22 年度 総合研究報告書

(1/2冊)

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 23 (2011) 年 4 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

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

平成 20 年度～22 年度 総合研究報告書

(1/2 冊)

研究代表者 茶 山 一 彰

平成 23 年 (2011 年) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

- 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 1
茶山 一彰

(資料) 分担研究報告

1. 肝炎ウイルスに *in vivo* で相互作用するタンパク質の解析 15
-薬剤感受性の分子的機構解明のためのアプローチ-
吉里 勝利
 2. 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 21
金子 周一
 3. レプリコンを用いた C 型肝炎ウイルス増殖に関与する宿主分子の網羅的 . . . 27
解析、リバーシジェネティックスの構築
土方 誠
 4. インターフェロン- γ 遺伝子治療を基盤とした治療抵抗性 C 型肝炎治療 . . . 33
システムの構築
高倉 喜信
 5. 肝炎ウイルス全ゲノム解析を用いた病態と治療感受性を規定するウイルス . . . 39
領域の検討
前川 伸哉
 6. HCV 感染細からの選択的なウイルス排除システムの開発と IL28B 遺伝子 . . . 44
多型と IFN 治療感受性の相関とその意義
松浦 善治
 7. ヒト肝細胞移植キメラマウスを用いたウイルス排除機構の解析 51
大段 秀樹
 8. ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規抗 HCV 薬の効果判定 62
今村 道雄
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 69
- III. 研究成果の刊行物・別刷り 81

I. 総合研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

総合研究報告書

（平成20～22年度）

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

研究代表者 茶山一彰 広島大学病院消化器内科 教授

研究要旨：我々は、B型(HBV)あるいはC型肝炎ウイルス(HCV)を感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いて、抗ウイルス作用を有する薬剤の探索、ウイルス増殖に関連するヒト遺伝子の探索を行うとともに、探索された分子の薬剤としての可能性を検証してきた。本研究において、HBVおよびHCV全長クローンをを用いたリバーシジェネティクスの系を世界にさきがけ確立した。特にHCVにおいては、1a, 1b, 2a, 2bの4種類のgenotypeのリバーシジェネティクスの系を構築した。この系を応用し、種々の変異ウイルスを感染させたマウスを作製し、HBx蛋白の機能解析、あるいは変異ウイルスの複製能およびインターフェロンやprotease阻害剤に対する感受性を検証するシステムを構築した。またキメラマウスを用いてHCVに対する新規治療法を開発した。なかでも異なるHCV蛋白を標的とした薬剤を組み合わせることにより、IFN製剤を使用せずともHCVを排除する治療法は、今後のC型慢性肝炎に対する中心的な治療法となる可能性がある。またキメラマウスの系、肝炎ウイルス細胞培養系あるいは多数の患者サンプルを用いて、遺伝子発現プロファイルの検討あるいは、新規治療薬標的分子の探索を行った。またHCVのCoreおよびISDR変異や宿主のIL28B遺伝子多型が、インターフェロンの治療効果と密接に関与していることを明らかにした。本研究を通じて見いだされたこれら候補遺伝子や治療抵抗性に関与するウイルスおよび宿主因子は、今後のさらなる創薬および新規治療法の開発に応用されるものになると思われる。

【分担研究者】

吉里勝利	広島大学大学院理学系研究科	教授
金子周一	金沢大学大学院医学系研究科	教授
高倉喜信	京都大学大学院薬学研究科	教授
松浦喜治	大阪大学微生物研究所	教授
大段秀樹	広島大学大学院医学系研究科	教授
土方 誠	京都大学ウイルス研究所	准教授
前川伸哉	山梨大学大学院消化器内科学	講師
今村道雄	広島大学大学院医学系研究科	助教

【班長研究協力者】

脇田隆宇	国立感染研究所ウイルス第二部	部長
------	----------------	----

A. 研究目的

我々は、ヒト肝細胞キメラマウスを使用し、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)の感染実験を行い、感染の成立、パッセージ、薬剤の有効性の評価が可能であることを確認してきた。さらにHBV、HCVのクローンを用いて、リバーシジェネティックスの系も構築した。本研究では、これら肝炎ウイルス感染ヒト肝細胞キメラマウスの系、肝炎ウイルスの細胞培養系および肝炎ウイルス感染患者の臨床サンプルを用いて、肝炎ウイルスのウイルス学的解析、各種耐性ウイルスに対する治療薬の効果判定、感染の成立、予防に関する研究を下記の点につき重点的に行った。

- ①ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規治療薬標的分子の探索と効果実証システムの構築
- ②培養細胞を用いた新規治療薬標的分子の探索と効果実証システムの構築
- ③治療抵抗性に関与するウイルス因子の探索とその対策

B. 研究方法

8名の分担研究者および1名の班長研究協力者の協力の下に、目的にあげた3つの項目を柱とした研究を3年間にわたって実施した。

C. 結果および考察

①ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規治療薬標的分子の探索と効果実証システムの構築：1.4倍長のHBV (genotype C)発現 plasmid を transfection した細胞培養上清をマウスに投与することにより、リバーシジェネティックスの系を確立した。この系を応

用し、HBx 欠損クローンを用いることにより、HBx 蛋白がHBVの感染・複製に必須であり、抗ウイルス療法のターゲットとなり得ることを見いだした(茶山, 今村班員)。HCVに関しては, genotype 1a, 1b, 2a および 2b 型の全長遺伝子を用いたリバーシジェネティックスの系を確立した(茶山, 今村班員)。この系を応用し, Core や ISDR, あるいは NS 領域にアミノ酸変異を挿入することにより, 変異ウイルスの薬剤耐性能および複製能を検証する系を作製した(今村班員)。HBV 及び HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスの肝組織遺伝子発現プロファイルを検討した。その結果, HBV, HCV 感染に伴うマウス肝臓内の遺伝子発現は明瞭に異なっており, HBV 感染マウスではアポトーシス関連遺伝子, Ras シグナル, p53 関連遺伝子の発現上昇が認められ, HCV 感染マウスではサイトカイン, 炎症シグナル関連遺伝子の発現が認められた(金子班員)。また micro RNA (miRNA)の発現もHBVおよびHCV感染では異なっており, それら miRNA の制御候補遺伝子を検索した結果, HBV 感染では細胞死・DNA 障害, 細胞周期, 癌関連遺伝子, HCV 感染ではケモカイン・サイトカイン, 線維化, 代謝, 抗アポトーシス関連遺伝子が制御候補遺伝子として挙げられており, これらの発現変動は miRNA の発現により制御されている可能性が示唆された。本マウスへ種々の遺伝子を導入するため, 肝臓への遺伝子デリバリーに関する研究も行った。CpG 配列を全く持たない骨格の plasmid にマウスおよびヒト IFN- γ cDNA を組み込んだプラスミド

DNA (pDNA) ベクターを設計し、長期持続型 IFN- γ 発現ベクターを開発した(高倉班員). この長期持続型 IFN- γ 発現ベクターを HCV 感染マウスに hydrodynamic injection 法を用いて投与することにより、IFN- γ の遺伝子導入が可能であり、さらにはマウス血中 HCV が投与 1 週後に陰性化し、その効果が長期間持続することを確認した(高倉, 今村班員). これまでに “*in vivo* affinity binding and cross-linking 法” を利用し、ヒト肝細胞キメラマウスに Pre-S 抗原を持つ HBV 模擬 particle および 2 価の架橋剤を注入することにより、マウスから肝臓を分離し粗膜画分を得て、Pre-S 抗原に対する抗体を用いた免疫沈降物を電気泳動し、Pre-S 抗原と結合するタンパク質として分子量約 80 KDa の glucose-regulated protein 78/Immunoglobulin Binding Protein (GRP78/BiP) を同定した. さらに逆の組み合わせ、すなわち、GRP78/BiP に対する抗体を用いた免疫沈降により Pre-S 抗原が回収されることが確認された. この結果は、GRP78/BiP が、Pre-S 抗原タンパク質と相互作用する可能性が極めて高いことを示すものである(吉里班員).

②培養細胞を用いた新規治療薬標的分子の探索と効果実証システムの構築：組換え体

JFH-1 を用いての感染性粒子を産生する細胞において、HCV 粒子が脂肪滴からどのような経路で細胞外に輸送されるかについて種々の阻害剤を用いて検討し、ゴルジ体を介するタンパク質輸送を阻害するブレフェルジン A がその輸送に阻害的に働くことを見いだした. さらに、独自に樹立した不死化肝細胞を中空系によって立体的に培養することで種々の患者血清由来の HCV の生活環を再現する細胞

培養系を開発した(土方班員). さらに HCV およびレプリコン細胞を用いて HCV と宿主細胞との相互作用の網羅的な解析を行い、HCV の感染性粒子中に存在するコアタンパク質がジスルフィド結合によって二量体を形成していること、この二量体はコアタンパク質がプロセッシングによって産生される小胞体画分において既に形成されていることが明らかにした. さらにこのジスルフィド結合はコアタンパク質の 128 番目のシステイン残基一つで形成されており、この 128 番目のシステインをアラニンに変異させたコアタンパク質は野性型の組換え体 HCV の感染粒子産生を抑制することを見いだした. このジスルフィド結合そしてそれに関わる細胞因子を制御することですべての HCV 株の粒子形成を抑制することが可能になり、その増殖を制御する新たな抗 HCV 薬開発の標的になり得ると思われる(土方班員). IFN の転写因子である IRF3 および IRF7 の dominant-active 変異体(MR3)をレプリコン細胞や JFH1 株の感染細胞に導入するとウイルスゲノムの複製が抑制されることを見いだした. また、HCV のプロテアーゼ認識配列と小胞体残留シグナル配列を付加したキメラコンストラクトは、HCV プロテアーゼの発現により活性化され、感染細胞のみ IFN を誘導できることを示した. さらに、HCV の複製に対して、抑制因子として機能する VAP-C においても、本システムの応用が可能である事を見いだした(松浦班員).

③治療抵抗性に関与するウイルス因子の探索とその対策：多数例の genotype 1b の HCV 全翻訳領域を解析することにより、Peg-IFN/ribavirin 併用療法(PEG-IFN/RBV)

の治療効果と関連するウイルス領域として、これまで見いだした Core 領域 70 番目および NS5A 領域の ISDR の他、NS5A 領域の IFN/RBV resistance-determining region (IRRDR) のアミノ酸変異が、治療効果に強く関連することを見いだした。また genotype 2a 患者においても Core 領域のアミノ酸変異が治療効果と強く関連することを見いだした(前川班員)。さらには Core 領域の 70 番のアミノ酸変異が、肝癌の発癌に関与を示し、さらにこの変異は宿主の IL28B 遺伝子型と強く関連していることを見いだした(前川班員)。また生体肝移植後のドナーおよびレシピエントの IL28B 遺伝子型がレシピエントの HCV 再感染に対する IFN 療法の治療効果と関連していることを見いだした(松浦班員)。すなわち、ドナーおよびレシピエントの rs8099917 が TT である症例では有意に SVR 達成率が高いものであり、さらに HCV の Core および ISDR 変異を組み合わせることにより、より詳細な治療効果予測が可能であった。ヒト肝細胞キメラマウスを用いて以下にあげる 4 種類の HCV に対する新規治療法を開発した。1. ソヤサボゲノール B 誘導体が IFN- α の抗 HCV 効果を増強させることを見いだした(今村班員)。IFN- α 難治性患者に対して、副作用の少ないソヤサボゲノール B 誘導体の併用療法の有効性が期待される結果である。2. HIV の entry 阻害剤である、Phosphorothioate oligonucleotide (PS-ON) が HCV 感染の阻害にも有用であることを見いだした(今村班員)。3. プロテアーゼ阻害剤やポリメラーゼ阻害剤などの異なる HCV 蛋白を標的とする薬剤を併用することによ

り、IFN 製剤を使用せずとも HCV の排除が可能であることを見いだした(今村班員)。この治療法は、今後、C 型慢性肝炎に対する中心的治療法となる可能性がある。4. IL2 で刺激したヒト活性化 NK/NKT 細胞を投与することにより、IFN- γ を介してマウス血中 HCV RNA を消失させることに成功した(大段班員)。HCV が E2 蛋白/CD81 結合によって自然免疫応答を巧妙に回避し持続感染に移行する機構を断ち切る活性化 NK/NKT 細胞移入療法が、HCV 肝炎の再発予防・根治療法となりうることを示すものであると思われる。

D. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて HBV および HCV のリバーシジェネティックスの系を構築した。リバーシジェネティックス法により種々の変異ウイルスを血中に有するマウスの作製が可能であり、生体内における肝炎ウイルスの分子生物学的な検討が可能であり、特に薬物耐性の研究には重要な価値を有すると考えられる。ヒト肝細胞キメラマウスの系、肝炎ウイルス培養細胞系および肝炎ウイルス感染患者の臨床検体を用いて、新規治療薬標的分子の探索、各種耐性ウイルスに対する治療薬の効果判定、新規治療法の開発が可能であった。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 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;89:2108-13.
2. Mori N, Imamura M, Kawakami Y, Saneto H, Kawaoka T, Takaki S, Aikata H, Takahashi S, Chayama K. A randomized trial of high-dose interferon-a-2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 81:640-9,2009
3. 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 Infect Dis* 199:1599-607,2009
4. 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. *Hepatology* 23,1159-68,2009
5. 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* 119:3226-35,2009
6. 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* 137:673-81,2009
7. 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* 51:1046-54,2009
8. Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R, Tanaka S, Matsushita M, Mitsui F, Abe H, Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Mori N, Imamura M, Takahashi S, Hayes CN, Chayama K. HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2010;91:1854-64.
9. Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Practical Evaluation of a Mouse with Chimeric Human Liver Model for Hepatitis C Virus Infection Using an NS3-4A Protease Inhibitor. *J Gen Virol* 2010;91:1668-7
10. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology* 2010;405:361-9.
11. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010;407:80-90
12. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of Hepatitis C Virus by Short Term NS3-4A and NS5B Inhibitor Combination Therapy in Human Hepatocyte Chimeric Mice. *J Hepatol*, in press
13. Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol*, in press
14. Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M. Animal model for study of human hepatitis viruses. *J Gastroenterol Hepatol*.26:13-18,2011.
15. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic Potential of Propagated Hepatocyte Transplantation in Liver Failure. *J Surg Res*. 2011.
16. Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, Yoshizato K. Growth Hormone-Dependent Pathogenesis of Human Hepatic Steatosis in a Novel Mouse Model Bearing a Human Hepatocyte-Repopulated Liver. *Endocrinology* 2011.
17. Nishi H, Inagi R, Kawada N, Yoshizato K, Mimura I, Fujita T, Nangaku M. Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. *Am J Pathol*. 2011;178:128-39.

18. Yamasaki C, Kataoka M, Kato Y, Kakuni M, Usuda S, Ohzone Y, Matsuda S, Adachi Y, Ninomiya S, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K, Tateno C. In vitro evaluation of cytochrome p450 and glucuronidation activities in hepatocytes isolated from liver-humanized mice. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2011;25(6):539-50.
19. Utoh R, Tateno C, Kataoka M, Tachibana A, Masumoto N, Yamasaki C, Shimada T, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K. Hepatic hyperplasia associated with discordant xenogeneic parenchymal -nonparenchymal interactions in human hepatocyte-repopulated mice. *Am J Pathol*. 2010;177 (2): 654-665.
20. Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, Kawada N. A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. *Am J Pathol*. 2010;177(1):153-165.
21. Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. *J Gen Virol* 2010;91:1668-77.
22. 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*. 2010;391:316-321.
23. Kubo S, Kataoka M, Tateno C, Yoshizato K, Kawasaki Y, Kimura T, Faure-Kumar I E, Palmer DJ, Ng P, Okamura H, Kasahara N. In Vivo Stable Transduction of Humanized Liver Tissue in Chimeric Mice via High-capacity Adenovirus-Lentivirus Hybrid Vector. *Hum Gene Ther*. 2010, 21: 40-50.
24. Yoshizato K, Tateno C. A human hepatocyte-bearing mouse: An animal model to predict drug metabolism and effectiveness in humans. *PPAR Research*. 2009, 2009:1-11
25. Nishie M, Tateno C, Utoh R, Kohashi T, Masumoto N, Kobayashi N, Itamoto T, Tanaka N, Asahara T, Yoshizato K. Hepatocytes from fibrotic liver possess high growth potential in vivo. *Cell Transplant*. 2009, 18 (5): 665-675.
26. Yoshizato K, Tateno C. In vivo modeling of human liver for pharmacological study using humanized mouse. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2009, 5(11):1435-1446.
27. Uno S, Endo K, Ishida Y, Tateno C, Makishima M, Yoshizato K, Nebert DW. CYP1A1 and CYP1A2 expression: comparing 'humanized' mouse lines and wild-type mice; comparing human and mouse hepatoma-derived cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009, 15; 237 (1): 119-126.
28. Zion O, Genin O, Kawada N, Yoshizato K, Roffe S, Nagler A, Iovanna JL, Halevy O, Pines M. Inhibition of transforming growth factor beta signaling by halofuginone as a modality for pancreas fibrosis prevention. *Pancreas*. 2009, 38 (4): 427-435.
29. Igarashi Y, Tateno C, Tanaka Y, Tachibana A, Utoh R, Kataoka M, Ohdan H, Asahara T, Yoshizato K. Engraftment of human hepatocytes in the livers of rats bearing bone marrow reconstructed with immunodeficient mouse bone marrow cells. *Xenotransplantation* 2008;15:235-45.
30. Lin YC, Goto S, Tateno C, Nakano T, Cheng YF, Jawan B, Kao YH, Hsu LW, Lai CY, Yoshizato K, Chen CL. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in livers following hepatectomy prolongs survival of allogeneic hepatocytes after transplantation. *Transplant Proc* 2008;40:2706-8.
31. Sato Y, Yamada H, Iwasaki K, Tateno C, Yokoi T, Yoshizato K, Horii I. Human hepatocytes can repopulate mouse liver: histopathology of the liver in human hepatocyte-transplanted chimeric mice and toxicologic responses to acetaminophen. *Toxicol Pathol*. 2008;36:581-91
32. Park TJ, Jeong BR, Tateno C, Kim HS, Ogawa T, Lim IK, Yoshizato K. Pleiotrophin inhibits transforming growth factor beta1-induced apoptosis in hepatoma cell lines. *Mol Carcinog*. 2008;47:784-96.
33. Motoi, N., Suzuki, K., Hirota, R., Johnson, P., Oofusa, K., Kikuchi, Y., and Yoshizato, K. Identification and characterization of nucleoplasmin 3 as a histone-binding protein in embryonic stem cells. *Devel. Growth & Differ*. 2008;50:307-320
34. Tatsumi K, Ohashi K, Kataoka M, Tateno C, Shibata M, Naka H, Shima M, Hisanaga M, Kanehiro H, Okano T, Yoshizato K, Nakajima Y, Yoshioka A. Successful in vivo propagation of factor I X-producing hepatocytes in mice: potential for cell-based therapy in haemophilia B. *Thromb Haemost*. 2008;99:883-91.
35. Emoto C, Yamato Y, Sato Y, Ohshita H, Katoh M, Tateno C, Yokoi T, Yoshizato K, Iwasaki K. Non-invasive method to detect induction of CYP3A4 in chimeric mice with a humanized liver. *Xenobiotica*. 2008;38:239-48.
36. Katoh M, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. Chimeric mice with humanized liver. *Toxicology*. 2008;246:9-17.
37. Utoh R, Tateno C, Yamasaki C, Hiraga N, Kataoka M, Shimada T, Chayama K, Yoshizato K. Susceptibility of chimeric mice with livers repopulated by serially subcultured human hepatocytes to hepatitis B

virus. *Hepatology* 2008;47:435-46.

38. Lin YC, Chen CL, Nakano T, Goto S, Kao YH, Hsu LW, Lai CY, Jawan B, Cheng YF, Tateno C, Yoshizato K. Immunological role of indoleamine 2,3-dioxygenase in rat liver allograft rejection and tolerance. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:e243-50

39. Sunagozaka H, Honda M, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2011 In press

40. Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, Honda M, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y, Takakura N, Kaneko S. A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab*. 2010 Nov 3;12(5):483-95.

41. Honda M, Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2010 Nov;53(5):817-26.

42. Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Sep 10;400(1):7-15.

43. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2010 Aug;139(2):499-509.

44. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis*. 2010 Jul 1;202(1):75-85.

45. Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res*. 2010 Jun 1;70(11):4687-97.

46. Hodo Y, Hashimoto SI, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics*. 2010 Apr 95(4):217-23.

47. Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S. dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2010 Mar 30(3):438-46

48. Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S. CD14+monocytes are vulnerable and functionally impaired under ER stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2010 Mar 59(3):634-43

49. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2009;49(4):1098-112

50. Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009 ;136(3):1012-24

51. Yamashita T, Honda M, Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2009;50:100-10

52. Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Teramoto R, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Ueda T, Kamijo K, Kaneko S. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(1):186-92.

53. Zang L, Nishikawa M, Machida K, Ando M, Takahashi Y, Watanabe Y, and Takakura Y. Inhibition of nuclear delivery of plasmid DNA and transcription by interferon γ : hurdles to be overcome for sustained gene therapy. *Gene Ther*. 2011, in press.

54. Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. Prolonged circulation half-life of interferon γ activity by gene delivery of interferon γ -serum albumin fusion protein in mice. *J Pharm Sci*. 2011, in press.

55. Takiguchi N, Takahashi Y, Nishikawa M, Matsui Y, Fukuhara Y, Oushiki D, Kiyose K, Hanaoka K, Nagano T, Takakura Y. Positive correlation between the generation of reactive oxygen species and activation/reactivation of transgene expression after hydrodynamic injection into mice. *Pharm Res*. 2011, in press.
56. Takahashi Y, Vikman E, Nishikawa M, Ando M, Watanabe Y, Takakura Y. Persistent interferon transgene expression by RNA interference-mediated silencing of interferon receptors. *J Gene Med*; 12(9), 739-746 (2010)
57. Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y. Sustained exogenous expression of therapeutic levels of IFN-gamma ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. *J Immunol*; 184(5), 2729-2735 (2010)
58. Yamaoka A, Guan X, Takemoto S, Nishikawa M, Takakura Y. Development of a novel Hsp70-based DNA vaccine as a multifunctional antigen delivery system. *J Control Release*; 142(3), 411-415 (2010).
59. Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Nonviral vector-mediated RNA interference: its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61:760-6. (2009)
60. 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 the sustainability of transgene expression. *J Gene Med* 11,435-443 (2009)
61. 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. *Hum Gene Ther.*, 19(10), 1009-1020 (2008)
62. Takahashi Y, Yamaoka K, Nishikawa M, Takakura Y. Quantitative and temporal analysis of gene silencing in tumor cells induced by small interfering RNA or short hairpin RNA expressed from plasmid vectors. *J Pharm Sci.*, 98, 74-80 (2009)
63. Takahashi Y, Kaneda H, Takasuka N, Hattori K, Nishikawa M, Watanabe Y, Takakura Y. Enhancement of antiproliferative activity of interferons by RNA interference-mediated silencing of SOCS gene expression in tumor cells. *Cancer Sci*. 2008;99(8):1650-5. (2008)
64. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).
65. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus particles. Masaki T., Suzuki R., Murakami K., Aizaki H., Ishii K., Murayama A., Date T., Matsuura Y., Miyamura T., Wakita T., and Suzuki T. *J. Virol.*, 82, 7964-7976 (2008).
66. A critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. 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. *J. Virol.*, 82, 5715-5724 (2008).
67. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 3480-3489 (2008).
68. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Taguwa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).
69. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. 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. *J. Gen. Virol.*, 89, 2108-2113 (2008).
70. Co-chaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. Taguwa S., Kambara H., Omori H., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 10427-10436 (2009).
71. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. Kukihara H., Moriishi K., Taguwa S., Tani H., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Fukuhara T., Taketomi A., Maehara Y., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83, 7959-7969 (2009).
72. Baculovirus induces type I IFN production through TLR-dependent and -independent pathways in a cell type-specific manner. Abe T., Kaname Y., Wen X., Tani H., Moriishi K., Uematsu S., Takeuchi O., Ishii K.J., Kawai T., Akira S., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 83,

7629-7640 (2009).

73. Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. Moriya K., Miyoshi H., Tsutsumi T., Shinzawa S., Fujie H., Shintani Y., Yotsuyanagi H., Moriishi K., Matsuura Y., Suzuki T., Miyamura T., Koike K. *Am. J. Pathol.* 175, 1515-1524 (2009).
74. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. 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. *J. Virol.*, 83, 5137-5147 (2009).
75. 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. Suzuki R., Moriishi K., Fukuda K., Shirakura M., Ishii K., Shoji I., Wakita T., Miyamura T., Matsuura Y., and Suzuki T. *J. Virol.*, 83, 2389-2392 (2009).
76. Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. Mori K., Amano M., Takefuji M., Kato K., Morita Y., Nishioka T., Matsuura Y., Murohara T., Kaibuchi K. *J. Biol. Chem.*, 284, 5067-5076 (2009).
77. Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. Noritake J., Fukata Y., Iwanaga T., Hosomi N., Tsutsumi R., Matsuda N., Tani H., Iwanari H., Mochizuki Y., Kodama T., Matsuura Y., Brecht D.S., Hamakubo T., Fukata M. *J. Cell Biol.*, 186, 147-160 (2009).
78. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and Matsuura Y. Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 2010; 52, 411-420.
79. Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and Matsuura Y. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J. Virol.*, 2010; 84, 2798-2807.
80. Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori KI, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y., Wakita T, and Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. *J. Virol.*, 2010; 84, 5824-5835.
81. Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y., and Maehara Y. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology*, 2010; 39,1577-1585.
82. Ito M, Masumi A, Mochida K, Kukihara H, Moriishi K, Matsuura Y., Yamaguchi K, and Mizuochi T. Peripheral B Cells May Serve as a Reservoir for Persistent Hepatitis C Virus Infection. *J. Innate Immun.*, 2010; 2, 607-617.
83. Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, Moriishi K, Mori Y, Matsuura Y., and Mizuguchi K. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions. *Mol. Biosyst.*, 2010; 6, 2539-2553.
84. H. Tashiro, H. Aikata, K. Waki, H. Amano, A. Oshita, T. Kobayashi, Y. Tanimoto, S. Kuroda, H. Tazawa, K. Chayama, T. Asahara, H. Ohdan: Treatment strategy for early hepatocellular carcinomas: Comparison of radiofrequency ablation with or without transcatheter arterial chemoembolization and surgical resection. *J. Surg. Oncol.* 2011, in press
85. M. Doskali, Y. Tanaka, M. Ohira, K. Ishiyama, H. Tashiro, K. Chayama, H. Ohdan: Possibility of Adoptive Immunotherapy With Peripheral Blood-derived CD3-CD56+ and CD3+CD56+ Cells for Inducing Antihepatocellular Carcinoma and Antihepatitis C Virus Activity. *J Immunother.* 2011, 34(2):129-138
86. H. Amano, H. Hino, C. Tateno, K. Emoto, Y. Imaoka, C. Yamasaki, T. Itamoto, H. Tashiro, T. Asahara, H. Ohdan, K. Yoshizato : Therapeutic Potential of Propagated Hepatocyte Transplantation in Liver Failure. *J Surg Res.* 2011, in press
87. Y. Ushitora, H. Tashiro, S. Takahashi, H. Amano, A. Oshita, T. Kobayashi, K. Chayama, H. Ohdan: Splenectomy in Chronic Hepatic Disorders: Portal Vein Thrombosis and Improvement of Liver Function. *Dig Surg.* 2011, 4;28(1):9-14
88. NB. Basnet, K. Ide, H. Tahara, Y. Tanaka, H. Ohdan: Deficiency of N-glycolylneuraminic acid and Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc epitopes in xenogeneic cells attenuates cytotoxicity of human natural antibodies. *Xenotransplantation.* 2010, 17(6):440-448
89. H. Tahara, K. Ide, N. Basnet, Y. Tanaka, H. Ohdan: Determination of the precursor frequency and the reaction intensity of xenoreactive human T lymphocytes. *Xenotransplantation.* 2010, 17(3):188-196
90. T. Kawaoka, N. Hiraga, S. Takahashi, S. Takaki, F. Mitsui, M. Tsuge, Y. Nagaoki, Y. Kimura, Y. Hashimoto, Y. Katamura, A. Hiramatsu, K. Waki, M. Imamura, Y. Kawakami, H. Aikata, H. Tashiro, H. Ohdan, K. Chayama: Prolongation of interferon therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation: analysis of predictive factors of sustained virological response, including amino

- acid sequence of the core and NS5A regions of hepatitis C virus. *Scand J Gastroenterol*, 2010, 45(12):1488-1496
91. Yukihiro Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J. Virol.*, 84(18), 9118-9127, 201
92. Hussein H Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379: 330-334, 2009.
93. Hussein H. Aly, Yue Qi, Kimie Atsuzawa, Nobuteru Usuda, Yasutsugu Takada, Yasuhito Tanaka, Masashi Mizogami. Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Strain-dependent viral dynamics and virus cell interactions observed in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood borne HCV. *Hepatology*, 50(3), 689-696, 2009
94. Takayuki Murata, Yoshitaka Sato, Sanae Nakayama, Ayumi Kudoh, Satoko Iwahori, Hiroki Isomura, Masako Tajima, Takayuki Hishiki, Takayuki Ohshima, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno, and Tatsuya Tsurumi: TORC 2, a coactivator of CREB, promotes Epstein-Barr virus reactivation from latency through interaction with viral BZLF1 protein. *J. Biol. Chem.* 284, 8033-8041, 2009
95. Kazuo Sugiyama, Kenji Suzuki, Takahide Nakazawa, , Kenji Funami, Takayuki Hishiki, Kazuya Ogawa, Satoru Saito, Kumiko W. Shimotohno, Takeshi Suzuki, Yuko Shimizu, Seiri Tobita, Makoto Hijikata, Hiroshi Takaku, Kunitada Shimotohno: Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. *J. Virol.*, 83(13), 6922-6928, 2009.
96. Kaku Goto, Koichi Watashi, Daisuke Inoue, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno: Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Science*, 100 (10), 1943-1950, 2009.
97. 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. *Hepato Res.* 2008 Jul 20.
98. 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. *Hepato Res.* 2008 Sep;38(9):909-18.
99. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008 Feb 1;197(3):361-70.
100. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Satoh K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Cheng-Hsin C, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Sep;23(9):1437-47
101. Enomoto N, Maekawa S. HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. *Intervirology.* 2010;53(1):66-9.
102. Maekawa S, Enomoto N. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2009;44(10):1009-15.
103. 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.* 2010 Jan;99(1):70-8.
104. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol.* 2010 Sep 19.
105. Kadokura M, Maekawa S, Ryota Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the Complete Open Reading Frame of Hepatitis C Virus in Genotype 2a Infection Reveals Critical Sites Influencing the Response to Peginterferon and Ribavirin Therapy. *Hepato Int.* 2011, in press.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

(1) 大段秀樹, 伊禮俊充

抗体拒絶反応抑制剤(特願 2009-110887)

(2)プロスタグランジンI2のアゴニストを含む、C型肝炎ウイルスの感染抑制剤」

発明者 土方 誠、阿部雄一、脇田隆宇、
出願日 2010年9月30日、出願番号 特願
2010-222045

(3)「C型肝炎ウイルスの感染増殖性の評価方法、およびその利用」

発明者／出願者：山口達哉、土方誠、アリ
ハッサン フセイン

2008年6月26日出願 出願番号 特願
2008-167943

(4)「感染性C型肝炎ウイルス粒子の製造方法、およびその利用」

発明者／出願者：山口達哉、土方誠、アリ
ハッサン フセイン

2008年6月26日出願 出願番号 特願
2008-167942

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

(資 料)

分担研究報告

厚生労働省科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

（分担）研究報告書（平成 20～22 年度）

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

肝炎ウイルスに *in vivo* で相互作用するタンパク質の解析

－薬剤感受性の分子的機構解明のためのアプローチ－

研究分担者 吉里勝利 株式会社フェニックスバイオ 学術顧問

研究要旨：肝炎ウイルス治療を目的としたウイルスの薬剤感受性の分子機構解明のために、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた *in vivo* cross-linking 法を開発し、HBV パーティクルと相互作用する GRP78 を同定した。これと逆の操作においても、*in vivo* では GRP78 抗体を用いた免疫沈降によって Pre-S1 抗原が回収されたことから、GRP78 が Pre-S1 抗原タンパク質と相互作用する可能性が極めて高いことが確認された。*in vitro* で実施した同様の操作では、当初と同じ操作、逆の操作のいずれからも相互作用の存在を示す結果は得られず、PreS1 と GRP78 の相互作用は、*in vivo* でのみ生じており、*in vitro* では生じていない可能性が強く示唆された。HBV 感染並びに HCV 感染キメラマウスにおける human GRP78 mRNA 発現レベルは、HBV 感染後 5 週では非感染対照個体の約 75% に、HBV 感染後 9 週間においては非感染対照個体の約 30% に低下した。

A. 研究目的

肝炎ウイルスに対する有効な感染予防法と感染者に対する効果的な治療法の開発は大きな社会的課題となっている。同ウイルスは特異的に肝細胞に感染し増殖し肝臓に障害を引き起こす。この過程で、ウイルスと宿主細胞は様々な生物学的相互作用を行なっているが、この相互作用は、通常、相互作用に関与する蛋白質間に結合が成立することで可能になる。肝炎ウイルスと肝細胞の相互作用を正確に再現できる *in vitro* の実験系（培養肝細胞実験系）は開発されておらず、ヒト体内における肝炎ウイルスと肝細胞の相互作用を再現できるモデル動物が期待されていた。私達は、ヒト肝細胞で高率に置換された肝臓をもつマウス（以下、キメラマウス）の作成に成功した。このキメラマウスにはヒト肝炎ウイルスが感染し増幅することができるので、このマウスは同ウイルスの感染研究のモデル動物として有用であること

を示した。

これらの成果に基づき、本研究においては、生体内におけるタンパク質相互作用解析技法である *in vivo* affinity-binding and cross-linking 法の開発と、この新技法とプロテオーム技術を利用した、ウイルスタンパク質と結合能のあるヒト肝細胞表塩タンパク質の候補を選抜し、その生物学的役割、特に肝炎ウイルス感染キメラ個体の肝臓における発現変動の解析を目指した。

B. 研究方法

in vivo において、ウイルス Pre-S 抗原と結合する肝細胞膜蛋白を網羅的に釣り上げる方法として、アミノ基を標的とした 2 価の架橋剤を利用する *in vivo* cross-linking 法を開発し、クロスリンクさせた複合体の中から肝炎ウイルス pre-S 抗原に対する抗体で沈殿する蛋白質を分析した。その結果、GRP78 分子が上記性質を有する蛋白質として同定された。また、ヒトマウ

ス間における GRP78 アミノ酸配列の相同性は高いが、質量分析計によるタンパク質同定操作から、この GRP78 タンパク質はヒト型配列に特異的なアミノ酸配列を有しており、キメラマウス肝内のヒト肝細胞に由来することが強く示唆された。この蛋白質は分子シャペロンタンパク質ファミリーに属しており、主として小胞体ストレスに関わる多機能性分子である。また、ウイルス感染、炎症、酸素分圧変動などのストレスにより発現が亢進することを示した研究も報告されている。

GRP78 とウイルス表面抗原との相互作用を追認するために、*in vitro* において、HBV 感染キメラマウス肝臓ホモジネートにクロスリンカー処理を行って作成した複合体から、GRP78 抗体を用いて免疫沈降されるタンパク質の解析を行った。また、同複合体中から、PreS1 抗体を用いて得られた免疫沈降物について同様の解析を行った。

つづいて、肝炎ウイルス感染と GRP78 発現レベルの関係を明らかにする目的で、HBV 感染並びに HCV 感染キメラマウスにおける GRP78 mRNA 発現レベルの変動を調べた。これらの感染動物から肝臓を採取した mRNA を逆転写して得た cDNA を鋳型として、GRP78 特異的プライマーを用いた real-time 定量 PCR によって mRNA 発現レベルの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト肝細胞キメラマウス及び樹立株化細胞を用いて、タンパク質の解析を実施した。ヒト肝臓組織およびキメラマウスに移植するヒト肝細胞は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)に基づく手続きを経て入手したもの、あるいは海外

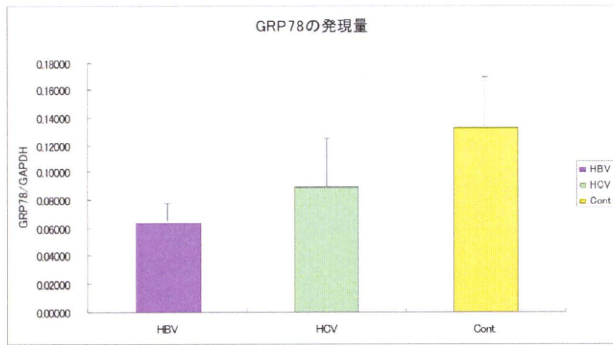
から正式な手続きをもって購入した凍結ヒト肝細胞を用いた。

動物実験においては、動物愛護ならびに福祉の観点から、必要最低限の供試動物を使用し、実験動物の生理、生態や習性等を理解し、動物に苦痛を与えないように最大限の配慮をした。

C. 結果

in vivo affinity-binding and cross-linking 法とプロテオーム技術を利用して、HBV と結合能のある候補肝細胞膜蛋白として GRP78/BiP を同定することが出来た。この候補蛋白が HBV に結合する蛋白であることを直接的に示すために、無細胞結合アッセイを行なった。さらに、肝炎ウイルス感染における GRP78/BiP の生物学的役割を推定する研究の一環として、肝炎ウイルス感染キメラ個体の肝臓における GRP78 の発現変動の解析を行った。

無細胞結合アッセイでは、HBV 感染キメラマウス肝臓ホモジネートにクロスリンカー処理を行って作製した複合体から、GRP78 抗体を用いて免疫沈降されるタンパク質の解析を行った。その結果、得られた沈殿物中には、PreS1 に対する抗体に反応するタンパク質は存在せず、また、SDS-PAGE 及び質量分析計によるタンパク質同定作業においても PreS1 と考えられるタンパク質を得ることが出来なかった。また、同複合体中から、PreS1 抗体を用いて得られた免疫沈降物について同様の解析を行ったが GRP78 は得られなかった。これらのことから、PreS1 と GRP78 の相互作用は、*in vivo* でのみ生じており、*in vitro* では再現されないことが強く示唆された。



HBV 感染並びに HCV 感染キメラマウスにおける GRP78 mRNA 発現レベルは、HBV 感染後 5 週では非感染対照個体の約 75% に、HBV 感染後 9 週間においては非感染対照個体の約 30% に低下した。

D. 考察

GRP78 は 1977 年に Pastan の研究グループによって、Rous sarcoma virus によって形質転換した鶏胚の線維芽細胞をグルコース欠如培養液で培養した時誘導される膜蛋白として最初に報告された (Robert P et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977; 74: 3840-3844). 最近、本蛋白が肝炎ウイルス感染機構に関与してことを示す研究がいくつか報告されている。Lin らは HBV 関連の肝細胞癌で GRP78 の発現が亢進していることを示した (Lin S.O. et al., World J. Gastroenterol. 2005; 11: 2072-2079)。Ma らは、HBV 反応性の培養細胞を用いて、この細胞が HBV に感染すると GRP78 蛋白量が増大することを見出した (Ma Y et al., Mol & Cell Proteomics 2009; 8: 2582-2594)。彼らはさらに、この蛋白の発現抑制及び促進実験を行い、GRP78 が HBV の感染を抑制する可能性が高いことを示唆した。

私達は、本研究においてこれらの先行研究とは独立に、また、方法論的にも異なるアプローチで肝炎ウイルス感染機構に GRP78 が関与している可能性を示した。本研究の特徴

は、Ma らの研究と異なり、生体の状態をより忠実に反映していると考えられているキメラマウスを利用して GRP78 の関与を示したことである。

in vivo cross-linking 後に、Pre-S 抗体によって免疫沈降することを指標として得られた候補タンパク質は、当初とは逆の組み合わせ、すなわち、該候補タンパク質に対する抗体を用いた免疫沈降により Pre-S 抗原が回収されることが確認されたことにより、該候補タンパク質は、Pre-S 抗原タンパク質と相互作用する可能性が極めて高いことが確認された。しかし、一方では、ホモジネートを用いて *in vitro* で実施した同様の操作では、当初の操作、逆の操作のいずれからも相互作用の存在を示す結果は得られなかった。

また、HBV 感染並びに HCV 感染キメラマウスにおける GRP78 mRNA 発現レベルは肝炎ウイルス感染後 5-9 週という期間においては有意に低下することが明らかとなった (図参照)。

このことはウイルス感染直後 (24 時間など) に GRP78 の mRNA 発現が亢進するとした Ma らの研究とは異なる。私達の文献調査の範囲では、このように *in vivo* で感染後、5-9 週後の GRP78 の発現量変化を調べた報告はなく、本研究が新規かつ唯一の報告である。本研究により、ウイルス感染に対するストレス応答の一環として短期的には増加すると考えられる GRP78 発現量が、その後減少することが明らかとなったことから、慢性的にウイルス感染が持続することによって炎症状態が継続し、ガン化に至る肝炎ウイルス感染症の特徴に GRP78 が関与している可能性が出て来た。

E. 結論

以上の結果より、PreS1 と GRP78

の相互作用は、*in vivo* でのみ生じており、*in vitro* では再現されなかった。このことから、他のタンパク質の介在など、未解明の何らかの機作により、これら2種類のタンパク質の相互作用は細胞膜表面においてのみ成立することが強く示唆され、*in vivo* 感染モデルの優位性を示す実証データの1つとなった。

長期に感染を維持できるモデル実験系が他にないことから、これまで分子シャペロンタンパク質の発現は、肝炎ウイルス感染後短期的には増加すると言う報告がなされているのみであり、HBV, HCV 感染後5週以降においてストレス応答性の分子シャペロンファミリー-タンパク質の発現が減少することの生物学的意味は不明であり、今後の研究が必要である。一般的には、ウイルスとの長期接触は、宿主(肝細胞)の生物学的病理学的性質に変化を齎すものと考えられ、この変化は、何らかの経路で肝臓の繊維化、あるいは肝細胞のガン化と関係している可能性もある。この実験結果は、今後の研究成果次第では、ヒト肝細胞キメラマウスの*in vivo* ウイルス感染系としての有用性を示すことになると考えている。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic Potential of Propagated Hepatocyte Transplantation in Liver Failure. *J Surg Res*. 2011 Jan 7.
2. Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T,

- Miya F, Tsunoda T, Yoshizato K. Growth Hormone-Dependent Pathogenesis of Human Hepatic Steatosis in a Novel Mouse Model Bearing a Human Hepatocyte-Repopulated Liver. *Endocrinology*. 2011 Feb 8.
3. Nishi H, Inagi R, Kawada N, Yoshizato K, Mimura I, Fujita T, Nangaku M. Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. *Am J Pathol*. 2011 Jan;178(1):128-39.
4. Yamasaki C, Kataoka M, Kato Y, Kakuni M, Usuda S, Ohzone Y, Matsuda S, Adachi Y, Ninomiya S, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K, Tateno C. In vitro evaluation of cytochrome p450 and glucuronidation activities in hepatocytes isolated from liver-humanized mice. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2011 Jan 14;25(6):539-50.
5. Utoh R, Tateno C, Kataoka M, Tachibana A, Masumoto N, Yamasaki C, Shimada T, Itamoto T, Asahara T, Yoshizato K. Hepatic hyperplasia associated with discordant xenogeneic parenchymal-nonparenchymal interactions in human hepatocyte-repopulated mice. *Am J Pathol*. 2010 Aug; 177 (2): 654-665.
6. Ogawa T, Fujii H, Yoshizato K, Kawada N. A human-type nonalcoholic steatohepatitis model with advanced fibrosis in rabbits. *Am J Pathol*. 2010 Jul; 177 (1): 153-165.
7. Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. *J Gen Virol*. 2010 Jul; 91(Pt 7): 1668-1677.
8. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N.