

- (15) SEARCH Collaborative Group, Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, Gut I, Lathrop M, Collins R. SLC01B1 variants and statin-induced myopathy—a genomewide study. *N Engl J Med* 359: 789–799, 2008
- (16) Nakanishi H, Yamada R, Gotoh N, Hayashi H, Otani A, Tsujikawa A, Yamashiro, K, Shimada N, Ohno-Matsui K, Mochizuki M, Saito M, Saito K, Iida T, Matsuda F, Yoshimura N. Absence of Association between COL1A1 Polymorphisms and High Myopia in the Japanese Population. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 50: 544–550, 2008
- (17) Poupon R, Ping C, Chrétien Y, Corpechot C, Chazouillères O, Simon T, Heath SC, Matsuda F, Poupon RE, Housset C, Barbu V. Genetic factors of susceptibility and of severity in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 49: 1038–1045, 2008
- (18) McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, Boffetta P, Chabrier A, Byrnes G, Zaridze, D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, McLaughlin J, Shepherd F, Montpetit, A, Narod S, Krokan HE, Skorpén F, Elvestad MB, Vatten L, Njølstad I, Axelsson T, Chen C, Goodman G, Barnett M, Loomis MM, Lubinski J, Matyjasik J, Lener M, Oszutowska D, Field J, Liloglou T, Xinarianos G, Cassidy A.; EPIC Study, Vineis P, Clavel-Chapelon F, Palli D, Tumino R, Krogh V, Panico S, González CA, Ramón Quirós J, Martínez C, Navarro C, Ardanaz E, Larrañaga N, Kham KT, Key T, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Trichopoulou A, Linseisen J, Boeing H, Hallmans G, Overvad K, Tjønneland A, Kumle M, Riboli E, Zelenika D, Boland A, Delepine M, Foglio M, Lechner D, Matsuda F, Blanche H, Gut I, Heath S, Lathrop M, Brennan P. Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet* 40: 1404–1406, 2008

研究分担者(安居幸一郎)

- (1) Sumida Y, Yoneda M, Hyogo H, Yamaguchi K, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Suzuki Y, Imai S, Kanemasa K, Fujita K, Chayama K, Yasui K, Saibara T, Kawada N, Fujimoto K, Kohgo Y, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). A simple clinical scoring system using ferritin, fasting insulin, and type IV collagen 7S for predicting steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* (in press)
- (2) Yasui K, Sumida Y, Mori Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Kanemasa K, Matsubara H, Okanoue T, Yoshikawa T. Nonalcoholic steatohepatitis and increased risk of chronic kidney disease. *Metabolism* (in press)
- (3) Park H, Shima T, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. Efficacy of long-term ezetimibe

- therapy in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* (in press)
- (4) Sumida Y, Yonei Y, Kanemasa K, Hara T, Inada Y, Sakai K, Imai S, Hibino S, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Yasui K, Minami M, Itoh Y, Naito Y, Yoshikawa T, Okanoue T. Lower circulating levels of dehydroepiandrosterone, independent of insulin resistance, is an important determinant of severity of non-alcoholic steatohepatitis in Japanese patients. *Hepatol Res* 40:901-910, 2010
- (5) Park H, Hasegawa G, Shima T, Fukui M, Nakamura N, Yamaguchi K, Mitsuyoshi H, Minami M, Yasui K, Itoh Y, Yoshikawa T, Kitawaki J, Ohta M, Obayashi H, Okanoue T. The fatty acid composition of plasma cholesteryl esters and estimated desaturase activities in patients with nonalcoholic fatty liver disease and the effect of long-term ezetimibe therapy on these levels. *Clin Chim Acta* 411:1735-1740, 2010
- (6) Tsuji K, Yasui K, Gen Y, Endo M, Dohi O, Zen K, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Taniwaki M, Tanaka S, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. *PEG10* is a probable target for the amplification at 7q21 detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 198:118-125, 2010
- (7) 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* 45:426-434, 2010
- (8) Endo M, Yasui K, Nakajima T, Gen Y, Tsuji K, Dohi O, Zen K, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Taniwaki M, Tanaka S, Arii S, Okanoue T, Yoshikawa T. Infrequent Amplification of *JUN* in Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res* 29:4989-4994, 2009.
- (9) 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* 39:366-373, 2009
- (10) Zen K, Yasui K, Nakajima T, Zen Y, Zen K, Gen Y, Mitsuyoshi H, Minami M, Mitsufuji S, Tanaka S, Itoh Y, Nakanuma 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 regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer* 48:109-120, 2009
- (11) Gen Y, Yasui K, Zen K, Nakajima T, Tsuji K, Endo M, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Tanaka S, Taniwaki M, Arii 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* 275:27-34, 2009

- (12) Yasuda H, Horie R, Zen K, Okuda T, Nishikawa T, Sugiyama Y, Mori K, Sakagami J, Yasui K, Tokita K, Kataoka K, Yoshikawa T. Hepatobiliary sarcoidosis: typical appearance in laparoscopy. *Digestive Endoscopy* 20:162-165, 2008
- (13) 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* 38:886-895, 2008
- (14) 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 amplicon frequently detected in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 180:30-36, 2008

研究分担者 (竹原徹郎)

- (1) Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology* 52: 1310-1321, 2010
- (2) Miyagi T, Takehara T, Uemura A, Nishio K, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Li W, Sasakawa A, Tatsumi T, Ohkawa K, Hayashi N. Lack of invariant natural killer cells elicits liver inflammation and predisposes to liver fibrosis in mice fed with high-fat-diet. *J Gastroenterol* (in press)
- (3) Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Wei Li, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Tadokoro S, Ido A, Tsubouchi H, Hayashi N. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 138: 2487-2498, 2010
- (4) Kohga K, Tatsumi T, Takehara T, Miyagi T, Hayashi N. Expression of CD133 confers malignant potential via inhibiting metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 52: 872-879, 2010.
- (5) Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human

hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 52: 698-704, 2010

- (6) Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ishida H, Miyagi T, Hosui A, Hayashi N. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. *Hepatology* 51: 1264-1273, 2010
- (7) Yamaguchi S, Tatsumi T, Takehara T, Sasakawa A, Yamamoto M, Kohga K, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Akagi T, Akashi M, Hayashi N. EphA2-derived peptide vaccine with amphiphilic poly(γ -glutamic acid) nanoparticles elicits an antitumor effect against mouse liver tumor. *Cancer Immunol Immunother* 59: 759-767, 2010
- (8) Sakamori R, Takehara T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N. STAT3 signaling within hepatocytes is required for anemia of inflammation in vivo. *J Gastroenterol* 45: 244-248, 2010.
- (9) Uemura A, Takehara T, Miyagi T, Suzuki T, Tatsumi T, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Natural killer cell is a major producer of interferon γ that is critical for the IL-12-induced anti-tumor effect in mice. *Cancer Immunol Immunother* 59: 453-463, 2010
- (10) Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hennighausen L, Yin XM, Hayashi N. BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. *Hepatology* 50: 1972-1980, 2009
- (11) Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 69: 8050-8057, 2009
- (12) Sasakawa A, Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Yamamoto M, Ohkawa K, Miyagi T, Hayashi N. Activated liver dendritic cells generates strong acquired immunity in α -galactosylceramide treatment. *J Hepatol* 50: 1155-1162, 2009
- (13) Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol* 43: 811-822, 2008
- (14) Tatsumi T, Takehara T, Yamaguchi S, Sasakawa A, Yamamoto M, Fujita Y, Miyagi T, Ohkawa K, Hayashi N. Decreased expressions of CD1d molecule on liver dendritic cells in

subcutaneous tumor bearing mice. *J Hepatol* 49:779-786, 2008

- (15) Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ohkawa K, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Kasugai T, Katayama K, Kato M, Hayashi N. Serum levels of soluble MHC class I-related chain A in patients with chronic liver diseases and the changes during transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 99 :1643-1649, 2008

分担研究者 (西原利治)

- (1) Yoshioka S, Hamada A, Jobu K, Yokota J, Onogawa M, Kyotani S, Miyamura M, Saibara T, Onishi S, Nishioka Y. Effects of *Eriobotrya Japonica* seed extract on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *J Pharmacy and Pharmacology* 62: 241-246, 2010.
- (2) Toda K, Hayashi Y, Saibara T. Deletion of tumor necrosis factor- α receptor type 1 exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis in aromatase knockout mice. *Biochim Biophys Acta* 2010, 1801: 655-664, 2010
- (3) Hidaka M, Iwasaki S, Matsui T, Kawakita T, Inoue Y, Sakai T, Harada N, Takemoto S, Nagakura S, Kiyokawa T, Takahashi M, Saibara T, Onishi S Kawano F. Efficacy of bezafibrate for chronic GVHD of the liver after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 45: 912-918, 2010
- (4) 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* 59:258-266, 2010
- (5) Yoshioka S, Hamada A, Jobu K, Yokota J, Onogawa M, Kyotani S, Miyamura M, Saibara T, Onishi S, Nishioka Y. Effects of *Eriobotrya Japonica* seed extract on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *J Pharmacy and Pharmacology* 62: 241-246, 2010
- (6) Toda K, Hayashi Y, Saibara T. Deletion of tumor necrosis factor- α receptor type 1 exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis in aromatase knockout mice. *Biochim Biophys Acta* 1801: 655-664, 2010
- (7) Hidaka M, Iwasaki S, Matsui T, Kawakita T, Inoue Y, Sakai T, Harada N, Takemoto S, Nagakura S, Kiyokawa T, Takahashi M, Saibara T, Onishi S Kawano F. Efficacy of bezafibrate for chronic GVHD of the liver after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 45: 912-918, 2010

- (8) 宮本敬子, 岡本宣人, 西原利治: 遺伝的要因. 臨牀栄養 116:594-598, 2010
- (9) 西原利治: 糖尿病からみた肝障害 臨床病理 58:1021-1025, 2010
- (10) Harada N, Soejima Y, Taketomi A, Yoshizumi T, Uchiyama H, Ikegami T, Saibara T, Nishizaki T, Maehara Y. Recurrent familial hypobetalipoproteinemia-induced nonalcoholic fatty liver disease after living donor liver transplantation. Liver Transpl. 15:806-809, 2009
- (11) 大西三朗, 西原利治: NAFLD, NASH の病態と臨床 日本内科学会会誌 98 臨時増刊号:48-53, 2009
- (12) 河田純男, 泉並木, 池田健次, 西原利治: 肝疾患診療の新しい展開 日本医師会雑誌 138:1061-1073, 2009
- (13) 大西三朗, 西原利治: NAFLD, NASH の病態と臨床 日本内科学会雑誌 98:2101-2111, 2009
- (14) 岡上武, 西原利治, 小野正文, 角田圭雄, 橋本悦子, 田村信司, 山田剛太郎, 河田純男, 工藤正俊 日本肝臓学会コンセンサス神戸 2009: NASH の診断と治療 肝臓 50:741-747, 2009
- (15) Toda K, Okada T, Hayashi Y, Saibara T. Preserved tissue-structure of efferent ductules in aromatase deficient mice. J Endocrinol 199:137-146, 2008
- (16) Enya M, Horikawa Y, Kuroda E, Yonemaru K, Tonooka N, Tomura H, Oda N, Yokoi N, Yamagata K, Shihara N, Iizuka K, Saibara T, Seino S, Takeda J: Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients. Human Mutat 29:E271-E277. 2008
- (17) Hayashi Y, Toda K, Saibara T, Okamoto S, Osanai M, Enzan H, Lee GH. Expression of fascin-1, an actin-bundling protein, in migrating hepatoblasts during rat liver development. Cell Tissue Res. 334:219-226, 2008
- (17) 西原利治: 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の遺伝的背景 成人病と生活習慣病 38:1196-1198, 2008

分担研究者 (宇都浩文)

- (1) Takami Y, Uto H, Takeshita M, Kai H, Akamatsu E, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M,

- Ido A, Kataoka H, Tsubouchi H. Proanthocyanidin derived from the leaves of *Vaccinium virgatum* suppresses platelet-derived growth factor-induced proliferation of the human hepatic stellate cell line LI90. *Hepatol Res* 40: 337-45, 2010
- (2) Imamura Y, Uto H, Oketani M, Hiramine Y, Hosoyamada K, Sho Y, Hiwaki T, Baba Y, Tahara K, Kubozono O, Kusano K, Tsubouchi H. Association between changes in body composition and the increasing prevalence of fatty liver in Japanese men. *Hepatol Res* 38: 1083-6, 2008
- (3) Hiramine Y, Imamura Y, Uto H, Koriyama C, Horiuchi M, Oketani M, Hosoyamada K, Kusano K, Ido A, Tsubouchi H. Alcohol drinking patterns and the risk of fatty liver in Japanese men. *J Gastroenterol* (in press)
- (4) 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* 40: 438-45, 2010
- (5) Takami Y, Uto H, Takeshita M, Kai H, Akamatsu E, Moriuchi A, Hasegawa S, Oketani M, Ido A, Kataoka H, Tsubouchi H. Proanthocyanidin derived from the leaves of *Vaccinium virgatum* suppresses platelet-derived growth factor-induced proliferation of the human hepatic stellate cell line LI90. *Hepatol Res* 40: 337-45, 2010
- (6) Imamura Y, Uto H, Oketani M, Hiramine Y, Hosoyamada K, Sho Y, Hiwaki T, Baba Y, Tahara K, Kubozono O, Kusano K, Tsubouchi H. Association between changes in body composition and the increasing prevalence of fatty liver in Japanese men. *Hepatol Res* 38: 1083-6, 2008

・ 平成 23 年度肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

厚生労働省科学研究費：糖尿病患者における肝障害の実態調査と非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の病態に基づく治療法の開発 (23141401)

平成22年度厚生労働科学研究補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業研究発表会

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

大阪府済生会吹田病院
岡上 武

平成23年1月25日

研究の背景

- 非肥満者に比し肥満者では肝発癌率が有意に高い(4.52倍)
(N Engl J Med 2003)
- 非糖尿病患者に比し糖尿病患者では肝発癌率が有意に高い(3倍)
(Gastroenterology 2004)
- 非高血圧患者に比し高血圧患者ではNAFLDの頻度が2-4倍高い
(J Hypertens 2008)
- 我が国の糖尿病患者18,325名の死因のトップは肝癌(8.6%)で肝硬変死
(4.7%)との合計すると13.3%が肝疾患関連死である
(糖尿病 2007)
- 過去10年間で非B非C型肝炎が2倍に増加、NAFLDも年々増加
- 単純性脂肪肝からNASH進展への遺伝的素因が明らかでない
- 単純性脂肪肝とNASHの簡便な血液生化学的鑑別法がない
- NASH治療のアルゴリズムがない

3年間の研究班研究テーマ

- 5,000例の糖尿病患者のdatabase作成
- 700例の高血圧患者のdatabase作成
- NASH起因肝癌の背景因子解明
- NASH発症・進展関連遺伝子の検討
- 単純性脂肪肝、NASHの長期予後
- 単純性脂肪肝、NASHの血液生化学的鑑別法
- NAFLDの病態解明
- NASHの治療アルゴリズムの作成

糖尿病患者5,583名の背景因子 (1)

Characteristic	N=5,583	Male (3,189)	Female (2,394)	P
	M±SD	M±SD	M±SD	
Age (y)	62.8±12.8	61.7±12.7	64.2±12.9	<0.001
BMI (kg/m ²)	24.7±4.7	24.6±4.3	24.9±5.2	0.271
AST (IU/L)	27.0±18.1	27.5±18.7	26.4±17.2	0.001
ALT (IU/L)	29.2±26.4	31.5±28.8	26.0±22.3	<0.001
GGT (IU/L)	48.9±73.0	60.3±87.2	33.9±43.7	<0.001
Alb (g/dL)	4.2±0.4	4.2±0.5	4.1±0.4	<0.001
PLT (×10 ³ /μL)	21.2±6.1	20.7±6.0	21.9±6.1	<0.001
FPG (mg/dL)	153.6±61.6	157.1±63.9	148.9±58.0	<0.001
HbA1c (%)	7.2±1.7	7.2±1.7	7.2±1.6	0.796
HOMA-IR	2.6±2.5	2.5±2.5	2.6±2.4	0.755
TChol (mg/dL)	194.9±39.3	191.4±39.5	199.6±38.5	<0.001
TG(mg/dL)	137.5±102.9	146.1±112.3	126.0±87.6	<0.001
HLA (ng/mL)	74.1±95.0	59.6±76.9	91.9±110.9	<0.001
TypeIV collagen 7S (ng/dL)	4.9±2.0	4.8±2.0	4.9±1.9	0.326
Ferritin (ng/dL)	143.7±157.3	172.5±173.7	103.5±120.2	<0.001
UA (mg/dL)	5.4±1.5	5.7±1.4	4.9±1.4	<0.001

糖尿病患者5,583例の背景因子 (2)

Characteristic	Total Objects	Male	Female	P
	Positive(%)	Positive(%)	Positive(%)	
HBsAg (+)	2.9%	3.0%	2.6%	0.359
Anti-HBc Ab(+)	29.8%	31.1%	28.1%	0.064
Anti-HCV Ab(+)	5.1%	5.1%	5.0%	0.885
Alcohol ≥20g/day	19.0%	30.5%	3.6%	<0.001
≥60g/day	4.4%	7.0%	0.9%	<0.001
Hypertension	51.4%	50.1%	53.1%	0.033
Dyslipidemia	63.6%	60.6%	68.1%	<0.001
Dyslipidemia (intervention)	45.2%	39.6%	52.4%	<0.001
HCC	1.5%	1.9%	1.0%	

Multivariate analysis to identify independent variables related to elevated serum ALT (≥31IU/L)

Male			
	P	Odds ratio	95% Confidential interval
Anti-HCV Ab	p<0.0001	3.359	2.324 - 4.855
BMI	p<0.0001	1.300	1.222 - 1.383
Age	p<0.0001	0.700	0.648 - 0.756
PLT	p<0.0001	0.965	0.950 - 0.980
Female			
	P	Odds ratio	95% Confidential interval
Anti-HCV Ab	p<0.0001	2.455	1.569 - 3.841
BMI	p<0.0001	1.375	1.282 - 1.476
Age	p<0.0001	0.776	0.706 - 0.854
PLT	p<0.0001	0.944	0.926 - 0.963

(Multiple logistic regression analysis)
(Independent variable: BMI, Age, Drinking, HBsAg, anti-HCV, PLT count, DM, HbA1c, HLT)

Multivariate analysis to identify independent variables related to elevated serum ALT (≥ 31 IU/L)

Male, 60y.o.<

	P	Odds ratio	95% Confidential interval
Anti-HCV Ab	p<0.0001	3.157	2.074 - 4.803
BMI	p<0.0001	1.205	1.104 - 1.315
Age	p<0.0001	0.697	0.574 - 0.845
PLT	p<0.0001	0.962	0.942 - 0.981

Female, 60y.o.<

	P	Odds ratio	95% Confidential interval
Anti-HCV Ab	p<0.0001	2.538	1.562 - 4.125
BMI	p<0.0001	1.267	1.159 - 1.384
Age	p<0.0001	0.656	0.525 - 0.819
PLT	p<0.0001	0.937	0.914 - 0.961

(Multiple logistic regression analysis)

NASH起因肝癌87例の解析
(Clin Gastroenterol Hepatol, submitted)

Characteristic	Total (n = 87)	Male (n = 54)	Female (n = 33)	P ^a
Age (y)	72 (69-75)	72 (69-75)	72 (68-75)	0.52
BMI (kg/m ²)	26.0 (23.8-28.3)	26.0 (23.8-28.8)	26.2 (23.9-27.7)	0.54
Obesity	54 (62%)	35 (65%)	19 (58%)	0.50
Diabetes	51 (59%)	31 (57%)	20 (61%)	0.77
Dyslipidemia	24 (28%)	13 (24%)	11 (33%)	0.35
Hypertension	47 (54%)	22 (41%)	25 (76%)	0.001
Platelet count ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	13.9 (10.1-18.0)	14.5 (11.7-18.0)	10.9 (7.8-18.0)	0.05
AST (IU/L)	47 (30-59)	46 (27-60)	47 (35-58)	0.45
ALT (IU/L)	36 (26-55)	43 (26-69)	34 (26-42)	0.11
γ -GTP (IU/L)	75 (40-115)	68 (36-177)	75 (40-115)	0.90
Fasting glucose (mg/dL)	114 (99-145)	112 (99-144)	120 (97-152)	0.59
HbA1C (%)	6.1 (5.4-7.1)	5.9 (5.4-7.0)	6.3 (5.2-7.1)	0.78
Total cholesterol (mg/dL)	169 (147-202)	169 (147-202)	169 (147-202)	0.62
HDL cholesterol (mg/dL)	50 (41-60)	45 (41-58)	55 (50-73)	0.03
Triglyceride (mg/dL)	100 (76-138)	118 (80-147)	96 (74-116)	0.06
Ferritin (ng/dL)	197 (74-401)	273 (154-703)	98 (23-172)	0.005
Hyaluronic acid (ng/mL)	166 (67-241)	151 (69-244)	174 (61-332)	0.85
AFP (ng/mL)	7.1 (5.0-18.0)	6.0 (4.0-14.7)	10.8 (5.9-18.0)	0.02
DCP (mAU/mL)	66 (22-298)	48 (22-243)	81 (21-942)	0.42

Characteristic	Total (n = 87)	Male (n = 54)	Female (n = 33)	P ^a
HCC tumor size (cm)	3.0 (2.0-4.0)	3.1 (2.2-4.5)	2.6 (1.9-4.0)	0.18
Numbers of HCC tumor				0.78
1	65 (75%)	39 (72%)	26 (79%)	
2 or 3	16 (18%)	11 (20%)	5 (15%)	
≥ 4	6 (7%)	4 (8%)	2 (6%)	
Background liver tissue				0.64
Steatosis grade ^b				
0: <5%	1 (1%)	1 (2%)	0 (0%)	
1: 5-33%	60 (69%)	36 (67%)	24 (73%)	
2: 34-66%	19 (22%)	11 (20%)	8 (24%)	
3: >66%	7 (8%)	6 (11%)	1 (3%)	
Necroinflammatory grade ^c				0.22
1: mild	31 (35%)	22 (41%)	9 (27%)	
2: moderate	45 (52%)	26 (48%)	19 (58%)	
3: severe	11 (13%)	6 (11%)	5 (15%)	
Fibrosis stage ^c				0.003
1	10 (11%)	10 (18%)	0 (0%)	
2	15 (17%)	10 (18%)	5 (13%)	
3	18 (21%)	13 (25%)	5 (15%)	
4	44 (51%)	21 (39%)	23 (70%)	

NAFIC score
(NASH, Ferritin, Insulin, type IV collagen 7S)

Variables	Cutoff values	Score values
1. Ferritin (ng/mL)		
Female/ Male	$\geq 200/300$	1 point
2. Insulin ($\mu\text{U/mL}$)	≥ 10	1 point
3. Type IV collagen 7S (ng/mL)	≥ 5.0	2 points

This score ranges from 0 to 4

Sumida Y et al. J Gastroenterol, in press.

AUROC for NAFIC score and various scoring systems

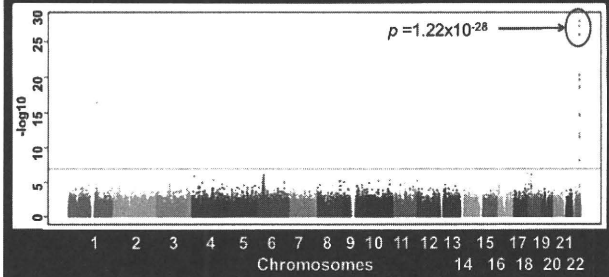
	N	AUROC for NASH	AUROC for Significant fibrosis (stage 2 to 4)	AUROC for Advanced fibrosis (stage 3 to 4)
NAFIC	619	0.791	0.802	0.832
HAIR	609	0.631	0.593	0.566
Palekar's score	563	0.733	0.799	0.835
Gholam's score	619	0.777	0.786	0.729
BAAT	604	0.647	0.585	0.526
BARD	604	0.627	0.688	0.734
NAFLD fibrosis score	588	0.685	0.817	0.853
N (Nippon) score	585	0.668	0.720	0.704
FIB4-index	608	0.742	0.848	0.871

JSG-NAFLD

GWSによるNASH感受性遺伝子の検討

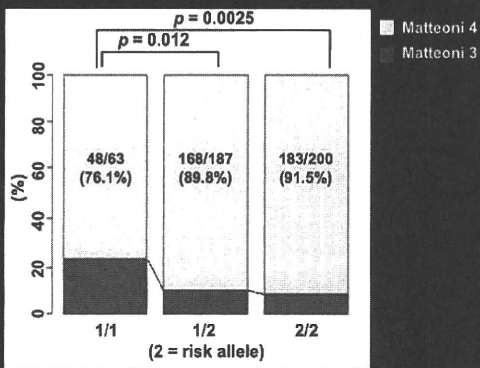
- DNA samplesの集積
NASH: 487例
Controls: 2,766例(日本人)
- 関連性解析のPlatform
major haplotypeをカバーする550,000 SNP markerを含むIllumina HumanHap610K SNP arrayを使用
- 統計解析
各SNPでNASHとの関連性の検討のためにコントロールとNASH間でtrend exact testを施行

Manhattan plot of GWAS results (487 NASH cases and 2,766 controls)



Marker ID	Risk allele frequency		OR allele	TrendExactP
	NASH	control		
K763067	0.653	0.461	2.203 (1.912-2.538)	1.22x10 ⁻²⁸

Distribution of NASH patients according to PNPLA3 genotypes



班員

高後 裕教授 (旭川医科大学)
河田純男教授 (山形大学)
渡辺純夫教授 (順天堂大学)
小池和彦教授 (東京大学)
橋本悦子教授 (東京女子医科大学)
植木浩二郎准教授 (東京大学)
有井滋樹教授 (東京医科歯科大学)
董 俊成准教授 (金沢大学)
安居 幸一郎准教授 (京都府立医科大学)
松田文彦教授 (京都大学)
竹原徹郎准教授 (大阪大学)
西原利治教授 (高知大学)
宇都浩文講師 (鹿児島大学)

研究協力者

田中延善(福井県済生会病院)、中村直登 (京都府立医科大学)
角田圭雄(市立奈良病院)、今井康晴(市立池田病院)
川中実和(川崎医科大学付属川崎病院)、中塔辰朗(済生会岡山総合病院)
小森康二 (鹿児島県南風病院)
朴 孝憲、島 俊英、榎村毅(大阪府済生会吹田病院)

平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性の肝炎に関する研究

課題番号：H20-肝炎-一般-009

予定期間：H20 年度から H22 年度まで

研究代表者：茶山一彰

所属研究機関：広島大学病院

所属部局：広島大学病院 消化器内科

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：

1 年目 78,400,000 円 2 年目 78,400,000 円 3 年目 82,320,000 円 計 239,120,000 円

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を用いて、種々の薬剤の抗ウイルス効果を検討した。(2)JFH1 のみならず、genotype 1b 型 HCV が増殖可能な培養系の構築を試みた。(3)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。(4)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。(5)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。(6)IL28B 遺伝子多型と IFN 治療抵抗性の相関解明を試みた。

III. 3 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)Soyasapogenol B 誘導体が IFN の ISGs 発現作用を促進し抗 HCV 効果を増強することを見いだした。(3)プロテアーゼ阻害剤/ポリメラーゼ阻害剤併用療法により、IFN 製剤を使用しない抗 HCV 療法の有効性を示した。(4)遺伝子型 1a, 2a, 1b, 2b の感染性クローンを作製、reverse genetics の系を構築した。1b 型クローンを用いて、コアや ISDR 変異、IL28B 多型が、HCV の感染性、増殖能、IFN 感受性に与える影響を検証した。また変異型 HCV を作製し、プロテアーゼ阻害剤の耐性能を検討した。

・研究代表者(茶山一彰)、研究分担者(土方誠) (1)新規不死化肝細胞と中空糸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 量が粒子の形成に重要であることを見いだした。(3)1b 型 HCV クローンを用いて、感染性ウイルス粒子が形成される培養細胞系を構築した。

- ・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) (1)IPS-1とのキメラ蛋白であるcIRF7は感染肝細胞特異的に高い抗ウイルス活性を示すことを示した。(2)HCV複製の抑制因子であるVAP-Cも、本システム的应用により高い抗HCV活性を示した。(3)IFN治療抵抗性と相関するIL28B遺伝子多型は移植症例の検討により肝実質細胞および免疫担当細胞の双方が重要であることを明らかにした。
- ・研究代表者(茶山一彰)、研究分担者(金子周一) (1)HCV感染キメラマウスの肝組織遺伝子発現プロファイルを解析し、HCVによるIFN誘導シグナルの抑制機構を解明した。(2)HBV及びHCV感染キメラマウスの肝組織mRNAとmicroRNAの遺伝子発現を解析し、HBV、HCVに感染に特徴的な遺伝子発現がmiRNAの発現変化により制御されていることを解明した。(3)キメラマウス感染に利用したHCVクローンH77株のHVR1 Quasispeciesの特徴を解析し、Quasispeciesの変化を特徴づける重要な変異が存在することを解明した。
- ・研究代表者(茶山一彰)、研究分担者(高倉喜信) (1)CpG配列を極度に減少させたplasmidとhydrodynamic injectionを用いて、肝内でγ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、マウスでの抗HCV効果が長期間継続することを示した。
- ・研究代表者(茶山一彰)、研究分担者(吉里勝利) (1) *in vitro* cross-linking法を用いてHBVのpre-S抗原に結合する蛋白のscreeningを行い、GRP78分子を同定した。さらにHBVおよびHCV感染によるGRP78 mRNAの発現レベルが低下することを見いだした。
- ・研究分担者(前川伸哉) Core、ISDRに加え、NS5AのIRRDR領域多型が再燃と強く関与し、最終治療効果に強く関与することを明らかとした。またゲノタイプ2a HCV症例においてもHCV全長解析を行い、コアの多型が治療効果に関与することを明らかにした。

IV. 今後考えられる新たな課題

(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)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。(3)ウイルス感染やIFN投与によるmRNA、miRNAの発現プロファイルを用いて新規の標的を検索し治療法を開発する。(4)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。(5)HCV蛋白を標的とする薬剤を組み合わせより有効な抗HCV療法を探索すると同時に、多剤耐性株に対する有効な治療法を探索する。(6)治療抵抗性のIL28B遺伝子多型において、その原因を検索し、IFN-λ製剤などを使用したより有効な治療法を開発する。

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)

発表論文

研究代表者・茶山一彰、分担者・今村道雄

(1) 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 viremia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 91(Pt 7):1854-64. 2010. (2) 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* 91(Pt 7):1668-77. 2010. (3) 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(2):673-81.2009
(4)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 (HBV) and clinical course of patients with chronic HBV infection. *J Infect Dis* 199(11):1599-607.2009. (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(11):3226-35.2009. (6)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(6):1046-54.2009.
(7)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* 89(Pt 9):2108-13.2008.
(8)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* 47(2):435-46.2008

研究分担者・吉里勝利

(1)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;177:654-65

研究分担者・金子周一

(1) Kaneko S, Sata M, Ide T, Yamashita T, Hige S, Tomita E, Mochida S, Yamashita Y, Inui Y, Kim SR, Komada N, Mikami T, Satoh S, Morita S, Takaguchi K, Hirashima N, Nishio Y, Watanabe D, Kioka K, Fujiwara K. Efficacy and safety of double filtration plasmapheresis in combination with interferon therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology Res.* 2010;40:1072-81

(2)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. Hepatology* 2010;53:817-26. (3) 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. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010;139:499-509

研究分担者・土方誠

(1) Kushima H, Wakita T, Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J Virol* (2010)84,9118-9127

研究分担者・高倉喜信

(1)Persistent interferon transgene expression by RNA interference-mediated silencing of interferon receptors. Takahashi Y, Vikman E, Nishikawa M, Ando M, Watanabe Y, Takakura Y. *J Gene Med* 12,739-746(2010) (2) Sustained exogenous expression of therapeutic levels of IFN- γ ameliorates atopic dermatitis in NC/Nga mice via Th1 polarization. Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y. *J Immunol* 184,2729-2735(2010) (3) Injection site-dependent induction of immune response by DNA vaccine: comparison of skin and spleen as a target for vaccination. Guan X, Nishikawa M, Takemoto S, Ohno Y, Yata T, Takakura Y. *J Gene Med.*,12,301-309(2010)

研究分担者・前川伸哉

(1)Reroducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N. *Biosystems* 2010;99:70-8. (2) HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. Enomoto N, Maekawa S. *Intervirology* 2010;53:66-9.

分担研究者・松浦善治

(1)Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peginterferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, Uchiyama H, Soejima Y, Shirabe K, Matsuura Y, and Maehara Y. *Gastroenterology* 39, 1577-1585 (2010) (2) Involvement of PA28g in the propagation of hepatitis C virus. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, and Matsuura Y. *Hepatology* 52, 411-420 (2010) (3) Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. Tani H, Shiokawa M, Kaname Y, Kambara H, Mori Y, Abe T, Moriishi K, and Matsuura Y. *J Virol* 84, 2798-2807 (2010).

研究分担者・大段秀樹

(1)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;119:3226-35

知的所有権取得及び申請状況

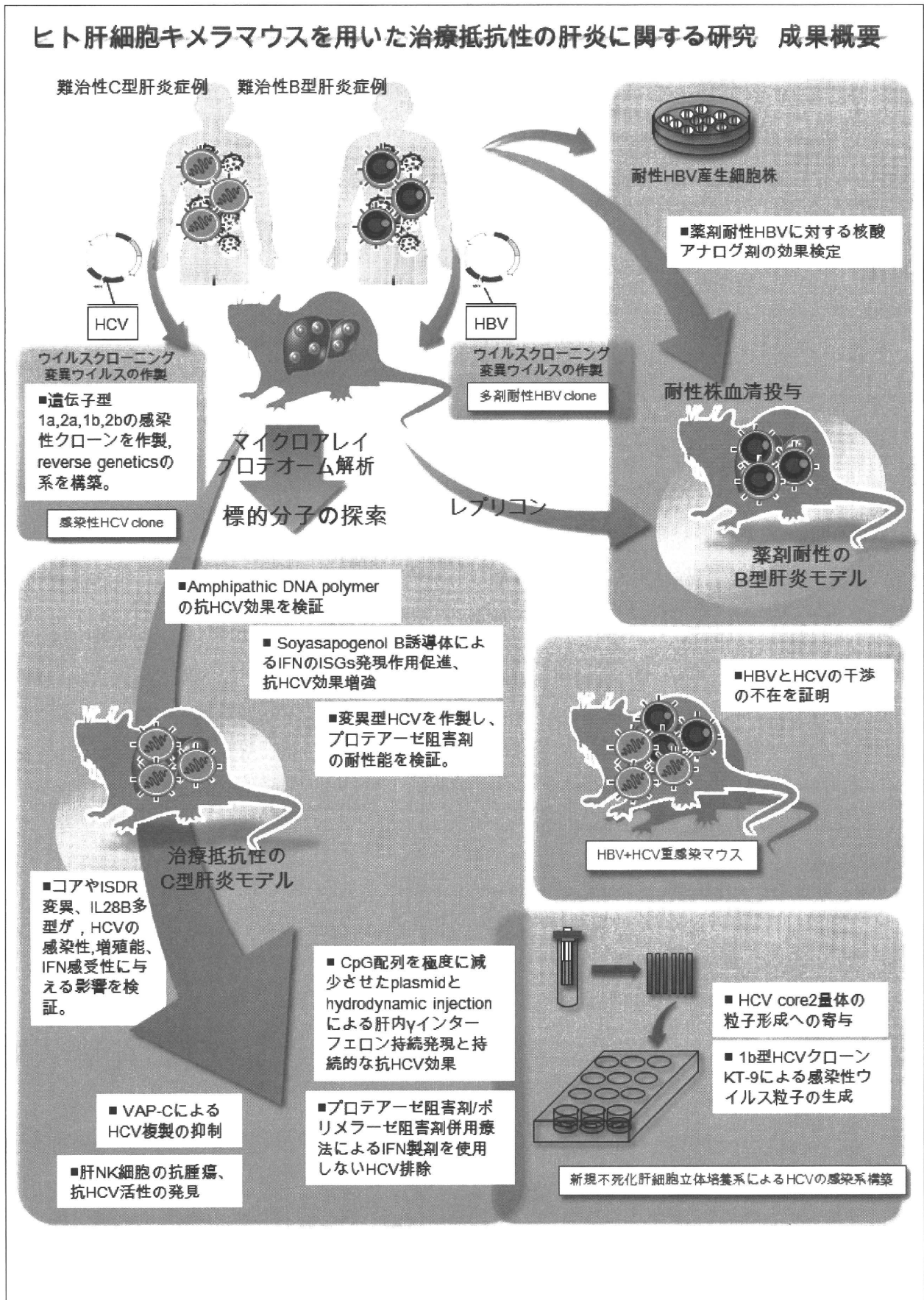
研究代表者・茶山一彰 (1) インターフェロン療法の効果予測用マーカーおよびインターフェロン作用増強剤のスクリーニング方法 出願日 平成20年11月28日、出願番号 特願2008-305643

(2) インターフェロン療法の効果予測マーカー 出願日 平成21年8月24日、出願番号 特願2009-193726

研究分担者・土方誠 (1) 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

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。



●研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和 61 年～平成 12 年 8 月 国家公務員共済組合連合会虎の門病院

平成 12 年 9 月～現在 広島大学

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

中村祐輔、熊田博光、松浦善治、脇田隆宇、溝上雅司、吉澤浩司、金子周一、Jia-Horng Kao[National Taiwan University]、Jake Liang[NIH]

・主な研究課題

ウイルス性肝炎に関する研究、肝炎ウイルスの増殖制御に関する研究、肝疾患の治療の研究

・これまでの研究実績

- (1) Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, **Chayama K.** HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut* 2010, in press
- (2) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, **Chayama K.** Nakamura Y, Kumada H. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 52(2):421-9.2010
- (3) Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayashida Y, Nakano R, Kubo M, Tsunoda T, Hayes CN, Kumada H, Nakamura Y, **Chayama K.** ITPA Polymorphism Affects Ribavirin-induced Anemia and Outcome of Therapy. *Gastroenterology*.139(4):1190-7.2010
- (4) 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*.30:405(2):361-9.2010
- (5) Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ohishi W, Arihiro K, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. *J Hepatol*.53(3):439-43.2010
- (6) 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 viremia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 91(Pt 7):1854-64. 2010.
- (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* 91(Pt 7):1668-77.2010
- (8) Tsukada H, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Fujimoto Y, Tsuge M, Takahashi H, Kumada H, Kamatani N, Nakamura Y, **Chayama K.** the Hiroshima Liver Study Group, and Toranomon Hospital. A Polymorphism in MAPKAPK3 Affects Response to Interferon Therapy for Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 136(5):1796-805.2009
- (9) 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* 41(5):591-5. 2009
- (10) 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(2):673-81.2009
- (11) 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 (HBV) and clinical course of patients with chronic HBV infection. *J Infect Dis*;199(11):1599-607.2009
- (12) 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(11):3226-35.2009
- (13) 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(6):1046-54.2009
- (14) 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* 89(Pt 9):2108-13.2008
- (15) 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*47(2):435-46.2008

・平成 23 年度肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

※申請している場合は、申請課題名を記載して下さい。(23230101)

創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス制御に関する研究

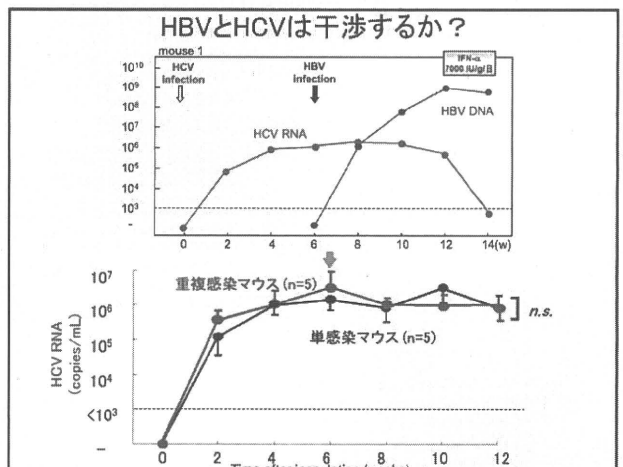
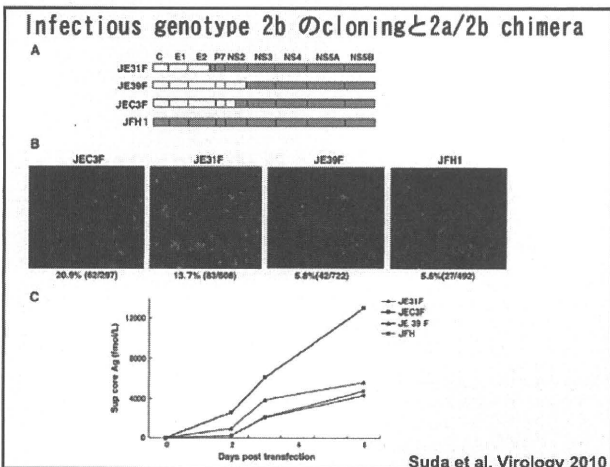
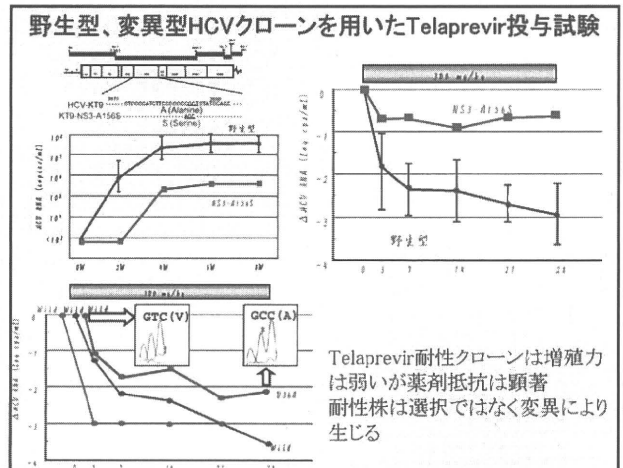
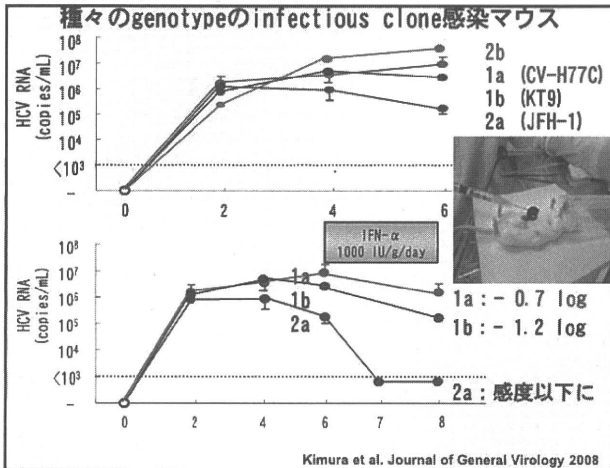
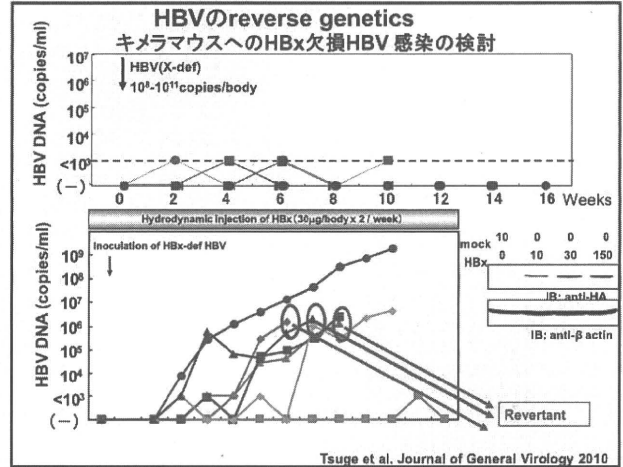
肝炎等克服緊急対策研究事業

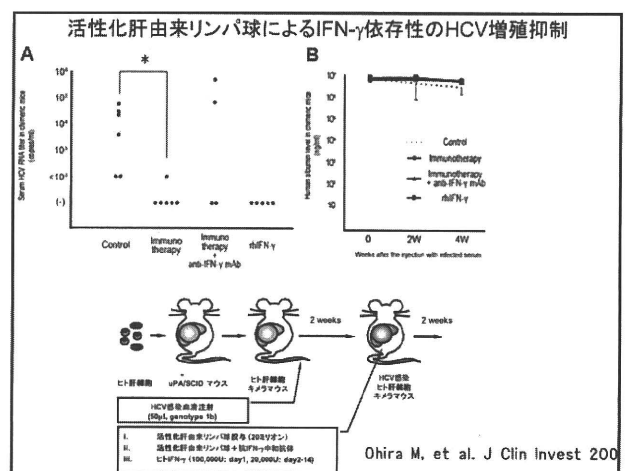
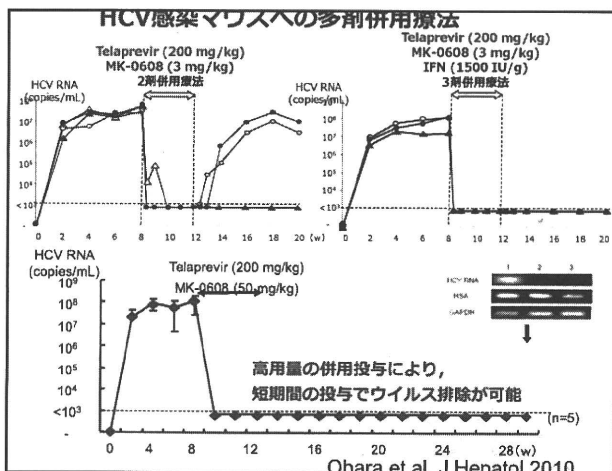
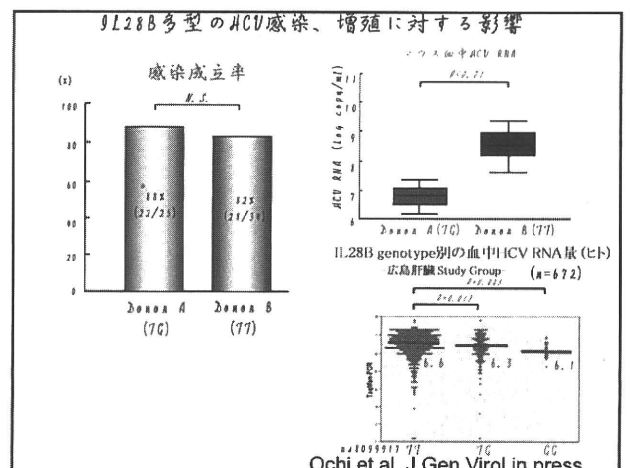
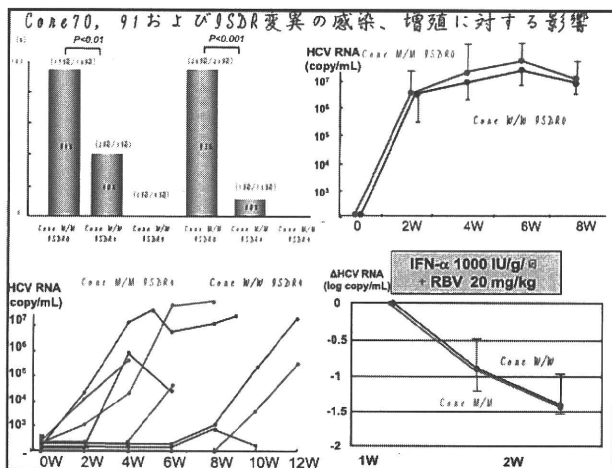
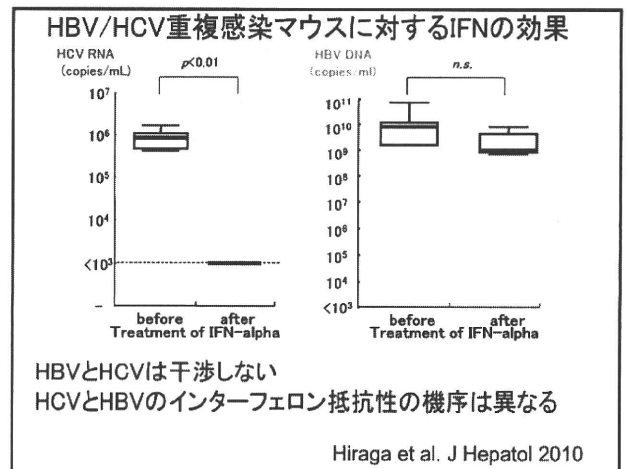
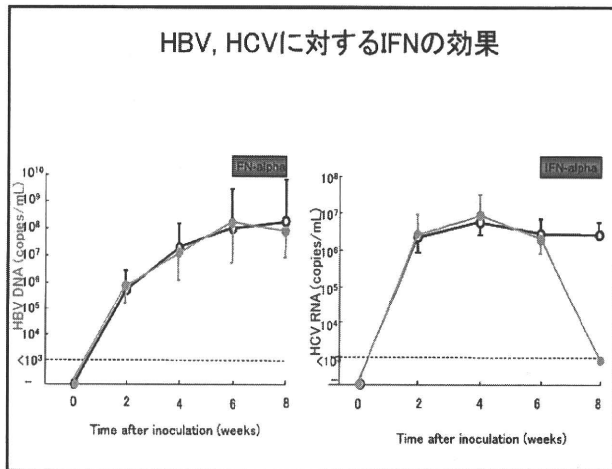
「ヒト肝細胞キメラマウスを用いた治療抵抗性肝炎に関する研究」班
平成20-22年度総括報告

主任研究者 茶山一彰 広島大学大学院医歯薬学総合研究科

【分担研究者】

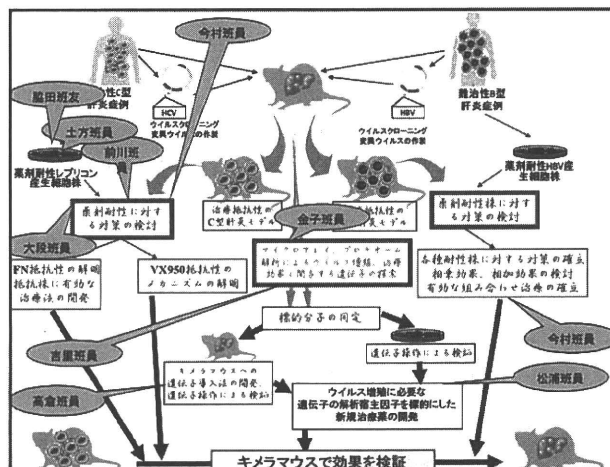
吉里勝利 広島大学大学院理学系研究科
金子周一 金沢大学大学院医学系研究科
土方 誠 京都大学ウイルス研究所
高倉喜信 京都大学大学院薬学研究科
前川伸哉 山梨大学大学院消化器内科学
松浦喜治 大阪大学微生物研究所
大段秀樹 広島大学大学院外科学
今村道雄 広島大学病院消化器・代謝内科
【班長研究協力者】
脇田隆宇 国立感染症研究所ウイルス第二部





キメラマウスを使用した新規治療の開発の研究

1. Amphipathic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. Matsumura T, et al. *Gastroenterology* 2009
2. G-to-A hypermutation in hepatitis B virus (HBV) and clinical course of patients with chronic HBV infection. Noguchi C, et al. *J Infect Dis* 2009
3. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. Ohira M et al. *J Clin Invest* 2009.
4. Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. Kamiya N et al. *J Gen Virol* 2010
5. Elimination of Hepatitis C Virus by Short Term NS3-4A and NS5B Inhibitor Combination Therapy in Human Hepatocyte Chimeric Mice. Ohara E, et al. *J Hepatol.* 2010
6. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. Abe H, et al. *J Hepatol.* 2010



平成 22 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝炎ウイルスワクチン実用化のための基盤的研究

課題番号：H20-肝炎-一般-010

予定期間：H20 年度から H22 年度まで

研究代表者：石井 孝司

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：ウイルス第二部

職名：室 長

年次別研究費(交付決定額)：

1 年目 59,506,000 円 2 年目 59,506,000 円 3 年目 53,555,000 円 計 172,567,000 円

I. 研究の意義

- (1) C型肝炎ウイルス(HCV)感染は持続感染化し、肝細胞癌を発症する重大な感染症である。しかし、インターフェロンおよびリバビリンによる治療効果は不十分である。輸血用血液のスクリーニングにより新規感染者数は減少しているが、医療従事者などハイリスクグループに予防的ワクチンが必要である。また、治療用ワクチンの効果も期待され、HCV のワクチン開発が望まれている。
- (2) HCV ワクチンが、HCV 感染に対する新たな予防法および治療法となれば、多くの患者の社会復帰を可能にし、医療保険のコスト軽減に寄与できると考えられる。また、予防用ワクチンを世界に先駆けて開発することにより、HCV キャリア率の高い国々への国際協力が可能となる。医療関係者だけでなく、薬物常用者などへの接種も考えられる。最近では HIV 感染において HCV の重感染が問題となっている。このため HIV 感染者に対する感染防御も必要である。

II. 研究の目的、期待される成果

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

III. 3 年間の研究成果

・研究代表者(石井孝司)

- (1) 2 種類、あるいは 3 種類のプラスミドトランスフェクションにより、1 回感染性の粒子を産生させる系の確立に成功した。また、この系を用い、遺伝子型 2a だけではなく、遺伝子型 1b の感染性粒子の産生にも成功した。
- (2) 組換えアデノウイルスベクターによる構造蛋白質の発現により、感染性粒子の産生量をさらに数十倍高める事に成功した。
- (3) 1 回感染性の粒子を継代する事により、粒子形成能を高める NS3 の変異を同定した。

・研究分担者(中村紀子)

- (1) 感染性 HCV 粒子 (J6/JFH-1 ウイルス) をホローファイバー(限外濾過膜)濃縮とゲル濾過カラムの 2 段階で高純度に精製することに成功した。
- (2) (1)で得られた HCV 粒子を種々のアジュバントと共にマウスに免疫し、マウス血清の感染中和活性を指標にスクリーニングし、効果の高いアジュバントを見出した。
- (3) (2)で得られたマウスからモノクローナル抗体を作製し、感染阻害活性のあるクローンを取得し、エピトープおよび抗体の CDR 配列を決定した。

・研究分担者(脇田隆宇)

- (1) 感染性 HCV 粒子の精製法を開発した。限外濾過、超遠心、アフィニティクロマトを組み合わせることで、純度の高いウイルス標品を得た。また、E2 蛋白質にエピトープを付加したウイルスの作成に成功した。ウイルスの精製度を高めるために、界面活性剤処理によりウイルス粒子の純度を高めることに成功した。精製ウイルスの電子顕微鏡観察によりウイルス粒子およびヌクレオキャプシドを確認した。精製ウイルス標品のプロ

テオーム解析によりアポリポ蛋白などの細胞由来蛋白質を同定した。

- (2) リコンビナント HCV E2 蛋白質を培養細胞で作成し、その感染阻害活性などを解析した。293 細胞で作成した蛋白質は CD81 結合能はあるものの、感染阻害活性が無かった。しかし、Drosophila 由来の S2 細胞で作成した E2 蛋白質は CD81 結合能に加え、感染阻害活性を有していた。
- (3) エンベロープ蛋白質 (E1 および E2) の糖鎖修飾がウイルスの感染性に及ぼす影響を解析した。エンベロープ蛋白質の糖鎖付加部位を変異させ、糖鎖が付加されないウイルス RNA を導入した細胞は野生型ウイルス RNA の導入に比べ、ウイルスの分泌量が 10%程度になり、感染性ウイルスはほとんど分泌されない。多くの糖鎖付加部位の変異は感染性を低下させたが、一部の變異では感染性を増強させる部位が存在した。

・研究分担者 (加藤孝宣)

- (1) 培養細胞での HCV の増殖複製を増強する変異を同定し、それらの變異の HCV ライフサイクルに与える影響を明らかにした。
- (2) 効率的に粒子生成を行うため、HCV の複製増殖が強い 6 種類の培養細胞株を分離し、中でももっとも高値を示す細胞株として HuH-7T1 細胞を同定した。

・研究分担者 (明里宏文)

- (1) マウスモデルと異なり正常な免疫機能が保持されたサル類において、ウイルス特異的免疫応答に対して連続的なエスケープ変異により慢性ウイルス感染の成立、これに伴い数年間におよぼ回帰性肝炎マーカー上昇および肝線維化、さらにヒト慢性肝炎の終末像の代表例の一つである chronic-to-fluminant hepatitis (慢性経過後の劇症肝炎) 等を主徴とする、肝炎ヒト C 型肝炎に極めて近似する長期慢性 C 型肝炎の霊長類モデルを初めて作出した。
- (2) 新規抗ウイルス薬や C 型肝炎予防治療ワクチンの評価系として期待される HCV/GBV-B キメラウイルスを構築しサル類での感染実験に成功した。

・研究分担者 (松本美佐子)

- (1) HCV は樹状細胞に感染せず、HCV の dsRNA を含む感染細胞の debris が樹状細胞に取り込まれ TLR3-TICAM-1 経路を活性化し NK, T 細胞を活性化することを明らかにした。
- (2) TLR3 リガンド poly(I:C)および TLR9 リガンド CpGDNA の細胞内取り込みに必須の分子を同定し、次世代核酸アジュバントの開発に重要な知見を得た。
- (3) 樹状細胞の TLR3-TICAM-1 経路のみを細胞外から活性化し、炎症性サイトカイン産生を誘導せず細胞性免疫を起動できる新規合成 RNA 分子の開発に成功した。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) ワクチン製造に使用できる細胞株の作製および粒子精製法の工業化レベルへの改良。不活化粒子のワクチン能の霊長類での実証。感染阻害活性の高いモノクローナル抗体の取得。
- (2) 全粒子ワクチン開発のためにウイルス精製法の開発は重要である。さらにウイルス粒子中に含まれる宿主蛋白質を同定する必要がある。特にウイルス粒子の外側でなく、内部に含まれる蛋白質を同定したい。
- (3) S2 細胞で作成した E2 蛋白質は感染阻害活性が高く、本来のウイルス粒子中に含まれる E2 蛋白質の性質に近いと考えられる。この蛋白質の免疫原性を解析して、リコンビナントワクチンの可能性を探索する。
- (4) ウイルス感染初期過程にエンベロープ蛋白質に付加されている糖鎖が重要と考えられる。感染性を抑制あるいは増強する機構について解析する必要がある。
- (5) 1 回感染性 HCV の細胞侵入過程における、天然の HCV やレトロウイルス表面に HCV のエンベロープ蛋白質を被せた偽ウイルス (HCVpp) との相違点の解析。
- (6) 慢性 C 型肝炎霊長類モデルによるウイルス持続感染化および宿主免疫応答回避機序の解明
- (7) 新規抗ウイルス薬や C 型肝炎予防治療ワクチンの評価系としての HCV/GBV-B キメラウイルス霊長類感染モデルの実用化。
- (8) 新規 RNA アジュバントの分子改変によるアジュバント効果の増強と生体内動態の解析、アジュバント評価系の確立。

V. 行政施策への貢献の可能性

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