

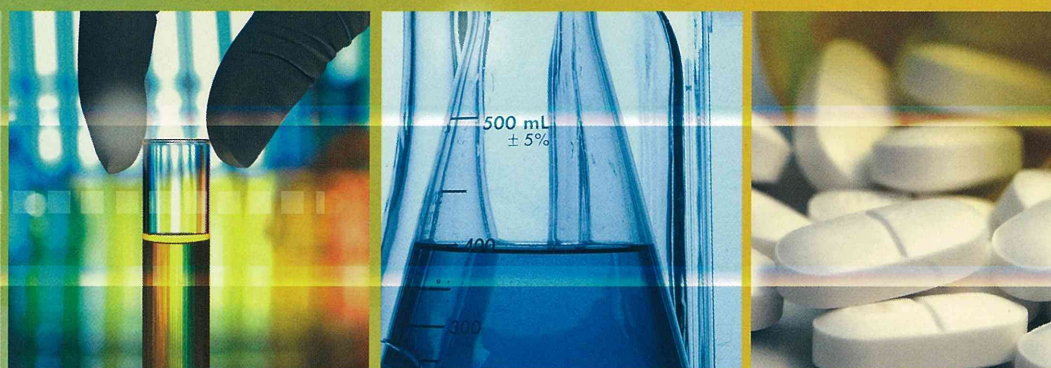
201104007A

厚生労働科学研究費補助金 地球規模保健課題推進研究事業 (国際医学協力研究事業)

主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の 制御に資する為の日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

(H23-国医-指定-007)

平成23年度 総括・分担研究報告書



研究代表者 **小池和彦**

東京大学大学院医学系研究科 教授

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）

主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資する為の
日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

（H23- 国医 - 指定 -007）

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小池 和彦
東京大学大学院医学系研究科 教授

平成 24（2012）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資する為の
日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

小池 和彦..... 1

II. 分担研究報告

1. C型肝炎ウイルス培養細胞を用いた研究

脇田 隆字..... 11

2. 肝炎ウイルス感染がインターフェロン応答に与える影響に関する研究

茶山 一彰..... 14

3. B,C,E型肝炎の疫学,免疫学,亜細亜との共同研究に関する研究

アクバル シェイクモハマドファズレ..... 17

4. 包括的遺伝子発現評価を用いたB,C型ウイルス肝炎に関する研究

金子 周一 24

III. 研究成果に関連した刊行物 (総説抜粋) 27

平成23年度 総括研究報告書

主にアジアに蔓延するウイルス性肝疾患の制御に資する為の
日米合作的肝炎ウイルス基礎研究

(H23-国医-指定-007)

研究代表者

小池 和彦 東京大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨：本研究は、日米医学協力研究会（USJCMSP）肝炎部会（以下『日米肝炎』と略す）の活動の一環として実施された。日米肝炎が、アジアに特に蔓延する肝炎ウイルスとしてB型とE型（HBV, HEV）、将来の感染拡大が懸念される肝炎ウイルスとしてC型（HCV）を主要標的として定めたことに呼応し、本研究班の今年度の研究活動も主にこの三種の肝炎ウイルスに関するものであった。B型肝炎ウイルスに関しては、ヒト肝細胞キメラマウスを用いたIFN感受性の検討、包括的遺伝子発現検索、C型肝炎ウイルスに関しては、ヒト肝細胞キメラマウスを用いたIFN感受性の検討、包括的遺伝子発現検索、感染や粒子形成に重要な表面タンパク質の構造および抗原性に関する研究、バングラデシュにおけるHCV蔓延対策等を、E型肝炎ウイルスについては、バングラデシュにおける実態解明と対策へ向けた試みを行なった。アジアのウイルス性肝疾患の制御に資するため、更なる基礎研究、国際医学協力による肝炎対策を進めていく。

A. 構成

<研究代表者>

小池和彦 東京大学大学院医学系研究科消化器内科学教授（USJCMSP『部会長』）

進医療開発科学分子病態制御内科学教授（USJCMSP『部会員』）

金子周一 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学教授（USJCMSP『部会員』）

<研究分担者>

脇田隆宇 国立感染症研究所ウイルス第二部部長（USJCMSP『部会員』）

アクバル シェイクモハメドファズレ 東芝病院研究部主任研究員（USJCMSP『部会員』）

<研究協力者（USJCMSP『研究員』）>

榎本信幸 山梨大学医学部第一内科学教授
樋野興夫 順天堂大学医学部病理学教授

茶山一彰 広島大学医歯薬学総合研究科先

小原道法 東京都臨床医学総合研究所感染

生体防御研究部門室長
工藤正俊 近畿大学医学部消化器内科学教授
松浦善治 大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野教授
岡本宏明 自治医科大学感染免疫学講座ウイルス学部門教授
佐田通夫 久留米大学医学部消化器疾患情報講座教授
田中榮司 信州大学医学部第二内科学教授
田中靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子情報医学分野教授
堀田 博 神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野教授
久保木眞 倉敷成人病センター肝臓病センター医長
正木尚彦 国立国際医療センター戸山病院消化器内科第二消化器科医長
李 天成 国立感染症研究所ウイルス第二部主任研究官
考藤達哉 大阪大学大学院医学系研究科樹状細胞制御治療学准教授
池田健次 共済組合連合会虎の門病院肝臓科部長
西原利治 高知大学消化器肝臓内科教授
進藤道子 明石市立市民病院肝臓内科部長
西口修平 兵庫医科大学肝胆膵内科学教授
坂井田功 山口大学医学部消化器病態内科学教授

<研究協力者 USJCMSP 『米国部会員』>

Christopher Walker (USJCMSP 『米国部会長』)
Professor, Ohio State University

Adrian Di Bisceglie

Professor, St Louis University

Michael Gale Jr.

Professor, University of Washington

Anna Lok

Professor, University of Michigan

Rajen Koshy

NIAID, NIH

B. 研究目的

アジア諸国の肝炎・肝臓癌の制御を目的とする。

C. 研究方法

ウイルス肝炎は、世界において最も重要な感染症の一つであり、多くの人に肝硬変、肝臓癌の災厄をもたらし、一方、劇症肝炎によって生命を脅かしている。特に、社会経済、保健衛生、医療水準的に厳しい状況にあるアジア諸国においては、HBV キャリア率の高さ、現在も増加しつつある HCV への新規感染、A 型肝炎の多発、E 型肝炎の集団発生等、その問題は小さくなることはない。更に、貧困等の社会的状況によって、十分な肝炎・肝臓癌の診断・治療を受けられない状況も、アジアにおけるウイルス肝炎の morbidity と mortality を上げる原因となっている。この様なアジア諸国における肝炎・肝臓癌を、日本と米国の研究者・医師が共同研究を通じ、またアジアの研究者を指導・共同研究することを通して制御することを目的とする。

1. 基礎的研究：本研究に参画する班員とその研究協力者が、それぞれの専門領域に於ける基礎研究の深化に努力した。具体的には、HBV と HCV と HEV に関する疫学的、ウイルス学的、免疫学的、分子生物学的研究を行った。

2. 米国研究者との研究協力：従来からの日米医学協力研究事業肝炎部会の日米両パネル間の研究協力体制を維持し、先端情報の速やかな相互開示によって、当該領域の知識と技術の増進に努力した。

3. アジア諸国研究者との研究協力：アジア諸国の医師・研究者との間に存在する研究協力体制を更に強化すると同時に、新たな研究協力の可能性をも模索した。

D. 研究結果及び考察

(1) ウイルス肝炎における肝癌の発生、治療、ウイルス増殖制御による再発抑制について、臨床的な検討を行なった。肝硬度測定によって肝癌発生のリスクが階層的に予測可能であること、ラジオ波 (RFA) 治療によって長期の予後が期待されうること、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスの増殖抑制によって肝癌再発の抑制あるいは予後の延長がもたらされることが明らかにされた。アジア地域における今後のウイルス肝炎治療、特に肝癌制御において有益な情報が得られたと考える。

(2) HIV/HBV 重複感染の疫学・病理病態に関して検討を行なった。HIV 感染症においては極めて多彩な HBV 遺伝子型による感染が起こっていること、HIV 感染症と HBV 感染症の治療における逆転写酵素阻害薬の

有用性と、耐性ウイルス発生の懸念について示された。アジアに蔓延しつつある HIV/HBV 重複感染の制御において、逆転写酵素阻害薬使用の厳格な管理が必須であることが示唆された。

(3) 293 細胞で作成した E2 蛋白質は HCV の擬似ウイルス粒子 (HCVpp) および感染性 HCV 粒子 (HCVcc) の感染阻害活性を示さなかった。一方、S2 細胞由来の E2 蛋白質は HCVpp および HCVcc の感染を容量依存性に阻害した。ところが、マウスに免疫して感染中和抗体の誘導能を比較すると、293 細胞由来の E2 蛋白質は感染中和抗体を誘導したが、S2 細胞由来の E2 蛋白質は感染中和活性を誘導できなかった。2 種類の E2 蛋白質が異なる性質を示したことから、両者の構造はウイルス表面に存在する E2 蛋白質と完全には同じではないが、一部の機能をそれぞれ示していると考えられた。HCV ワクチンの開発へ向けて、米国研究者との共同研究を通して貴重なデータが得られた。アジアにおける HCV 感染症の蔓延の防止を目指すものである

(4) バングラデシュ国内の医療従事者と一般集団に見られる散発性ならびに流行性急性肝炎の発症に関する疫学的研究と、地域的に特有な危険因子についての評価を、アジアの研究者との共同研究によって行なった。臨床的黄疸の症状が現れた急性肝炎患者 200 名が 2 ヶ月の間にダッカの北部約 400km にある病院を訪れた。それら全てが HAV、HBV および HCV に対する IgM 抗体については陰性であったのに対し、HEV に対する IgM 抗体については陽性を示したため HEV が急性肝炎の原因であると結果づけた。

患者らの年齢は 3~60 歳であり、浄水された水道水や飲料水を摂取していた。劇症肝炎にまで悪化し、診察にかかり 1 週間のうちに亡くなった患者もあった。また、ダッカの北 50km にある女子医科大学の寮では急性肝炎が発生した。一部の患者は寮で同室であり、全ての患者が同じ食堂で食事をとっていた。本流行も HEV が原因的因子であった。このことは急性肝炎の疫学が、バングラデシュ国内で変化していることを示唆している。バングラデシュでは長い間 HAV が主な急性肝炎の病因とされてきた。しかしながら、今日では HEV がバングラデシュ国内で起きる急性肝炎の主因となっている。HEV ウイルスはバングラデシュ国内の環境に持続的に存在し、散発性および流行性の急性肝炎、場合によっては重症肝炎の発生を引き起こす原因となることを予測させる。国家的レベルでの急性肝炎に関する持続した調査が、感染の更なる拡大を抑止するためには必要である

(5) ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、肝炎ウイルスの感染がインターフェロン (IFN) 応答にどのように影響しているのかを検討した。ヒト肝細胞キメラマウスに HBV あるいは HCV を感染させ、IFN を投与し投与 6 時間後の肝臓内遺伝子発現を cDNA microarray にて検討した。HBV 感染に伴い、発癌に関与する遺伝子の発現亢進と転写、DNA 修復に関与する遺伝子の発現低下を認めた。一方、HCV 感染では炎症反応や細胞間のシグナル伝達に関与する遺伝子の発現が亢進していた。ウイルス感染の有無による IFN 応答の変化について解析した結果、IFN シグナルの反応性低下と共に、HBV 感染

では細菌やウイルスの認識機構に関わる遺伝子、HCV 感染では抗原呈示反応に関与する遺伝子の IFN 反応性の低下を認めた。これらの結果から、肝炎ウイルスの感染はヒト肝細胞内の mRNA 発現を大きく変化させるとともに、IFN 応答能を低下させることにより IFN による抗ウイルス作用を回避している可能性が示唆された。アジアにおける B 型肝炎、C 型肝炎治療戦略を考える上で有益なデータが得られたと考えられる

(6) B 型慢性肝炎、C 型慢性肝炎、関連肝細胞がんにおける発現遺伝子および免疫を包括的に解析し、慢性肝炎および肝細胞がんの病態と発現遺伝子、免疫状態との関連を明らかにした。肝硬変は IFN 療を行った C 型慢性肝炎患者の治療効果に独立して関与する因子である。本研究では肝硬変が治療抵抗性を示す機序に肝臓内の mTOR 分子および FoxO 分子が関与していることを明らかにした。また、肝細胞癌患者における免疫状態を明らかにし、肝癌の進展に伴って CD45RO(+)CD4(+)CD25 が増加し、免疫を抑制していることを示した。

E. 結論

アジア諸国の肝炎・肝癌の制御という目的のための個別研究は、予定通りに進捗した。日米医学の枠組みの再検討が行なわれている渦中、米国側のファンドがないため米国において開催される予定であったミーティング (シンポジウム) が中止となった。アジアにおけるアジアにおける経口ウイルス肝炎感染症の現状と問題点が明らかになり、対策のポイントを日米両国において今後も継続して確認して行く。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Goto T, Yoshida H, Tateishi R, Enooku K, Goto E, Sato T, Ohki T, Masuzaki R, Imamura J, Shiina S, Koike K, Omata M. Influence of serum HBV DNA load on recurrence of hepatocellular carcinoma after treatment with percutaneous radiofrequency ablation. *Hepatol Int* 2011 Sep;5(3):767-773.
- 2) Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, Matsuura Y. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J Virol* 2011;85:13185-13194.
- 3) Kudo Y, Tanaka Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Mohri D, Isomura Y, Seto M, Nakagawa H, Asaoka Y, Tada M, Ohta M, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Maeda S, Shiina S, Yoshida H, Nakajima O, Kanai F, Omata M, Koike K. Altered composition of fatty acids exacerbates hepatotumorigenesis during activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Hepatol* 2011;55(6):1400-1408.
- 4) Yamashiki N, Sugawara Y, Tamura S, Kaneko J, Yoshida H, Aoki T, Hasegawa K, Akahane M, Ohtomo K, Fukayama M, Koike K, Kokudo N. Diagnostic accuracy of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin in screening for hepatocellular carcinoma in liver transplant candidates. *Hepatol Res* 2011;41(12):1199-1207.
- 5) Ikeda H, Tateishi R, Enooku K, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Kume Y, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ono T, Koike K, Yatomi Y. Prediction of hepatocellular carcinoma development by plasma ADAMTS13 in chronic hepatitis B and C. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20(10):2204-2211.
- 6) Watanabe S, Enomoto N, Koike K, Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M; PERFECT Study Group. Cancer preventive effect of pegylated interferon α -2b plus ribavirin in a real-life clinical setting in Japan: PERFECT interim analysis. *Hepatol Res* 2011;41(10):955-964.
- 7) Uchino K, Tateishi R, Shiina S, Kanda M, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Omata M, Yoshida H, Koike K. Hepatocellular carcinoma with extrahepatic metastasis: Clinical features and prognostic factors. *Cancer* 2011;117(19):4475-4483.
- 8) Nakagawa H, Hirata Y, Takeda K, Hayakawa Y, Sato T, Kinoshita H, Sakamoto K, Nakata W, Hikiba Y, Omata M, Yoshida H, Koike K, Ichijo H, Maeda S. Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibits hepatocarcinogenesis by controlling the tumor-suppressing function of stress-activated MAPK. *Hepatology* 2011;54(1):185-195.

- 9) Kojima K, Takata A, Vadnais C, Otsuka M, Yoshikawa T, Akanuma M, Kondo Y, Kang YJ, Kishikawa T, Kato N, Xie Z, Zhang WJ, Yoshida H, Omata M, Nepveu A, Koike K. MicroRNA122 is a key regulator of α -fetoprotein expression and biologically aggressive behavior of hepatocellular carcinoma. *Nat Commun* 2011 Jun 7;2:338. doi: 10.1038/ncomms1345. PubMed PMID: 21654638. (on-line journal)
- 10) Tsukada K, Sugawara Y, Kaneko J, Tamura S, Tachikawa N, Morisawa Y, Okugawa S, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S, Yatomi Y, Makuuchi M, Kokudo N, Koike K. Living donor liver transplantations in HIV- and hepatitis C virus-coinfected hemophiliacs: Experience in a Single Center. *Transplantation* 2011;91(11):1261-1264.
- 11) Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Nakagawa H, Koike K, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2011;43(5):455-458.
- 12) Kershenovich K, Razavi HA, Cooper CL, Alberti A, Dusheiko GM, Pol S, Zuckerman E, Koike K, Han K-H, Wallace CM, Zeuzem S, Negro F. The global health burden of hepatitis C virus infection. *Liver Int* 31(S2):4-17, 2011.
- 13) Sievert W, Altraif I, Razavi HA, Abdo A, Ahmed EA, AlOmair A, Amarapurkar D, Chen C-H, Dou X, El Khayat H, elShazly M, Esmat G, Guan R, Han K-H, Koike K, Largen A, McCaughan G, Mogawer S, Monis A, Nawaz A, Piratvisuth T, Sanai FM, Sharara AI, Sibbel S, Sood A, Suh DJ, Wallace C, Young K, Negro F. A systematic review of hepatitis C virus epidemiology in Asia, Australia and Egypt. *Liver Int* 31(S2):61-80, 2011.
- 14) Masuzaki R, Shiina S, Tateishi R, Yoshida H, Goto E, Sugioka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Omata M, Koike K. Utility of contrast enhanced ultrasonography with sonazoid in radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26(4):759-764.
- 15) Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol* 2011;54:432-438.
- 16) Kondo Y, Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Goto E, Nakagawa H, Masuzaki R, Asaoka Y, Fujie H, Goto T, Omata M, Yoshida H, Koike K. Intrahepatic bile duct dilatation after percutaneous radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: impact on patient's prognosis. *Liver Int* 2011;31:197-205.
- 17) Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute

- immune response. *PLoS Pathog.* 2011 7(10):e1002289.
- 18) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem.* 2011 286(43):37264-73.
- 19) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 410(3):404-9.
- 20) Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2011 92(9):2082-7.
- 21) Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine.* 2011 29(29-30):4821-8.
- 22) Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One.* 2011;6(6):e21284.
- 23) Tsuge M, Takahashi S, Hiraga N, Fujimoto Y, Zhang Y, Mitsui F, Abe H, Kawaoka T, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Effects of hepatitis B virus infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice. *J Infect* 2011;204(2):224-8
- 24) Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, Zhang Y, Ohnishi M, Kohno T, Abe H, Miki D, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Miya F, Tsunoda T, Chayama K. Hepatitis C virus response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse. *PLoS One.* 2011;6(8):e23856.
- 25) Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M. Animal model for study of human hepatitis viruses. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(1):13-18.
- 26) Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Yoshima T, Aikata H, Ikeda K, Kumada H, Toyota J, Morizono T, Tsunoda T, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet.* 2011;43(8):797-80
- 27) Akbar SM, Al-Mahtab M, Hiasa Y. Future aspects of therapy for hepatitis B virus infection: value of surrogate markers, innovative therapy, and global collaboration. *J Gastroenterol* 2011; 46(6):717-23
- 28) Akbar SM, Furukawa S, Horiike N, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Safety and

- immunogenicity of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells in patients with chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 2011; 18(6):408-14.
- 29) Akbar SM, Horiike N, Chen S, Michitaka K, Abe M, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. Mechanism of restoration of immune responses of chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy; increased antigen processing and presentation by dendritic cells. *J Viral Hepat* 2011; 18(3):200-5.
- 30) Akbar SM, Al-Mahtab M. Immune interventional strategies against chronic infections diseases and cancers: present challenges and road map to solution. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology* 2011; 1(1):5-13
- 31) Akbar SM, Al-Mahtab M. Immune therapy for chronic hepatitis B: will this lead to Rome. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology* 2011; 1(2):47-8
- 32) Chen S, Akbar SM, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Immunosuppressive functions of hepatic myeloid-derived suppressor cells of normal mice and in a murine model of chronic hepatitis B virus. *Clin Exp Immunol.* 2011;166(1):134-42
- 33) Al-Mahtab M, Karim F, Foster G, Solaimanm S, Akbar SM, Rahman S. Prevalence and risk factors of asymptomatic HCV infection in Bangladesh. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 2011;1(2):3-16
- 34) Al-Mahtab M, Rahman S, Akbar SM, Kamal M, Khan SI. Assessment of clinical utility of low and high normal alanine aminotransferase values in patients with chronic hepatitis B virus infection at Bangladesh. *Digestion* 2011; 83(1-2): 60-4
- 35) Nahar N, Al-Mahtab M, Rahman A, Akbar SM, Habib S. Histopathological assessment of liver biopsy specimens in the context of HBV DNA and HBeAg in patients with chronic hepatitis B. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology* 2011; 1(2):83-8
- 36) Hajime Sunagozaka, Masao Honda, Taro Yamashita, Ryuhei Nishino, Hajime Takatori, Kuniaki Arai, Tatsuya Yamashita, Yoshio Sakai, Shuichi Kaneko. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer* 2011;129(7):1576-1585.
- 37) Yoshiko Takata, Yasunari Nakamoto, Akiko Nakada, Takeshi Terashima, Fumitaka Arihara, Masaaki Kitahara, Kaheita Kakinoki, Kuniaki Arai, Taro Yamashita, Yoshio Sakai, Tatsuya Yamashita, Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko. Frequency of CD45RO(+) subset in CD4(+)CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters* 2011;307(2):165-173.
- 38) Masao Honda, Kenji Takehana, Akito Sakai, Yusuke Tagata, Takayoshi Shirasaki,

- Shinobu Nishitani, Takahiko Muramatsu, Tatsuya Yamashita, Yasunari Nakamoto, Eishiro Mizukoshi, Yoshio Sakai, Taro Yamashita, Mikiko Nakamura, Tetsuro Shimakami, MinKyung Yi, Stanley M. Lemon, Tetsuo Suzuki, Takaji Wakita, Shuichi Kaneko; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition Impairs Interferon Signaling through mTOR and FoxO pathways in Patients with Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 2011;141(1):128-140. e2.
- 39) Taro Yamashita, Masao Honda, Shuichi Kaneko. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2011;26(6):960-964.
- 40) Eishiro Mizukoshi, Yasunari Nakamoto, Kuniaki Arai, Tatsuya Yamashita, Akito Sakai, Yoshio Sakai, Takashi Kagaya, Taro Yamashita, Masao Honda, Shuichi Kaneko. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011;53(4):1206-1216.
2. 学会発表
- 1) Akbar SM, Al-Mahtab M, Rahman S. Emergency care for intractable liver diseases: Development of novel therapeutic approaches for their containment. 3rd International Conference, Bangladesh Society of Emergency Medicine. Dhaka, Bangladesh, 2011
- 2) Akbar SM, Al-Mahtab M, Aguilar JC, Onji M, Mishiro S. Sustained control of HBV DNA by a novel vaccine containing HBcAg and HBsAg in patients with chronic hepatitis B. 21st Conference of the Asia Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2011). Bangkok, Thailand, 2011
- 3) Akbar SM. Engineering immune therapy against hepatitis and liver cancer. 19th Annual Conference of Indian National Association for the Study of Liver. Chandigarh, India, 2011
- 4) Akbar et al. Immune therapy for chronic hepatitis B: Will this lead to Rome, Dhaka, Bangladesh. World Hepatitis Day conference by Association for the study of the liver, Bangladesh, Dhaka, Bangladesh, 2011
- 5) Akbar SM. Dendritic cells in chronic hepatitis B. 8th APASL Single Topic Conference, Beijing, China, 2011
- 6) Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S. Better prognosis of ACLF in patients with compensated cirrhosis and acute assault by HEV: lesson learnt from a Bangladeshi prospective study. 21st Conference of the Asia Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2011). Bangkok, Thailand, 2011
- 7) Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S. Initial experience of combination therapy with pegylated interferon and entecavir in patients with chronic hepatitis B in Bangladesh. 21st Conference of the Asia Pacific Association for the Study of the

Liver (APASL 2011). Bangkok, Thailand, 2011

American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

8) Chen S, Akbar SM, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Hepatic myeloid-derived suppressor cells controlling intrahepatic immunity in physiological and pathological conditions. The 62nd Annual Meeting of American Association for the Study of the Liver Diseases, San Francisco, USA, 2011

I. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

9) 陳式儀、ファズレ アクバル、阿部雅則、日浅陽一、恩地森一. 肝臓における Myeloid-derived suppressor cell (MDSC) の機能解析. 第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011

10) Chayama K, Takahashi S, Kawakami Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y, Ohmura T, Ishikawa H, Watanabe H, Guo T, McPhee F, Hughes EA, Kumada H. Dual Oral Combination Therapy with the NS5A Inhibitor Daclatasvir (DCV; BMS-790052) and the NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir (ASV; BMS-650032) Achieved 90% Sustained Virologic Response (SVR12) in Japanese HCV Genotype 1b-Infected Null Responders. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

11) Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Yoshima T, Aikata H, Ikeda K, Kumada H, Toyota J, Morizono T, Tsunoda T, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. The 62th Annual Meeting of the

研究分担報告書

C型肝炎ウイルス培養細胞を用いた研究

研究分担者

脇田 隆字 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長

研究要旨：アジア諸国の肝炎・肝癌の予防と制御を目的として本研究は実施されている。そこで、本分担研究はC型肝炎ウイルスの培養細胞を用いた基礎研究により、C型肝炎ウイルスの理解を深め、その予防と治療に資する研究成果をあげることを目的としている。そのためにC型肝炎ウイルスの感染や粒子形成に重要な表面タンパク質の構造および抗原性に関する研究をおこなった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は1989年に発見されたが培養細胞でのウイルス培養が困難でウイルス学的研究が進んでこなかった。2005年に我々がJFH-1株を用いたウイルス培養系を報告してからHCV研究は急速に進んでいる。ウイルス粒子の形成や分泌、感染には表面タンパク質と宿主因子の相互作用が重要である。そこで、HCVの表面タンパク質であるE2蛋白質の構造とその生物学的活性について検討した。

B. 研究方法

HCVの表面タンパク質であるE2タンパク質を293細胞およびDrosophila由来のS2細胞で作成し、リコンビナントE2蛋白質として精製した。作成したリコンビナントE2蛋白質による培養細胞における感染阻害活性およびマウスに免疫した場合の抗体誘導能について検討した。

(倫理面の配慮)

各種研究材料の取り扱い及び組換えDNA実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報厳格に管理保存する。

C. 研究結果

293細胞で作成したE2蛋白質はHCVの擬似ウイルス粒子(HCVpp)および感染

性 HCV 粒子 (HCVcc) の感染阻害活性を示さなかった。一方、S2 細胞由来の E2 蛋白質は HCVpp および HCVcc の感染を容量依存性に阻害した。

ところが、マウスに免疫して感染中和抗体の誘導能を比較すると、293 細胞由来の E2 蛋白質は感染中和抗体を誘導したが、S2 細胞由来の E2 蛋白質は感染中和活性を誘導できなかった。

D. 考察

今年度は異なる培養細胞で作成した E2 蛋白質の感染阻害活性および感染中和抗体誘導能を比較検討した。興味深いことに、蛋白質自身の感染阻害活性と免疫による感染中和抗体誘導能では逆の結果を示した。2 種類の E2 蛋白質が異なる性質を示したことから、両者の構造はウイルス表面に存在する E2 蛋白質と完全に同じではないが、一部の機能をそれぞれ示していると考えられた。従って、蛋白質自身による感染阻害機構と感染中和抗体による感染阻害機構を解析することにより HCV の初期感染機構を詳細に解明することが可能となると考えられた。

E. 結論

HCV の E2 蛋白質の機能解析により初期感染機構を詳細に明らかにすることが可能と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. PLoS Pathog. 2011 7(10):e1002289.
- 2) Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. J Biol Chem. 2011 286(43):37264-73.
- 3) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. Biochem Biophys Res Commun. 2011 410(3):404-9.
- 4) Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. J Gen Virol. 2011 92(9):2082-7.
- 5) Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. Vaccine. 2011 29(29-30):4821-8.

6) Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). PLoS One. 2011;6(6):e21284.

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

2.学会発表

なし

3.その他

なし

H. 知的所有権の出願・取得状況

研究分担報告書

肝炎ウイルス感染がインターフェロン応答に与える影響に関する研究

研究分担者

茶山 一彰 広島大学大学院消化器・代謝内科 教授

研究要旨：ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、肝炎ウイルスの感染が、インターフェロン (IFN) 応答にどのように影響しているのかを検討した。ヒト肝細胞キメラマウスにB型 (HBV) あるいはC型肝炎ウイルス (HCV) を感染させ、IFNを投与し、投与6時間後の肝臓内遺伝子発現をcDNA microarrayにて検討した。HBV感染に伴い、発癌に関与する遺伝子の発現亢進と転写、DNA修復に関与する遺伝子の発現低下を認めた。一方、HCV感染では、炎症反応や細胞間のシグナル伝達に関与する遺伝子の発現が亢進していた。ウイルス感染の有無によるIFN応答の変化について解析した結果、IFNシグナルの反応性低下と共に、HBV感染では細菌やウイルスの認識機構に関わる遺伝子、HCV感染では抗原呈示反応に関与する遺伝子のIFN反応性の低下を認めた。これらの結果から、肝炎ウイルスの感染は、ヒト肝細胞内のmRNA発現を大きく変化させるとともに、IFN応答能を低下させることにより、IFNによる抗ウイルス作用を回避している可能性が示唆された。

A. 研究目的

B型・C型慢性肝疾患に対する治療として、インターフェロン(IFN)治療の臨床的な有効性が示されているが、その分子メカニズムに関しては、不明な点が多い。また、肝生検は侵襲的な検査であることから、IFN投与前後における肝細胞内の遺伝子発現の変化を検討することも困難である。ヒト肝細胞キメラマウスは、生体内における肝炎ウイルスの持続感染モデルとして、感染実験や薬効評価に関する研究に応用されている。本研究では、このヒト肝細胞キメラマウスを用いて、肝炎ウイルス感染がヒト肝細胞

に及ぼす直接的な影響、あるいはIFN応答へどのように影響しているのかをcDNA microarrayを用いて解析した。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスにB型(HBV)あるいはC型肝炎ウイルス(HCV)感染患者血清を投与した。投与8週後、血中ウイルス titer が十分に上昇した時点で7000 IU/g/体重のIFN- α を筋肉注射した。IFN投与6時間後、マウスを犠死、肝臓よりヒト肝細胞部分を採取後、cDNA microarrayを行い、各群間での遺伝子発現変化を検討した。

ウイルス感染および IFN の有無による発現変化を検討するため、以下の Group A～F の 6 群で検討した(各群 n=3-4).

Group A : 感染なし/IFN なし.

Group B : 感染なし/IFN あり.

Group C : HBV 感染/IFN なし.

Group D : HBV 感染, IFN あり.

Group E : HCV 感染, IFN なし.

Group F : HCV 感染, IFN あり.

cDNA microarray 解析は, HBV 感染に関しては Agilent 社 Whole Human Genome 4x44K を HCV 感染に関しては Affimetrix 社 GeneChip Human Gene U133Plus2.0 Array を用いた.

(倫理面の配慮)

マウスへの感染のための血清の提供は, 動物実験への使用も含めた実験計画書に基づく説明文章, 同意書を使用して同意を得た. 説明文章, 同意書の妥当性については当学倫理審査委員会の承認を得た. マウスの犠死は麻酔下に行い, 可能な限り苦痛を除去した.

C. 研究結果

HBV 感染に伴う変化を検討したところ (Group A vs C), 感染に伴い, 発現が 3 倍以上亢進したものを 159 遺伝子, 3 倍以上低下したものを 214 遺伝子認めた. 3 倍以上亢進した遺伝子の上位 20 遺伝子の内, 8 遺伝子が細胞増殖に関連, あるいは様々な癌腫で発現が変化するものであった. また 3 倍以上低下した遺伝子の上位 20 遺伝子の内, 14 遺伝子が細胞分裂や DNA 修復に関連しているものであった. 一方, HCV 感染に伴い (Group A vs E), 発現が 3 倍以

上亢進したものを 157 遺伝子, 3 倍以上低下したものを 24 遺伝子認めた. 3 倍以上亢進した遺伝子の上位 20 遺伝子の内, 10 遺伝子が炎症反応や免疫応答に関連するものであった. また 3 倍以上低下した遺伝子の上位 20 遺伝子の内, 5 遺伝子が細胞内の代謝に関与するものであった. 肝炎ウイルスの感染がどのように IFN 応答へ影響しているのかを解析するため, ウイルス感染の有無による IFN 応答の変化について比較したところ, 感染に伴う IFN シグナル反応性の低下と共に, HBV 感染では細菌やウイルスの認識機構に関わる遺伝子, HCV 感染では抗原呈示反応に関与する遺伝子の IFN 反応性が有意に低下していた.

D. 考察

肝炎ウイルスの感染は, ヒト肝細胞内の mRNA 発現を大きく変化させるとともに, IFN 応答能を低下させることにより, IFN による抗ウイルス作用を回避している可能性が示唆された.

E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスによるウイルス感染モデルを用いて, 肝炎ウイルスの感染が肝細胞に及ぼす影響, さらには IFN 応答に与える影響についての解析が可能であった.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Tsuge M, Takahashi S, Hiraga N, Fujimoto Y, Zhang Y, Mitsui F, Abe H, Kawaoka T, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Effects of hepatitis B virus infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice. *J Infect* 2011;204(2):224-8
- 2) Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, Zhang Y, Ohnishi M, Kohno T, Abe H, Miki D, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Miya F, Tsunoda T, Chayama K. Hepatitis C virus response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse. *PLoS One*. 2011;6(8):e23856.
- 3) Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M. Animal model for study of human hepatitis viruses. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(1):13-18.
- 4) Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Yoshima T, Aikata H, Ikeda K, Kumada H, Toyota J, Morizono T, Tsunoda T, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet*. 2011;43(8):797-800
- Responders. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011
- 2) Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Yoshima T, Aikata H, Ikeda K, Kumada H, Toyota J, Morizono T, Tsunoda T, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1.特許取得
なし
- 2.実用新案登録
なし
- 3.その他
なし

2.学会発表

- 1) Chayama K, Takahashi S, Kawakami Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y, Ohmura T, Ishikawa H, Watanabe H, Guo T, McPhee F, Hughes EA, Kumada H. Dual Oral Combination Therapy with the NS5A Inhibitor Daclatasvir (DCV; BMS-790052) and the NS3 Protease Inhibitor Asunaprevir(ASV; BMS-650032) Achieved 90% Sustained Virologic Response (SVR12) in Japanese HCV Genotype 1b-Infected Null

研究分担報告書

B, C, E型肝炎の疫学, 免疫学, 亜細亜との共同研究に関する研究

研究分担者

アクバル シェイクMF 東芝病院研究部 主任研究員

研究要旨：

肝炎とその合併症は世界的に公衆衛生上の大きな問題となっているが、特にアジアの発展途上国においてはより深刻である。この半世紀の間、肝炎の原因、発症機序の解明、予防法、診断法そして治療法の確立を目的とした基礎研究と臨床研究が全世界で精力的に行われてきた。これらの多大な研究の成果により先進国では効果的な予防法と治療法が確立されている。にもかかわらず、アジアの発展途上国では適切な予防策が講じられていないだけでなく、公衆衛生が未発達なため肝炎の有病率すら把握されていない。現在推奨されている肝炎予防策は、先進国における研究結果から発展してきたものであり、アジアの発展途上国では、その特有な保健医療の現状や貧しい経済状況の中において、それらの予防策をそのまま適用することは困難である。従って、本研究プロジェクトでは、発展途上国における発展途上国の実情に即した肝炎の予防と治療のガイドラインの策定のため、我々は基礎研究と臨床研究の両面を実施することとした。肝炎の基礎研究は、最先端の研究施設、技術、知識を持つ日本において行うこととし、臨床研究は高い肝炎罹病率を持つ、バングラデシュにおいて行うこととした。最終的に、臨床研究と基礎研究の結果をとりまとめることにより、発展途上国の社会的実情に即した肝炎と合併症の予防と治療のための新ガイドラインを確立することを目的とした。

また、他の発展途上国諸国も、社会・経済・医療制度面においてバングラデシュと多くの類似した状況を持つことを考えれば、策定された新ガイドラインは多くの発展途上国においても適用されることが期待できる。

A. 研究目的

先進国における基礎研究と発展途上国における臨床研究を基にした、発展途上国の実情に即した肝炎感染拡大の予防と治療のための新ガイドライン作成

B. 研究方法

1. バングラデシュ国内の医療従事者と一般集団に見られる散発性ならびに流行性急性肝炎の発症に関する疫学的研究と地域的に特有な危険因子についての