

- Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: potential treatment for hepatitis C. *Liver Int*, 31(6): 871-880, 2011.
- (5) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes*, in press.
- (6) Osugi K, Suzuki H, Nomura T, Ariumi Y, Shibata H, Maki M. Identification of the P-body components PATL1 as a novel ALG2-interacting protein by in silico and Far-Western screening of proline-rich proteins. *J Biochem*, in press.
- (7) 有海康雄、加藤宣之「HCV による肝発癌機構」*日本臨床* (日本臨床社) 増刊号 新時代のウイルス性肝炎学 -基礎・臨床研究の進歩-69 巻、増刊 4 号、64-68、2011
- ## 2. 学会発表
- (1) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Wakita T, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (2) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV production requires the PML tumor suppressor protein. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (3) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Identification of a host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (4) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and HCV strains are required for the objective evaluation of anti-HCV reagents. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (5) Ikeda M, Takeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Geranylgeranyl transferase II is essential for HCV RNA replication. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, U. S. A.
- (6) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles in cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011, Sapporo, Japan, 2011 Sep.
- (7) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of HCV JFH-1 reporter assay systems using different human hepatoma cell lines. Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2011, Sapporo, Japan, 2011 Sep.
- (8) 大杉 桂奈江、有海 康雄、人見 清隆、柴

- 田 秀樹、牧 正敏. ALG-2 と P-body 構成因子 PATL1 の細胞内局在に与える HCV 感染の影響. 第 34 回日本分子生物学学会年会, 2011 年 12 月 13-16 日, 横浜
- (9) 武田 緑、池田 正徳、有海 康雄、脇田 隆字、加藤 宣之. 異なるヒト肝細胞株 (HuH-7 と Li23) を用いた HCV 感染レポーターアッセイ系の開発. 第 26 回中国四国ウイルス研究会、徳島、2011 年 6 月
- (10) 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康雄、加藤 宣之. 抗 HCV 活性の客観的な評価には複数の細胞株と複数の HCV 株由来のアッセイ系が必要である. 第 26 回中国四国ウイルス研究会、徳島、2011 年 6 月
- (11) 瀬島 寛恵、森 京子、有海 康雄、池田 正徳、加藤 宣之. 長期にわたる C 型肝炎ウイルスのゲノム複製によって発現が変動した遺伝子群の同定. 第 26 回中国四国ウイルス研究会、徳島、2011 年 6 月
- (12) 上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康雄、加藤 宣之. 抗 HCV 剤の活性評価には複数の細胞株由来のアッセイ系が必要である. 第 47 回日本肝臓学会総会、東京、2011 年 6 月
- (13) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. A host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, 2011. Oct
- (14) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles in cell-based long-term HCV RNA replication. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Nagoya, 2011. Oct

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

HCVコア領域の変異がウイルスのライフサイクルに与える影響の解析

研究分担者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨： C型肝炎ウイルス(HCV)に感染している患者では高頻度に肝癌を発生することが知られている。近年、HCVコア領域のアミノ酸変異が肝発癌に関与するとの報告がなされた。そこで、HCVが関与する肝発癌機序の解明のため、これらのコア領域のアミノ酸変異がHCVライフサイクルに与える影響について検討した。遺伝子型1b株と2a株のキメラウイルスを用いて検討したところ、コア領域70番目のアミノ酸がアルギニンからグルタミンに変化することで細胞内での感染性ウイルス粒子の形成効率が低下していた。その結果、細胞内へのHCV蛋白質の蓄積を認めるようになり、それが肝発癌に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は成人感染でも高率に慢性化し、慢性肝炎から肝硬変を経て肝癌を発生する。我が国の肝癌の約80%がHCV感染由来であり、肝癌の発生を減少させるためにはHCV感染の制御が必須である。HCVが関与する肝癌の発生には、長期にわたる感染とそれに伴う慢性炎症が重要であると考えられているが、その分子生物学的機序は未だ明らかではない。

近年、HCVの遺伝子型1b株に感染している患者で、コア領域の70番目(aa70)のアルギニン(R)からグルタミン(Q)への変異と、91番目(aa91)のロイシン(L)からメチオニン(M)への変異が、インターフェロン(IFN)の感受性や肝発癌に関与しているとの報告がなされた。しかしこれらの報告は臨床的な知見に基づいており、これらの変異がウイルスの増殖に与える影響は解明されていない。近年、JFH-1株を用いたHCVの感染増殖系が開発され、培養細胞でこのウイルスのライフサイクルの観察が可能となった。この系ではHCVの感染や複製の評価が培養細胞で可能であるが、JFH-1株は遺伝子型2aであり、臨床的に遺伝子型1b株の検討

で得られた結果を評価する場合には遺伝子型の違いが問題となる。そこで本研究では、遺伝子型1b株のコア領域を含む構造領域と、遺伝子型2a株であるJFH-1株の非構造領域を持つキメラウイルスを構築し、これらコア領域の変異がHCVの細胞内での増殖に与える影響を検討した。

B. 研究方法

1. HCV遺伝子型1b株と2a株のキメラウイルスの構築

HCV遺伝子型1b株(TH株)のコア領域からNS2領域途中までの遺伝子配列を、JFH-1株の該当部分と置換することにより、HCV遺伝子型1b株/2a株キメラウイルスのコンストラクトを作製した。このキメラウイルスのコア領域は遺伝子型1bのTH株由来となる。このTH株のコア領域のaa70、aa91のアミノ酸はRMであったが、変異を導入することによりRL、QM、QLのアミノ酸を持つコンストラクトも作製した。

2. コア領域アミノ酸変異を持つキメラウイルスの培養細胞内での増殖能の評価

これらの作製したコンストラクトからHCV全

長のRNAを合成し、Huh-7.5.1細胞に導入することによりウイルスの増殖を評価した。増殖の評価は、培養上清と細胞内のコア抗原量を測定することにより行った。

さらに、HCVのレセプターであるCD81が発現していないHuh7-25細胞に、これらキメラウイルスのRNAを導入することで詳細な検討を行った。この細胞ではHCVゲノムの複製と感染性ウイルス粒子の生成は可能であるが、生成されたウイルス粒子はこの細胞に再感染することができない。従って、この細胞にHCV全長RNAを導入すると、複製から粒子形成、分泌への一連の過程が一方通行で起こる。この状態でそれぞれの過程の効率を示すパラメータを比較することによりHCVライフサイクル各過程の効率の評価が可能である。すなわち、細胞内でのコア抗原量で、キメラウイルスの細胞内での複製を、コア抗原量に対する感染力価の比(Specific Infectivity)により感染性ウイルス粒子の形成効率を評価した。

3. コア領域アミノ酸変異を持つキメラウイルスの感染と細胞周期の解析

これらコア領域のアミノ酸変異を持つキメラウイルスの培養細胞への感染を評価するために、キメラウイルス全長RNAを導入後、経過を追って細胞を回収固定し、抗HCV抗体で染色後、HCV感染細胞数と細胞内のHCV蛋白質量をFACSで評価した。さらにキメラウイルスの感染が細胞周期に与える影響を評価するため、キメラウイルス全長RNAを導入した細胞にEdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を添加し培養をおこなった。その後、HCV蛋白質を抗HCV抗体で、DNAを7-AADでそれぞれ染色し、FACSによりHCV感染・非感染細胞それぞれにおける細胞周期の分布を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した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。

各種組換えDNAを用いた感染性ウイルスの作製および感染実験は、大臣確認申請を行い承認を受けた。

C. 研究結果

1. コア領域アミノ酸変異を持つキメラウイルスの培養細胞内での増殖能の評価

コア領域アミノ酸変異を持つキメラウイルスのRNAをHuh-7.5.1細胞に導入し、コア抗原量を測定した。その結果、aa70がRの株の培養上清中コア抗原量は、aa70がQの株の約10倍高値であることが明らかになった。また、培養細胞内のコア抗原量には大きな差を認めなかった。そこでHuh7-25細胞を用いて詳細に検討したところ、細胞内のコア抗原量はaa70がQの株で高くこれらの変異がキメラウイルスの細胞内での複製に関与していると考えられた。また感染力価を比較したところ、aa70がQの株では培養細胞内、上清中とも感染力価が低く、感染性ウイルス粒子生成効率を示すSpecific Infectivity値も低値であった。

2. コア領域アミノ酸変異を持つキメラウイルスの感染と細胞周期の解析

次に、これらコア領域の変異を持ったキメラウイルスの培養細胞での感染の広がりをFACSを用いて解析した。その結果、aa70がRのキメラウイルスではHCV陽性細胞の比率や、細胞内でのHCV蛋白質量を表すMFI値は、遺伝子導入後3日目まで大きな変化を認めなかった。しかし、aa70がQのキメラウイルスでは遺伝子導入後、経過とともに徐々にHCV陽性細胞の比率が低下していたが、MFI値は逆に徐々に高くなっていった。

さらに、これらのコア領域アミノ酸変異を持ったキメラウイルスの感染が細胞周期に与える影響も解析した。その結果、キメラウイルスの感染細胞は非感染細胞に比べS期の細胞の割合が減少し、G0/G1期、G2/M期の細胞の割合が増加していた。aa70がQのキメラウイルス

では、Rのものと比較してさらにS期の細胞が現象しており、G0/G1期、G2/M期の細胞が多くなっていた。

D. 考察

HCVによる肝発癌に関与しているといわれているコア領域アミノ酸変異が、HCVのライフサイクルに与える影響を、HCV遺伝子型1b/2aのキメラウイルスを用いて明らかにした。コア領域のaa70、aa91の変異導入により、細胞内のコア抗原量には明らかな差を認めなかったが、70番の変異株であるQM、QLではRL、RMの株と比較して培養上清中のコア抗原量が10分の1に低下していた。また、Huh7-25細胞を用いた解析でもaa70の変異株であるQM、QLではRL、RMと比較すると、細胞内と上清中の感染力価が低く、Specific Infectivity値も低いことから、aa70の変異株では感染性ウイルス粒子の生成効率が著しく低下していると考えられ、これが培養上清中のコア抗原量の低下に寄与していると考えられた。

これらのキメラウイルスの感染細胞数の推移をFACSを用いて解析したところ、aa70変異株であるQM、QLではHCV陽性細胞の存在比は経時的に低下したが、HCV蛋白質の染色シグナルは増加しており、HCV蛋白質が細胞内に蓄積していると考えられた。さらに、これらのキメラウイルスの感染細胞で細胞周期の比率を検討したところ、aa70変異株であるQM、QLの感染細胞では、RL、RMの感染細胞と比較しG0/G1期、G2/M期の細胞が多くなっており、より多くの細胞で細胞周期が停止していることが明らかとなり、この細胞周期に与える影響は細胞内へのHCV蛋白質の蓄積と共にHCV感染に伴う肝発癌に関与していると考えられた。

E. 結論

HCVコア領域のaa70の変異により細胞内での感染性ウイルス粒子の生成能が低下し、その結果としてHCV蛋白質が細胞内に蓄積すること

が明らかになった。この細胞内へのHCV蛋白質の蓄積が肝発癌に関与している可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. *J Virol*. 86(4): 2143-2152, 2012.

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*, 286: 37264-37273, 2011.

3) Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*, 54: 425-433, 2011.

4) 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*, 410: 404-409, 2011.

2. 学会発表

- 1) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 2) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara- Sugano M, Wakita T, Kato T. Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, USA.
- 3) Moriyama M, Yokokawa H, Akazawa D, Nishimura K, Nakamura N, Mochizuki H, Kato T, Ishii K, Wakita T. Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, WA, USA.
- 4) Yokokawa H, Akazawa D, Moriyama M, Nakamura N, Kato T, Ishii T, Wakita T. Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique. 18th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. September 8-12, 2011. Seattle, WA, USA.
- 5) Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Nomoto A, Wakita T, Kato T. Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 6) Murayama A, Sugiyama N, Yoshimura S, Ishihara- Sugano M, Wakita T, Kato T. HuH-7 subclone that supports high HCV production due to high virus assembly. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 7) Watanabe N, Murayama M, Date T, Kato T, Aizaki H, Wakita T. Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XV International Congress of Virology. September 11-16, 2011. Sapporo, Japan.
- 8) Matsumura T, Kato T, Tasaka-Fujita M, Murayama A, Masaki T, Wakita T, Imawari M. 25-hydroxy- vitamin D inhibits hepatitis C virus replication and production of the infectious viruses. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. November 4-8, 2011. San Francisco, USA.
- 9) 加藤孝宣、村山麻子、政木隆博、相崎英樹、脇田隆字. 国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価. 第47回 日本肝臓学会総会、2011年6月、東京.
- 10) 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆字. HCV JFH-1キメラ株を用いたNS5A阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価. シンポジウム10: C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第

15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡。

11) 松村卓哉、加藤孝宣、井廻道夫。Vitamin D とその代謝産物の抗HCV作用の検討。シンポジウム10：C型肝炎ウイルスの性状と治療の新たな展開 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡。

12) 加藤孝宣、椎名正明、脇田隆字。HCV JFH-1株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析。パネルディスカッション4：肝疾患動物モデルとTranslational Research 第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡。

13) 村山麻子、三代俊治、脇田隆字、加藤孝宣。C型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良いHuH-7

細胞サブクローンの分離と同定。第15回日本肝臓学会大会、2010年10月、福岡。

14) 横川寛、森山正樹、赤澤大輔、中村紀子、加藤孝宣、石井孝司、脇田隆字。クロマトグラフィー法を用いたC型肝炎ウイルス粒子の精製法の構築。第34回日本分子生物学会年会、2011年12月、横浜。

G. 知的所有権の出願・登録状況

脇田隆字、村山麻子、加藤孝宣。培養細胞で感染性ウイルス粒子産生可能なC型肝炎ウイルスJ6CF株変異体

2011年5月出願済み

出願番号：2011-122795

C 型肝炎による脂質代謝と肝発癌

分担研究者： 小池和彦 東京大学医学部（病）・教授

研究要旨： これまで、C型肝炎ウイルス(HCV)コア蛋白が肝脂肪化の後に肝発癌を引き起こすことを示してきた。HCV トランスジェニックマウス・モデルおよび C型肝炎患者の肝臓に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸などの一価不飽和脂肪酸（モノエン酸）が増加している。C型肝炎における肝脂肪化、一価不飽和脂肪酸増加の機序とその意義を知るために、コア蛋白発現 HepG2 細胞と JFH-1 増殖 Huh7 細胞を用いて分析を行った。不飽和脂肪酸の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進していた。JFH-1 増殖 Huh-7 細胞にても中性脂肪の増加が認められた。HCV によるミトコンドリア電子伝達系複合体 I (NADH dehydrogenase)の機能障害が、ROS 産生、脂質代謝異常を含む C型肝炎の肝病態において中心的な役割を演じている事が示された。更に、C型肝炎において増加している C18 モノエン酸であるオレイン酸の肝発癌における意義を探るため、肝発癌モデルマウスである PIK3CA トランスジェニックマウス (PI3K の catalytic subunit である p110 α をアルブミンプロモーターの制御に発現させたもの) を用いて解析を行なった。PIK3CA トランスジェニックマウス肝ではオレイン酸を中心とする脂質増加を経て肝腫瘍を発生した。オレイン酸は不死化肝細胞の造腫瘍性を増強した。C型肝炎ウイルスがもたらす脂質代謝異常は、肝における腫瘍形成を増強する作用をもたらすものと考えられた。

A. 研究目的

ヒト慢性 C型肝炎における肝発癌の機序はまだ不明である。チンパンジー以外に C型肝炎の疾患モデルがないことも、解明の妨げとなっている。我々は HCV のコア蛋白がトランスジェニックマウスにおいて肝細胞を誘発することを確認し、このマウスモデルを用いて C型肝炎における病態の解明、肝発癌機序の解明を行ってきた。また、マウスモデルで得られた知見をもとにして、ヒト C型肝炎患者においても検討を行ってきた。

C型肝炎動物モデルであるコア遺伝子トランスジェニックマウスにおいては、明らかな炎症の不在下に肝脂肪化 (steatosis) が発生し、その後肝細胞癌 (肝癌) が発生している。また、このマウスモデルおよび C型肝炎患者の肝に蓄積する脂肪には特徴があり、オレイン酸、cis-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることが明らかになっている。今回、我々は、この肝脂肪化および一価不飽和脂肪酸増加の機序と意義を知るために、培養細胞を用いて検討を行った。また、増加している脂質の

生物学的作用をマウス、培養細胞を用いて検討した。

B. 方法

コア遺伝子を導入した HepG2 細胞である Hep39 細胞と対照である Hepswx 細胞を用いて、以下のような解析を行なった。また、JFH-1 増殖 Huh7 細胞も同様に用いて検討を行った。脱脂肪化ウシアルブミンを含むメEDIUMに溶解した脂肪酸を、各種条件下で細胞へ曝露した後に細胞を回収し、脂肪酸を抽出した。脂肪酸はガスクロマトグラフィによって解析した。eicosatetraynoic acid、eicosatetraynoic acid (EPA)、arachidonic acid (AA)、ピルビン酸を適宜添加して培養を行なった。

肝発癌モデルマウスである PIK3CA トランスジェニックマウス(PI3Kの catalytic subunit である p110 α をアルブミンプロモーターの制御に発現させたもの)を用いて解析を行なった。

C. 結果

(1) コア蛋白発現 HepG2 細胞では、対照細胞に比して中性脂肪が有意に増加していた。

(2) 一価不飽和脂肪酸(オレイン酸、cis-ヴァクセン酸、パルミトオレイン酸)の増加をもたらす desaturase 活性はコア蛋白発現細胞において著明な亢進を示していたが、 δ -9、 δ -6、 δ -5 desaturase のいずれもが亢進しているため、見かけ上は最下流に存在する 5, 8, 11-eicosatrienoic acid (20 : 3(n-9))不飽和脂肪酸が増加していた。なお、 δ -6 活性の上昇は HepG2 細胞において内因性に存在することが明らかになった。

(3) δ -6 desaturase の特異的な阻害剤である eicosatetraynoic acid(ETYA)によってコア

蛋白発現細胞のみで 18 : 1(n-9)が著増した。この結果から、コア蛋白発現 HepG2 細胞においても δ -9 desaturase 活性が著増していることが示唆された。

(4) 多価不飽和脂肪酸である EPA や AA によって一価不飽和脂肪酸は、コア蛋白発現細胞と対照細胞のいずれにおいても減少したが、活性酸素種(ROS, reactive oxygen species)はいずれの細胞でも減少しなかった。

(5) コア蛋白発現 HepG2 細胞では、対照細胞に比して脂質代謝遺伝子の発現制御に重要な SREBP-1c、fatty acid synthase (FAS)、 δ -9 desaturase の発現が増加していたが、SREBP-1b、SREBP-2 の発現は増加していなかった。

(6) JFH-1 増殖 Huh7 細胞においても感染4日目の時点で細胞内に中性脂肪が有意に増加していることが認められた。

(7) PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase) の catalytic subunit である p110 α をアルブミンプロモーターの制御に発現させた PIK3CA トランスジェニックマウス肝においては PI3K/AKT 経路が活性化されていた。このマウスは肝重量の増加を示し、組織学的検討によって肝脂肪化を呈することが示された。

(8) PIK3CA トランスジェニックマウスでは PPAR γ 、aP2 遺伝子発現が活性化しており中性脂肪の合成が増加して肝脂肪化に至ると考えられた。蓄積した脂肪にはオレイン酸(C18:1)の著明な増加が認められた。

(9) このマウスでは肝線維化は生じないが、12か月齢以降に肝腫瘍を高率に発生した。この肝腫瘍においては Pten、Arid5b、Xpo4、Dlc1 などの癌抑制遺伝子の発現が低下していた。

(10) 蓄積したオレイン酸と肝腫瘍発生の関

連性を探るため、不死化肝細胞を用いた検討を行なったところ、オレイン酸は Pten、Arid5b、Xpo4、Dlc1 などの癌抑制遺伝子の発現を低下させること、不死化肝細胞の腫瘍形性能を増強することが明らかになった。すなわち、肝における一価不飽和脂肪酸、特にオレイン酸の増加は、肝腫瘍発生において有利に作用し、肝癌発生に関与していることが示唆された。

D. 考察

HCV 感染症における肝発癌の機序については、まだ明らかでない点が多い。HCV コア蛋白は動物モデルにおいて肝癌を発生させることが明らかになっており、ヒト C 型肝炎における肝発癌で重要な役割を果たしていることが示されてきている。この肝発癌の過程において、肝脂肪化が炎症不在下に発生し、肝発癌への関わりが想定されている。

C 型肝炎における肝脂肪化の機序については、我々のこれまでの検討によって、MTP 活性低下による肝からの VLDL 分泌の低下、ミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化の阻害等が明らかになってきている。C 型肝炎における肝脂肪化では、また、蓄積される脂肪には特徴があり、オレイン酸、cis-ヴァクセン酸といった一価不飽和脂肪酸が増加していることも判明している。しかし、この一価不飽和脂肪酸増加の機序および意義については明らかではない。

今回の我々の検討によって、一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による desaturase 活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積にあることが明らかになった。また、SREBP-1c、fatty acid synthase (FAS)、 δ -9 デサチュラーゼといった中性脂肪代謝関連遺伝子、転写因子の発現がコ

ア蛋白によって直接あるいは間接的に亢進されること、NADH の減少によって、それが改善されることも重要な所見である。

更に、C 型肝炎において増加している C18 モノエン酸であるオレイン酸の肝発癌における意義を探るため、肝発癌モデルマウスである PIK3CA トランスジェニックマウス (PI3K の catalytic subunit である p110 α をアルブミンプロモーターの制御に発現させたもの) を用いて解析を行なった。PIK3CA トランスジェニックマウス肝ではオレイン酸を中心とする脂質増加を経て肝腫瘍を発生した。オレイン酸は不死化肝細胞の造腫瘍性を増強した。C 型肝炎ウイルスがもたらす脂質代謝異常は、肝における腫瘍形成を増強する作用をもたらすものと考えられた。

E. 結論

一価不飽和脂肪酸の増加はコア蛋白による desaturase 活性の増加によること、その活性増加をもたらすのは肝細胞内への NADH 蓄積にあることが明らかになった。肝における一価不飽和脂肪酸、特にオレイン酸の増加は、肝腫瘍発生において有利に作用し、肝癌発生に関与していることが示唆された。C 型肝炎の病態解明と病変進行の予防、病態改善薬の開発に向けて重要な発見といえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yoshimi A, Yamamoto G, Goto T, Koike K, Kurokawa M. Hepatocellular carcinoma in

- cirrhotic liver with graft-versus-host disease. *Ann Hematol* 2012 Feb 9. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22314841.
- 2) Inoue H, Yamazaki S, Shimizu M, Uozaki H, Goto T, Ohnishi S, Koike K. Liver injury induced by the Japanese herbal drug kamishoyosan. *Gastroenterol Hepatol (NY)* 2011;7(10):692-695. PubMed PMID: 22298964.
- 3) Goto E, Masuzaki R, Tateishi R, Kondo Y, Imamura J, Goto T, Ikeda H, Akahane M, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Value of post-vascular phase (Kupffer imaging) by contrast-enhanced ultrasonography using Sonazoid in the detection of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2011 Dec 27. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22200940.
- 4) Shiina S, Tateishi R, Arano T, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Sato T, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Yoshida H, Omata M, Koike K. Radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: 10-year outcome and prognostic factors. *Am J Gastroenterol* 2011 Dec 13. doi: 10.1038/ajg.2011.425. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22158026.
- 5) Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Shiina S, Yamashiki N, Mikami S, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Kondo Y, Goto T, Inoo S, Ohtomo K, Omata M, Yoshida H, Koike K. Characteristics of hepatocellular carcinoma nodules newly detected by computed tomography during arteriography and arterial portography: preliminary report of a randomized controlled trial. *Hepatol Int* 2011 Aug 31. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22020826.
- 6) Enooku K, Tateishi R, Kanai F, Kondo Y, Masuzaki R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Evaluation of molecular targeted cancer drug by changes in tumor marker doubling times. *J Gastroenterol*. 2011 Sep 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21935635.
- 7) Takata A, Otsuka M, Kogiso T, Kojima K, Yoshikawa T, Tateishi R, Kato N, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Direct differentiation of hepatic cells from human induced pluripotent stem cells using a limited number of cytokines. *Hepatol Int* 2011 Feb 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21484132.
- 8) Arano T, Nakagawa H, Tateishi R, Ikeda H, Uchino K, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Serum level of adiponectin and the risk of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2010 Dec 17. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21170963.
- 9) 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.

- 10) 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.
- 11) 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. *J Hepatol* 2011;55(6):1400-1408.
- 12) Ishizaka N, Hongo M, Sakamoto A, Saito K, Furuta K, Koike K. Liver lipid content is reduced in rat given 7-day administration of angiotensin II. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2011;12(4):462-468.
- 13) Bertot LC, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Mortality and complication rates of percutaneous ablative techniques for the treatment of liver tumors: a systematic review. *Eur Radiol* 2011;21(12):2584-2596.
- 14) 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.
- 15) Fujinaga H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K. Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species. *Oncology* 2011;81 Suppl 1:11-17.
- 16) 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. (2010IF 4.1)
- 17) 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.
- 18) Otsuka M, Takata A, Yoshikawa T, Kojima K, Kishikawa T, Shibata C, Takekawa M, Yoshida H, Omata M, Koike K. Receptor for Activated Protein Kinase C: Requirement for Efficient MicroRNA Function and Reduced Expression in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*.

- 2011;6(9):e24359. Epub 2011 Sep 15.
PubMed PMID: 21935400.
- 19) 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.
- 20) Takata A, Otsuka M, Kojima K, Yoshikawa T, Kishikawa T, Yoshida H, Koike K. MicroRNA-22 and microRNA-140 suppress NF- κ B activity by regulating the expression of NF- κ B coactivators. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;411(4):826-831.
- 21) Wakita T, Suzuki T, Evans MJ, Shimotohno K, Chayama K, Matsuura Y, Hijikata M, Moriishi K, Seya T, Enomoto N, Koike K, Kato N, Kanto T, Hotta H. Will There Be an HCV Meeting in 2020? Summary of the 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. *Gastroenterology* 2011 Jul;141(1):e1-5.
- 22) 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.
- 23) 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)
- 24) 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.
- 25) Koshiyama A, Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Yazawa I, Imai K. Liquid chromatographic separation of proteins derivatized with a fluorogenic reagent at cysteinyl residues on a non-porous column for differential proteomics analysis. *J Chromatogr A* 2011;1218(22):3447-3452.
- 26) Kumar V, Kato N, Urabe Y, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otuska 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.
- 27) Nakagawa H, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Masuzaki R, Tateishi R,

- Yoshida H, Watanabe N, Tejima K, Kume Y, Iwai T, Suzuki A, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Omata M, Igarashi K, Aoki J, Koike K, Yatomi Y. Autotaxin as a novel serum marker of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2011;412(13-14):1201-1206.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arii S, Imai Y, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Mori T, Kawata S, Uto H, Takami S, Sumida Y, Takamura T, Kawanaka M, Okanoue T; The Japan NASH Study Group, The Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9(5):428-433. (2009; 5:642)
- 31) Koike K, Miyoshi H, Yotsyanagi H, Moriya K. Effect of treatment with polyunsaturated fatty acids on HCV-or diet-induced fatty liver. *J Hepatol* 2011;54:1326.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1.特許取得
- 「肝細胞癌発生予測因子としての血中 ADAMTS13」知的財産管理番号 12B10Y001-1 出願日 平成 22 年 11 月 5 日 発明者 池田均、矢富裕、建石良介、小池和彦、小野智子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表
(2011年4月1日～2012年3月31日迄)

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, <u>Hotta H.</u>	Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway.	J Virol	85 (17)	8556-8568	2011
Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, <u>Hotta H.</u> , Sada K.	Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways.	Microbiol Immunol	55 (11)	774-782	2011
El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, Deng L, Kawata S, <u>Hotta H.</u>	Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/r ibavirin combination therapy.	Microbiol Immunol	55(6)	418-426	2011
El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, <u>Hotta H.</u>	Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy.	Intervirology	55(1)	1-11	2012
Kim SR, Saito J, Imoto S, Komaki T, Nagata Y, Nakajima T, Ando K, Fukuda K, Otono Y, Kim KI, Ohtani A, Sugimoto K, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, <u>Hotta H.</u> , Maekawa Y, Hayashi Y, Kudo M	Correlation between insulin resistance and outcome of pegylated interferon and ribavirin therapy, hepatic steatosis, hepatic fibrosis in chronic hepatitis C-1b and high viral load.	Digestion	84 Suppl 1	5-9	2011
Kim SR, Saito J, Imoto S, Komaki T,	Double-filtration plasmapheresis plus	Digestion	84 Suppl	10-16	2011

Nagata Y, Kim KI, Sasase N, Kimura N, Sasatani K, Konishi E, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, El-Shamy A, Tanaka Y, Sugano M, Sakashita M, Nakamura A, Tsuchida S, Makino T, Kawada T, Nakajima T, Morikawa T, Muramatsu A, Kasugai H, <u>Hotta H</u> , Kudo M	interferon- β for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy.		1		
Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, <u>Hotta H</u> .	A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization.	J Med Virol	84(2)	229-234	2012
Shoji I, Deng L, <u>Hotta H</u> .	Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders.	Front Microbiol	2:A27 8	1-5	2012
Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, <u>Hotta H</u> .	Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production.	Microbes Infect	14(1)	69-78	2012
El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, <u>Hotta H</u> .	Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy.	PLoS ONE	7(2)	e30513	2012
Wakita T, Suzuki T, Evans MJ, Shimotohno K, Chayama K, Matsuura Y, Hijikata M, <u>Moriishi</u>	Will there be an HCV Meeting in 2020? Summary of the 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses.	Gastroenterology	141 (1)	e1-5	2011

K, <u>Seya T</u> , Enomoto N, <u>Koike K</u> , Kato N, Kanto T, <u>Hotta H</u> .					
Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Ide YH, Deng L, Shoji I, Tanaka Y, Hasegawa Y, Ota M, <u>Hotta H</u> .	Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load.	J Gastroenterol		In press	2012
勝二郁夫, El-ShamyAhmed, <u>堀田博</u>	NS5A-IRRDR 変異数.	医学のあゆみ	239 (12-13)	1208-1211	2011
勝二郁夫, El-ShamyAhmed, <u>堀田博</u>	C型肝炎ウイルス NS5A 領域の ISDR・IRRDR とインターフェロン治療効果予測.	肝胆膵	63(6)	1063-1069	2011
Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, Ikeda S, Hirayama A, Yamamoto T, Yoshida H, Otsuka M, Tsuji S, Yatomi Y, Sakuragawa T, Watanabe H, Nihei K, <u>Saito T</u> , Kawata S, Suzuki H, Tomita M, Suematsu M.	Serum metabolomics reveals γ -glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease.	J Hepatol	55(4)	896-905	2011
<u>Saito T</u> , Okumoto K, Haga H, Nishise Y, Ishii R, Sato C, Watanabe H, Okada A, Ikeda M, Togashi H, Ishikawa T, Terai S, Sakaida I, Kawata S.	Potential therapeutic application of intravenous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis.	Stem Cells Dev	20(9)	1503-1510	2011
Ishii R, Togashi H, Iwaba A, Sato C, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Okada A, Takahashi K, <u>Saito T</u> , Kawata S.	(99m)Tc-GSA SPECT analysis was clinically useful to evaluate the effect of interferon in a patient with interferon non-responsive chronic hepatitis C.	Ann Nucl Med	25(7)	520-523	2011
Ito J, <u>Saito T</u> , Iwaba A, Suzuki Y, Sanjo M, Ishii R, Sato C,	A case of monocular blindness as the initial presentation of	Clin J Gastroenterol	4	273-277	2011

Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S.	hepatocellular carcinoma with skull metastasis.				
渡辺久剛, 齋藤貴史, 富田恭子, 佐藤智佳子, 石井里佳, 芳賀弘明, 奥本和夫, 西瀬雄子, 河田純男	B型肝炎ウイルスジェノタイプ B 型感染高浸淫地区における感染実態の変遷	肝臓	52 (11)	753-755	2011
Endo Y, Marusawa H, Chiba T.	Involvement of activation-induced cytidine deaminase in the development of colitis-associated colorectal cancers.	J Gastroenterol	46	6-1	2011
Nasu A, Marusawa H, Ueda Y, Nishijima N, Takahashi K, Osaki Y, Yamashita Y, Inokuma T, Tamada T, Fujiwara T, Sato F, Shimizu K, Chiba T.	Genetic heterogeneity of hepatitis C virus in association with antiviral therapy determined by ultra-deep sequencing.	PLoS ONE	6	e24907	2011
Morita S, Matsumoto Y, Okuyama S, Ono K, Kitamura Y, Tomori A, Oyama T, Amano Y, Kinoshita Y, Chiba T, Marusawa H.	Bile acid-induced expression of activation-induced cytidine deaminase during the development of Barrett's oesophageal adenocarcinoma.	Carcinogenesis	32	1706-1712	2011
Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, Chiba T.	Excessive activity of APOBEC2 contributes to liver and lung tumorigenesis.	Int J Cancer	130	1294-1301	2012
Takai A, Marusawa H, Minaki Y, Watanabe T, Nakase H, Tsujimoto G, Chiba T.	Targeting activation-induced cytidine deaminase prevents colon cancer.	Oncogene		In press	2012
Taura N, Fukushima N, Yatsunami H, Takami Y, Seike M, Watanabe H, Mizuta	The incidence of hepatocellular carcinoma associated with	Med Sci Monit	17	7-11	2011

T, <u>Sasaki Y</u> , Nagata K, Tabara A, Komorizono Y, Taketomi A, Matsumoto S, Tamai T, Muro T, Nakao K, Fukuizumi K, Maeshiro T, Inoue O and Sata M.	hepatitis C infection decreased in Kyushu area.				
Tateyama M, Yatsushashi H, Taura N, Motoyoshi Y, Nagaoka S, Yanagi K, Abiru S, Komori A, Migita K, Nakamura M, Nagahama H, <u>Sasaki Y</u> , Miyakawa Y and Ishibashi H.	Alpha-fetoprotein above normal levels as a risk factor for the development of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C virus.	J Gastroenterol	46	92-100	2011
Watanabe T, Ishihara Ko, Hirose A, Watanabe S, Hino S, Ojima H, Kanai Y, <u>Sasaki Y</u> , and Nakao M.	Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in the human tumor necrosis factor /lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells.	Mol Cell Biol		In press	2012
Wen X, Abe T, Kukihara H, Tagawa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, <u>Moriishi K</u> , Matsuura Y.	Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules.	PLoS One	6	e15967	2011
Tagawa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, <u>Koike K</u> , <u>Moriishi K</u> , Matsuura Y.	Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus.	J Virol	85	13185-13194	2011
Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Tagawa S, <u>Moriishi K</u> , Matsuura Y.	Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus.	Virology	412	211-219	2011