

肝炎等克服緊急対策研究事業：課題番号 H21-肝炎一般-007

研究課題：血小板低値例へのインターフェロン治療法の確立を目指した基礎および臨床的研究

予定期間：H21年度からH23年度まで（最終年度）

研究代表者：西口 修平（兵庫医科大学）

### 研究班

臨床研究 (13)

- |                          |                        |
|--------------------------|------------------------|
| 西口修平 (兵庫医科大学 肝胆臓科)       | 有井滋樹 (東京医科歯科 肝胆臓・総合外科) |
| 山本和秀 (岡山大学 消化器・肝胆臓内科)    | 上田佳秀 (京都大学 消化器内科)      |
| 工藤正俊 (近畿大学 消化器内科)        | 内村直尚 (久留米大学 精神神経医学)    |
| 日野啓輔 (川崎医科大学 肝胆臓内科学)     |                        |
| 河田則文 (大阪市立大学 肝胆臓病態内科)    |                        |
| 八橋弘 (国立病院機構長崎医療センター)     | 基礎研究 (4)               |
| 福井博 (奈良県立医科大学 消化器内科)     | 富山佳昭 (大阪大学 輸血部)        |
| 井出達也 (久留米大学 消化器内科部門)     | 筒井ひろ子 (兵庫医科大学 病原微生物学)  |
| 古庄 善浩 (九州大学 感染環境医学)      | 池田一雄 (大阪市立大学 機能細胞形態学)  |
| 柏木徹 (兵庫医科大学 核医学・PETセンター) | 渡辺恭良 (独立行政法人理化学研究所)    |

### 本研究班の目的と研究体制

血小板低値例へのIFN治療法の確立  
血小板低値対策(脾摘やPSE)の是非



#### 主な個別研究テーマ

- 脾摘とPSEの安全性と有効性の検討
- 脾摘による脾臓抗原呈递細胞の産生抑制の存在
- 脾摘による脾臓抗原呈递細胞の産生抑制のメカニズムの解明
- 脾摘による脾臓抗原呈递細胞の産生抑制のメカニズムの解明 (Micro-Dose試験)
- 脾摘による脾臓抗原呈递細胞の産生抑制のメカニズムの解明 (長期投与)
- 脾摘による脾臓抗原呈递細胞の産生抑制のメカニズムの解明 (診断法の確立)

解決すべき問題点

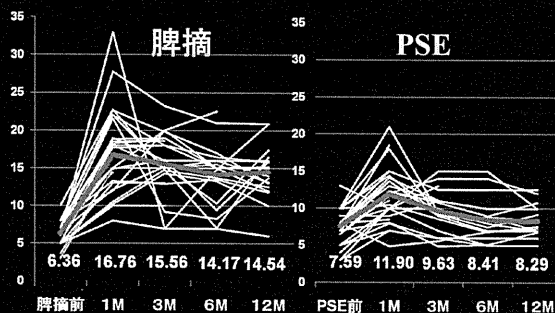
### 実態アンケート調査

対象：肝臓学会西部会・東部会評議員・肝癌研究会幹事  
日本IVR学会評議員が所属する肝臓専門施設

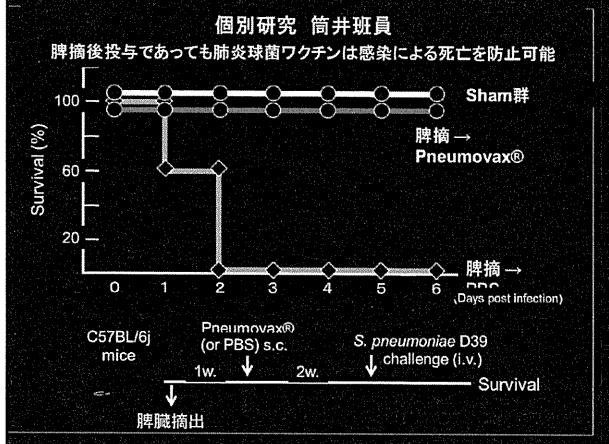
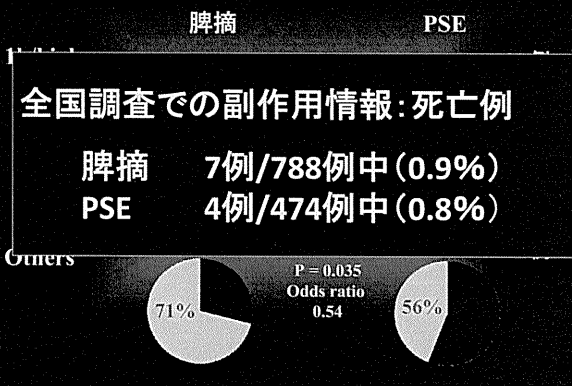
	送付数	回答数	
		第一回	第二回
内科系	336施設	107施設	114施設
外科系	46施設	24施設	26施設
放射線科系	31施設	7施設	7施設
計	413施設	138施設	147施設

個別調査(第三回): 死亡例などを対象とした詳細な調査

### 処置後の血小板数の推移



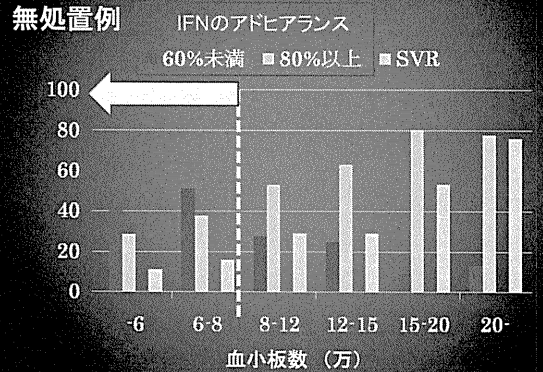
### アンケートによる全国調査: 脾摘とPSEの比較



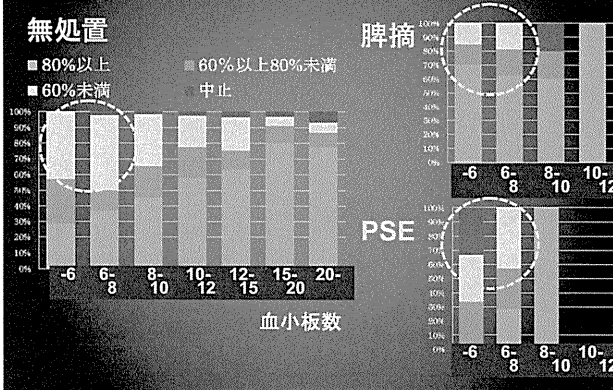
### 班員による血小板低値例に対するIFN治療に関する臨床調査研究（後ろ向き研究）

九州大学	157症例
久留米大学	139症例
岡山大学	46症例
京都大学	110症例（全例肝移植）
近畿大学	46症例
川崎医科大学	18症例
大阪市立大学	208症例
奈良県立医科大学	14症例
福井県済生会病院	10症例
国立病院機構長崎医療センター	85症例
兵庫医科大学	530症例（移植後1例）
計	1363症例
内SVR判定可能症例	1291症例
肝移植除くSVR判定可能症例	1181症例

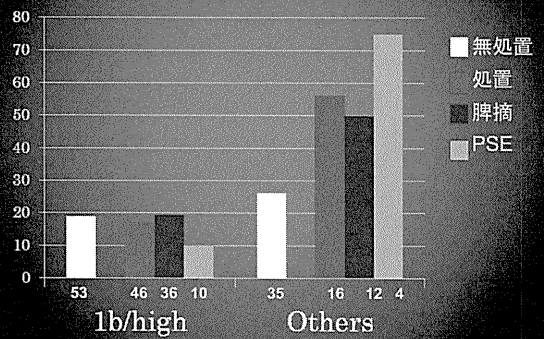
### 血小板数別のアドヒアランスと治療効果



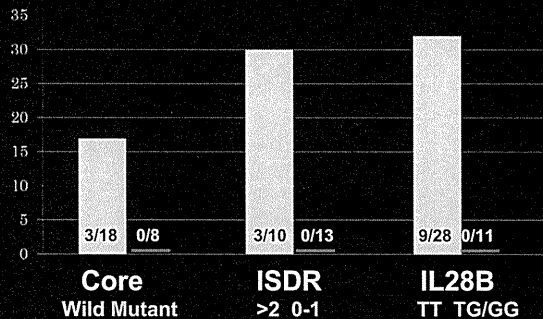
### 血小板数別の治療アドヒアランス:処置の有効性



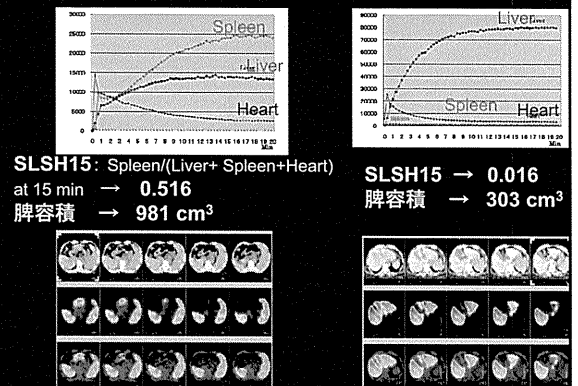
### SVR率への脾摘・PSEの影響(血小板8万以下)



### 1b/high, 血小板8万以下, 脾摘例のSVR率に影響する因子 (PEG-IFN/RBV)



### 個別研究(柏木班員): 脾機能亢進症の証明 (SPECTおよびX線CT)



## 治療ガイドライン

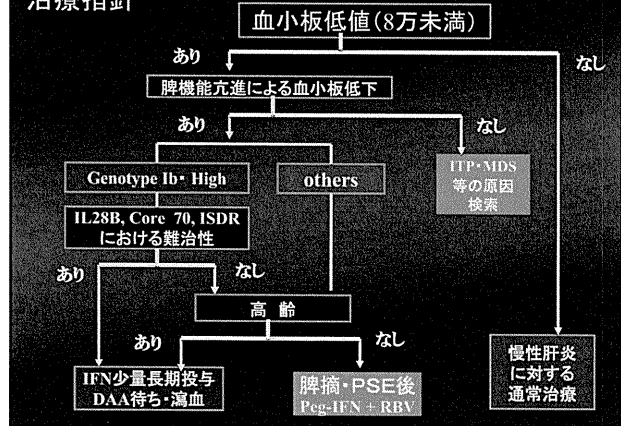
- ・ CQ(大項目10、小項目30)に対し16人の班員が分担し回答した。

ステートメント	グレード	エビデンスレベル	保険適用
		海外 日本	

- ・ 暫定ガイドラインに対し肝臓学会評議員・理事・名誉会員257名にパブリックコメントを求め、73名から回答を得、それをもとにさらにブラッシュアップを行った。

背景肝を考慮すれば肝臓の合併の可能性、白血球数および好中球数の減少、無脾または脾機能低下による感染性を注意しつつ治療にあたる必要がある。

## 治療指針



## 今後の展望

### PET-probeの作成

IFN $\alpha$ 2bへの<sup>64</sup>Cu標識  
とPEG-IFN $\alpha$ 2bへの  
<sup>68</sup>Ga標識に成功



### 患者でのマイクロドーズ試験

肝の線維化の進展によってIFNの集積が低下する可能性の検証

IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\lambda$ の体内動態と治療効果の検証  
副作用

個別研究:  
理化学研究所 分子イメージング  
科学研究センター 渡辺恭良

## 成果のまとめ

血小板低値例は、IFNやリバビリンのアドヒアランスが悪く、PSEや脾摘を行うことにより、薬剤の減量・中止率を有意に低下できる。

PSEや脾摘によるSVR率の改善は、Othersの症例で顕著である。1b/Highの症例で、IL28b, HCV core 70, ISDRなどの要因が、一つでもIFN抵抗性を示唆している症例では、PEG-IFN + RBV療法によるSVRは期待しがたい。

PSE・脾摘ともに多くの合併症が生じ、1262例中11例(0.9%)の死亡が確認された。多くは感染症による死亡であり、PSE・脾摘との因果関係が認められた。肺炎球菌ワクチンの接種率が低く、啓蒙が必要と考えられた。

以上の成績に基づいて、血小板低値例に対するIFN治療に関する治療ガイドラインを作成した。

## 平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題：日本人の細胞に由来する iPS 細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いたキメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用

課題番号：H21-肝炎-一般-008

予定期間：H21 年度から H23 年度まで

研究代表者：池田 一雄

所属研究機関：大阪市立大学

所属部局：大学院医学研究科

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：

1 年目 28,014,000 円 2 年目 28,014,000 円 3 年目 23,812,000 円 計 79,840,000 円

### I. 研究の意義

- (1) 日本人の iPS 細胞から分化させたヒト肝細胞を uPA/SCID マウスに移植したモデルにより、日本人肝細胞における感染肝炎ウイルスのサイクルの解明やウイルス感染に関わる宿主要因を検討できる。
- (2) そのための iPS 細胞から高効率に肝芽様細胞を分化する技術が確立されていない。
- (3) また、uPA/SCID マウスの肝臓に移植した未熟ヒト肝細胞が、成熟ヒト肝細胞に分化するか明らかにされていない。
- (4) 日本人の iPS 細胞から分化させたヒト肝細胞を利用して、in vivo より簡便に効率良く、肝炎の感染実験が可能な in vitro モデルを作成することも肝炎研究の推進に大きな貢献をするものと考えられる。

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 肝炎モデル開発のため、日本人 iPS 細胞由来ヒト肝細胞を有するキメラマウスを作製する。
- (2) そのための、uPA/SCID マウスに生着可能な iPS 細胞由来肝芽細胞様細胞、肝細胞様細胞分化誘導技術を確立する。
- (3) 種々の年齢のドナー肝細胞を uPA/SCID マウスに移植し、年齢と共に発現量が変化することが知られている薬物代謝酵素のヒト肝細胞キメラマウス肝臓中の発現量と酵素活性を指標に、uPA/SCID マウスの肝臓において未熟肝細胞が成熟肝細胞に分化するかどうか調べる。
- (4) iPS 細胞由来ヒト肝細胞を利用した肝炎ウイルスの感染実験が可能な in vitro 系の開発。
- (5) 異なる HBV 遺伝子型に対する防御能、HB ワクチンエスケープミュータント (VEM) に対する防御能を明らかにする。

### III. 3 年間の研究成果

・ 研究代表者

- (1) ヒト iPS 細胞の長期安定培養の確立
- (2) 日本人由来線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、肝芽細胞へ分化誘導
- (3) 分化誘導肝芽細胞を uPA/SCID マウスへ移植し、ELIZA 法にて、マウス末梢血中でのヒトアルブミン値を確認
- (4) マウスの胎児への卵黄嚢静脈からの細胞注入の手技を確立。免疫能を有するマウスでのヒト肝細胞の生

着を確認。

・研究分担者(立野知世)

(1) ヒト薬物代謝酵素の遺伝子発現解析および薬物代謝活性の検討により、移植した未熟な若年ドナー肝細胞はマウス肝臓内に生着・増殖する過程で成人ドナーとほぼ同等な薬物代謝能を獲得することを明らかにした。

(2) ヒト肝細胞、および増殖性ヒト肝細胞の uPA/SCID マウス肝臓内における kinetics を明らかにした。

・研究分担者(吉里勝利)

(1) ヒト肝炎ウイルス感染症を再現するヒト肝細胞培養系の開発研究：肝臓細胞を3次元的に培養し、かつ培養液を微速度で常時通液できる装置を開発。

(2) uPA/SCID マウスに替わる肝芽細胞あるいは肝細胞でのジフテリア毒素を発現させるラットを開発中。

・研究分担者(寺岡弘文)

(1) マウス iPS 細胞から肝芽細胞様細胞への分化誘導に成功。

(2) 多能性幹細胞に発現する DPPA4 の未分化維持機構への関与と分子機能を解明。

(3) ヒト肝星細胞株 LI-90 の肝細胞様細胞分化への影響を確認。

・研究分担者(田中靖人)

(1) HBV 遺伝子型 A-J までのクローンおよび薬剤耐性変異を有するクローンを作製した。

(2) 3種類の1.24倍長HBV複製モデル(遺伝子型A野生株、遺伝子型C野生株、遺伝子型C-145R導入変異株)を感染源とし、中和活性の高いモノクローナル抗体(HBV116抗体と478抗体)を用いてヒト肝細胞キメラマウス(uPA/SCID mice)におけるHBV中和試験を行い、感染防御が可能であることを確認した。

(3) キメラマウス肝組織より単離した肝細胞を用いて、HBVの3次元培養実験を行った。中空糸にキメラマウスの肝細胞を充填して作製した3次元培養系で、60日間のHBV持続感染が可能であることを確認した。

・研究分担者(中西真)

(1) iPS細胞から肝細胞分化過程における分化関連遺伝子の発現プロファイルの作製を行った。

(2) ヒト iPS 細胞移植後の腫瘍化防止技術開発として、iPS 細胞に細胞周期停止機能をもつ p16, p53, p21 の発現をテトラサイクリン存在下で誘導したところ、p16 および p53 遺伝子を発現誘導したときのみ強い増殖抑制効果を認め、さらに p16 を発現誘導した時のみ、未分化マーカーの発現が大きく低下し、内胚葉、中胚葉、外胚葉マーカーの発現が大きく増加することを見出した。

・研究分担者(水口裕之)

(1) SOX17、HEX、HNF4 $\alpha$  遺伝子導入によるヒト iPS 細胞から効率良い成熟肝細胞への分化誘導法を開発。

(2) 免疫不全マウス腎被膜下移植でのヒト iPS 細胞由来肝幹前駆細胞の生着を確認。

(3) uPA/SCID マウスへのヒト iPS 細胞由来肝細胞の移植でヒト ALB 検出により細胞生着を確認。

#### IV. 今後考えられる新たな課題

(1) ヒト化肝臓キメラマウスを作製するために、移植するヒト iPS 細胞由来肝細胞のさらなる成熟化を試みる。

(2) iPS 細胞由来のキメラマウスを構築し、肝細胞の3次元培養系とともに、HBV感染実験を in vivo と in vitro 双方の条件下での検討。

(3) iPS 化に伴うエピジェネティック制御機構、肝細胞分化過程におけるエピジェネティック修飾変化の解析および遺伝子発現パターンの解析。

## V. 行政施策への貢献の可能性

(1) このモデル動物を開発して大量生産ラインが確立できれば、人種間のジェノタイプ別の感染・複製効率、インターフェロン感受性、の差異が解決でき、日本人肝疾患、特にウイルス性肝疾患の宿主要因での病態解明、診断法や治療薬の開発に繋がる。

(2) iPS 化に伴う細胞記憶のリプログラミングの本体を理解することは、細胞 iPS 化効率を向上させるのみならず、移植後のガン化防止法の確立にも貢献すると考えられる。

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- $\beta$ -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. *J Cell Physiol*. 2011 Oct; 226(10):2535-42.

(2) Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, Ohdan H, Yoshizato K. Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure. *J Surg Res*. 2011 May 1;167(1):e29-37.

(3) Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, Yoshizato K. Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver. *Endocrinology*. 2011 Apr;152(4):1479-91.

(4) Yoshizato K, Tateno C, Utoh R. Mice with Liver Composed of Human Hepatocytes as an Animal Model for Drug Testing. *Curr Drug Discov Technol* (in press).

(5) Atsumi Y, Fujimori Y, Fukuda H, Inase A, Shinohe K, Yoshioka Y, Shikanai M, Ichijima Y, Unno S, Mizutani S, Tsuchiya N, Hippo Y, Nakagama H, Masutani M, Teraoka H, and Yoshioka K. Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells. *PLoS ONE* 2011;6:e23432 (10 pages)

(6) Ozeki R, Kakinuma S, Asahina K, Shimizu-Saito K, Arie S, Tanaka Y, and Teraoka H. Hepatic stellate cells mediate differentiation of dendritic cells from monocytes. *J Med Dent Sci In press*

(7) Matsuura K, Tanaka Y, Kusakabe A, Hige S, Inoue J, Komatsu M, Kuramitsu T, Hirano K, Ohno T, Hasegawa I, Kobashi H, Hino K, Hiasa Y, Nomura H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Mizokami M. Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial. *Hepatol Res.*, 41 (6): 505-511, 2011

(8) Yuen MF, Ka-Ho Wong D, Lee CK, Tanaka Y, Allain JP, Fung J, Leung J, Lin CK, Sugiyama M, Sugauchi F, Mizokami M, Lai CL. Transmissibility of Hepatitis B Virus (HBV) Infection through Blood Transfusion from Blood Donors with Occult HBV Infection. *Clin Infect Dis.*, 52 (5): 624-32, 2011

(9) Harada N, Watanabe Y, Yoshimura Y, Sakumoto H, Makishima F, Tsuchiya M, Nakanishi K, Nakanishi M, Aoki Y. Identification of a checkpoint modulator with synthetic lethality to p53 mutants. *Anticancer Drugs*. 2011 22 986-94

(10) Inamura M., Kawabata K., Takayama K., Tashiro K., Sakurai F., Katayama K., Toyoda M., Akutsu H., Miyagawa Y., Okita H., Kiyokawa N., Umezawa A., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. *Mol. Ther.*, 19, 400-407. 2011.

(11) Takayama K, Inamura M, Kawabata K, Tashiro K, Katayama K, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient and selective generation of two distinct endoderm lineages from human ES and iPS cells by differentiation stage-specific SOX17 transduction. *PLoS ONE*, 6, e21780. 2011.

## VII. III(3年間の研究成果)の概要図等

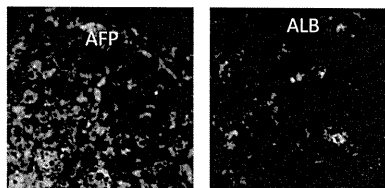
### 日本人の線維芽細胞よりiPS細胞を作製

### 肝細胞への分化効率の良いクローンの選択

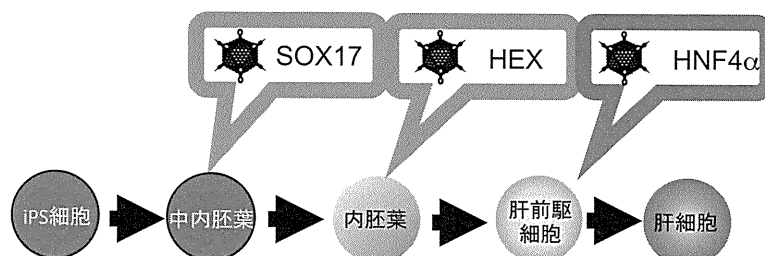
内胚葉マーカーCXCR4のFACS解析

肝前駆細胞マーカーDlk-1のFACS解析

最良クローンの肝細胞  
分化マーカーの免疫染色



### 遺伝子強制発現による肝細胞分化誘導の効率上昇



iPS細胞から内胚葉、内胚葉から肝前駆細胞を分化誘導する際、転写因子の強制発現により、分化誘導効率を上昇させることが可能

### 残存未分化細胞の腫瘍化の抑制

Tet-ON system lentivirus vector

p16発現誘導により、未分化マーカーの発現が著しく低下

### ヒトiPS由来肝細胞のuPA/SCIDマウスへの移植

ELISA法により、マウス血中ヒトアルブミンを確認  
ヒトALB抗体による免疫染色により20数%の細胞置換率を確認

### ヒトiPS由来肝細胞のマウス胎仔肝臓への移植

卵黄囊静脈からの細胞移植法を確立

## ●研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

1989：大阪市立大学医学部卒業  
1995：大阪市立大学大学院医学研究科博士課程修了  
1995：大阪市立大学医学部助手（第二解剖学教室）  
1999-2001：米国マウントサイナイ医科大学博士研究員  
2002：大阪市立大学大学院医学研究科講師（器官構築形態学）  
2004：大阪市立大学大学院医学研究科助教授（器官構築形態学）  
2007：大阪市立大学大学院医学研究科准教授（器官構築形態学）  
2008：名古屋市立大学大学院医学研究科教授（機能解剖学）  
2011：大阪市立大学大学院医学研究科教授（機能細胞形態学）

### ・主な共同研究者（又は指導を受けた研究者）

和気健二郎（東京医科歯科大学 名誉教授）  
稲垣 豊（東海大学医学部 教授）  
藤元治朗（兵庫医科大学 教授）  
雑賀司珠也（和歌山県立医科大学 教授）  
河田則文（大阪市立大学 教授）  
吉里勝利（広島大学 名誉教授）  
寺岡弘文（東京医科歯科大学 名誉教授）  
田中靖人（名古屋市立大学 教授）  
中西真（名古屋市立大学 教授）  
水口裕之（大阪大学 教授）  
立野知世（株式会社フェニックスバイオ）  
Scott L. Friedman（The president of 59th AASLD, Mount Sinai School of Medicine）  
Hidekazu Tsukamoto（Keck School of Medicine of the University of Southern California）

### ・主な研究課題

臓器線維症  
上皮間葉系移行  
肝星細胞の細胞生物学  
選択的遺伝子制御の開発

### ・これまでの研究実績（最近5年）

1: Sekiya Y, Ogawa T, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug19;412(1):74-9.  
2: Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon-beta-induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation. *J Cell Physiol*. 2011 Oct;226(10):2535-42.  
3: Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N. Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated



- cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol.* 2011 Aug;179(2):1050-60.
- 4: Miyaki T, Nojiri S, Shinkai N, Kusakabe A, Matsuura K, Iio E, Takahashi S, Yan G, Ikeda K, Joh T. Pitavastatin inhibits hepatic steatosis and fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis model rats. *Hepatol Res.* 2011 Apr;41(4):375-85.
- 5: Imanishi H, Tsuruta D, Tateishi C, Sugawara K, Paus R, Tsuji T, Ishii M, Ikeda K, Kunimoto H, Nakajima K, Jones JC, Kobayashi H. Laminin-511, inducer of hair growth, is down-regulated and its suppressor in hair growth, laminin-332 up-regulated in chemotherapy-induced alopecia. *J Dermatol Sci.* 2010Apr;58(1):43-54.
- 6: Ozawa T, Tsuruta D, Jones JC, Ishii M, Ikeda K, Harada T, Aoyama Y, Kawada A, Kobayashi H. Dynamic relationship of focal contacts and hemidesmosome protein complexes in live cells. *J Invest Dermatol.* 2010 Jun;130(6):1624-35.
- 7: Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1;391(1):316-21.
- 8: Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Ikeda K, Kawada N. Induction of tropomyosin during hepatic stellate cell activation and the progression of liver fibrosis. *Hepatol Int.* 2009 Jun;3(2):378-83.
- 9: Ogawa T, Kawada N, Ikeda K. Effect of natural interferon alpha on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *Hepatol Int.* 2009 Apr 21;3:497-503.
- 10: Higashiyama R, Moro T, Nakao S, Mikami K, Fukumitsu H, Ueda Y, Ikeda K, Adachi E, Bou-Gharios G, Okazaki I, Inagaki Y. Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice. *Gastroenterology.* 2009 Oct;137(4):1459-66. e1.
- 11: Shinozaki M, Okada Y, Kitano A, Ikeda K, Saika S, Shinozaki M. Impaired cutaneous wound healing with excess granulation tissue formation in TNFalpha-null mice. *Arch Dermatol Res.* 2009 Aug;301(7):531-7.
- 12: Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Tanaka S, Miyamoto T, Sumioka T, Kitano A, Shirai K, Ikeda K. TGF beta in fibroproliferative diseases in the eye. *Front Biosci (Schol Ed).* 2009 Jun 1;1:376-90. Review.
- 13: Sumioka T, Ikeda K, Okada Y, Yamanaka O, Kitano A, Saika S. Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium. *Mol Vis.* 2008;14:2272-81.
- 14: Yamanaka O, Miyazaki K, Kitano A, Saika S, Nakajima Y, Ikeda K. Suppression of injury-induced conjunctiva scarring by peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene transfer in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Jan;50(1):187-93.
- 15: Kitano A, Yamanaka O, Ikeda K, Ishida-Nishikawa I, Okada Y, Shirai K, Saika S. Tetrandrine suppresses activation of human subconjunctival fibroblasts in vitro. *Curr Eye Res.* 2008 Jul;33(7):559-65.
- 16: Sakabe M, Sakata H, Matsui H, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. ROCK1 expression is regulated by TGFbeta3 and ALK2 during valvuloseptal endocardial cushion formation. *Anat Rec (Hoboken).* 2008 Jul;291(7):845-57.
- 17: Saika S, Yamanaka O, Flanders KC, Okada Y, Miyamoto T, Sumioka T, Shirai K, Kitano A, Miyazaki K, Tanaka S, Ikeda K. Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for prevention of ocular tissue fibrosis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2008 Mar;8(1):69-76. Review.
- 18: Miyazaki K, Okada Y, Yamanaka O, Kitano A, Ikeda K, Kon S, Uede T, Rittling SR, Denhardt DT, Kao

- WW, Saika S. Corneal wound healing in an osteopontin-deficient mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Apr;49(4):1367-75.
- 19: Yamanaka O, Saika S, Ikeda K, Miyazaki K, Kitano A, Ohnishi Y. Connective tissue growth factor modulates extracellular matrix production in human subconjunctival fibroblasts and their proliferation and migration in vitro. *Jpn J Ophthalmol.* 2008 Jan-Feb;52(1):8-15.
- 20: Matsui H, Sakabe M, Sakata H, Yanagawa N, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. Induction of initial heart alpha-actin, smooth muscle alpha-actin, in chick pregastrula epiblast: the role of hypoblast and fibroblast growth factor-8. *Dev Growth Differ.* 2008 Mar;50(3):143-57.
- 21: Saika S, Yamanaka O, Sumioka T, Miyamoto T, Miyazaki K, Okada Y, Kitano A, Shirai K, Tanaka S, Ikeda K. Fibrotic disorders in the eye: targets of gene therapy. *Prog Retin Eye Res.* 2008 Mar;27(2):177-96. Review.
- 22: Otogawa K, Ogawa T, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Kawada N. Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Feb;294(2):R311-20.
- 23: Kitano A, Saika S, Yamanaka O, Ikeda K, Okada Y, Shirai K, Reinach PS. Emodin suppression of ocular surface inflammatory reaction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Nov;48(11):5013-22.
- 24: Yamanaka O, Saika S, Ohnishi Y, Kim-Mitsuyama S, Kamaraju AK, Ikeda K. Inhibition of p38MAP kinase suppresses fibrogenic reaction in conjunctiva in mice. *Mol Vis.* 2007 Sep 18;13:1730-9.
- 25: Okada Y, Ikeda K, Yamanaka O, Miyamoto T, Kitano A, Kao WW, Saika S. TNFalpha suppression of corneal epithelium migration. *Mol Vis.* 2007 Aug 14;13:1428-35.
- 26: Saika S, Yamanaka O, Okada Y, Miyamoto T, Kitano A, Flanders KC, Ohnishi Y, Nakajima Y, Kao WW, Ikeda K. Effect of overexpression of PPARgamma on the healing process of corneal alkali burn in mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jul;293(1):C75-86.
- 27: Fujita S, Saika S, Kao WW, Fujita K, Miyamoto T, Ikeda K, Nakajima Y, Ohnishi Y. Endogenous TNFalpha suppression of neovascularization in corneal stroma in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007 Jul;48(7):3051-5.
- 28: Saika S, Yamanaka O, Nishikawa-Ishida I, Kitano A, Flanders KC, Okada Y, Ohnishi Y, Nakajima Y, Ikeda K. Effect of Smad7 gene overexpression on transforming growth factor beta-induced retinal pigment fibrosis in a proliferative vitreoretinopathy mouse model. *Arch Ophthalmol.* 2007 May;125(5):647-54.
- 29: Otogawa K, Kinoshita K, Fujii H, Sakabe M, Shiga R, Nakatani K, Ikeda K, Nakajima Y, Ikura Y, Ueda M, Arakawa T, Hato F, Kawada N. Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis: implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol.* 2007 Mar;170(3):967-80.
- 30: Sakata H, Sakabe M, Matsui H, Kawada N, Nakatani K, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. Rho kinase inhibitor Y27632 affects initial heart myofibrillogenesis in cultured chick blastoderm. *Dev Dyn.* 2007 Feb;236(2):461-72.
- 31: El-Karef A, Kaito M, Tanaka H, Ikeda K, Nishioka T, Fujita N, Inada H, Adachi Y, Kawada N, Nakajima Y, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T. Expression of large tenascin-C splice variants by hepatic stellate

cells/myofibroblasts in chronic hepatitis C. J Hepatol. 2007 Apr;46(4):664-73.

32: Kinoshita K, Iimuro Y, Otagawa K, Saika S, Inagaki Y, Nakajima Y, Kawada N, Fujimoto J, Friedman SL, Ikeda K. Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. Gut. 2007 May;56(5):706-14.

33: Sugawara K, Tsuruta D, Kobayashi H, Ikeda K, Hopkinson SB, Jones JC, Ishii M. Spatial and temporal control of laminin-332 (5) and -511 (10) expression during induction of anagen hair growth. J Histochem Cytochem. 2007 Jan;55(1):43-55.

34: Kinoshita K, Iimuro Y, Fujimoto J, Inagaki Y, Namikawa K, Kiyama H, Nakajima Y, Otagawa K, Kawada N, Friedman SL, Ikeda K. Targeted and regulable expression of transgenes in hepatic stellate cells and myofibroblasts in culture and in vivo using an adenoviral Cre/loxP system to antagonise hepatic fibrosis. Gut. 2007 Mar;56(3):396-404.

- ・ 平成 24 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  
申請なし。

平成23年度厚生労働省科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業

日本人の細胞に由来するiPS細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いた  
キメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用

研究代表者 池田一雄 (大阪市立大学)

研究分担者  
吉里勝利 (フェニックスバイオ)  
立野知世 (フェニックスバイオ)  
寺岡弘文 (東京医科歯科大学)  
田中靖人 (名古屋市立大学)  
中西 真 (名古屋市立大学)  
水口裕之 (医薬基盤研究所)

### 本研究班での研究成果

- (1) iPS細胞の長期安定培養の確立(ヒトおよびマウス) [池田、寺岡、水口、中西]
- (2) iPS細胞から肝(芽)細胞へ分化誘導 [池田、寺岡、水口]
- (3) 分化誘導肝芽細胞をuPA/SCIDマウスへ移植し、ELISA法にて、マウス末梢血中のヒトアルブミン値を確認 [立野、池田、水口]
- (4) uPA/SCIDマウスの胎児への卵黄嚢静脈からの細胞注入の手技を確立 [池田]
- (5) ヒト肝炎ウイルス感染症を再現するヒト肝細胞培養系の開発研究 [田中、吉里]
- (6) 未熟な若年ドナー肝細胞がマウス肝臓で生着・増殖し、ヒト薬物代謝酵素を発現する成熟ヒト肝細胞に分化することを確認 [立野]
- (7) ヒトiPS細胞移植後の腫瘍化防止技術の開発研究 [中西]

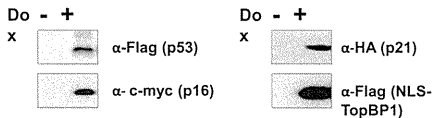
### テトラサイクリン誘導性老化関連遺伝子発現iPS細胞の樹立



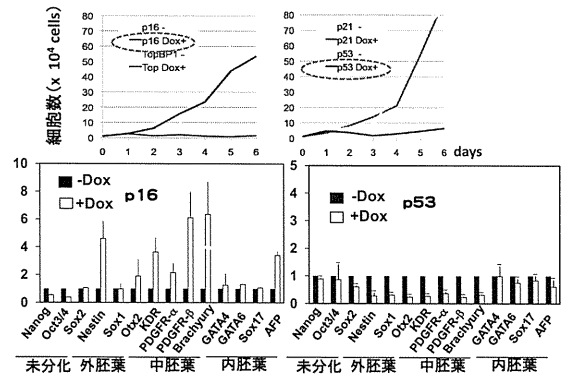
Human-iPS cells (明視野)

Kusabira Orange蛍光

アルカリフォスファターゼ染色

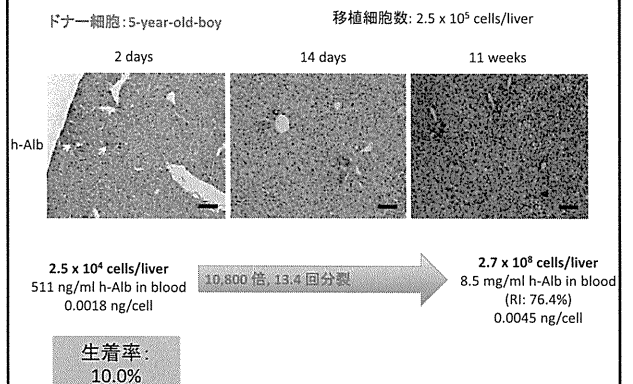


### p53、p16発現によるiPS細胞の増殖停止および分化誘導



ヒトiPS細胞からの分化誘導ヒト肝細胞  
を用いたキメラマウスの作製は可能か？

### ヒト肝細胞のuPA/SCIDへの生着



uPA/SCIDマウスへのヒト肝細胞置換率向上の試み

移植細胞	肝臓への生着	高置換キメラマウス作製
市販ヒト肝細胞 (凍結融解)	○	○ (ドナー差あり)
キメラマウス由来肝細胞 (新鮮)	○	○
キメラマウス由来肝細胞 (継代)	○	○ (現在のところ、3-4代目まで)
キメラマウス由来肝細胞 (凍結融解)	○	○
ヒトiPS細胞由来肝細胞	×	×

凍結融解したキメラマウス由来肝細胞やヒトiPS細胞移植において、移植細胞の肝臓への生着率、置換率を高める。

<これまでに実施した検討項目>

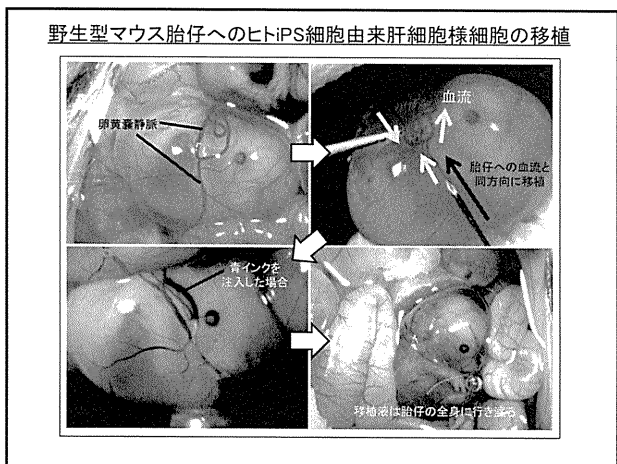
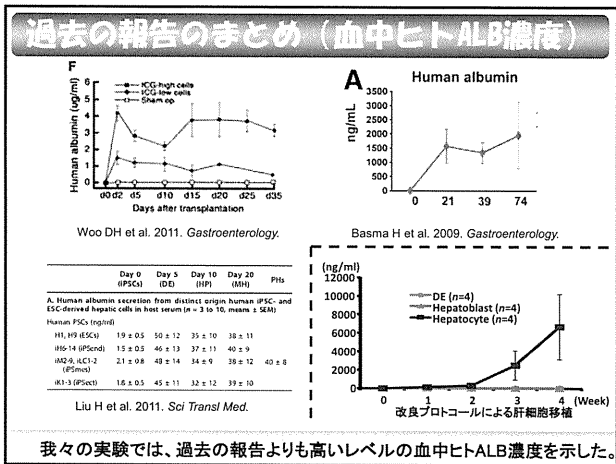
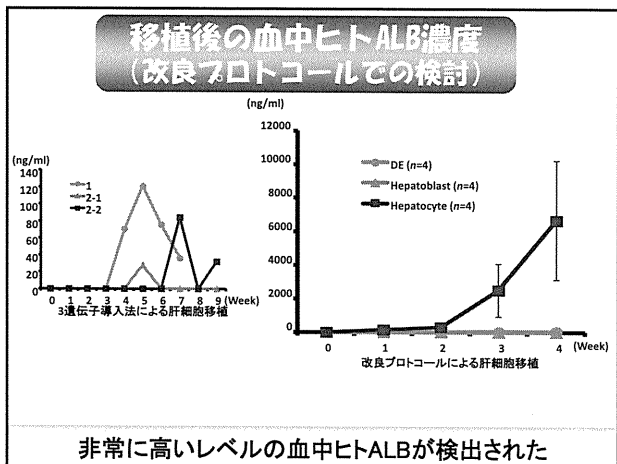
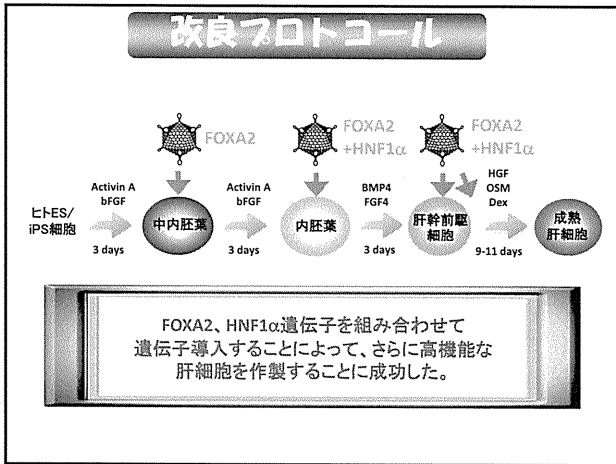
移植細胞	ホストマウス
・凍結条件の改善	・NK細胞除去
・培養条件の改善 (Integrin a1抗体処理)	・leakyマウスの除去

<今回の検討項目>

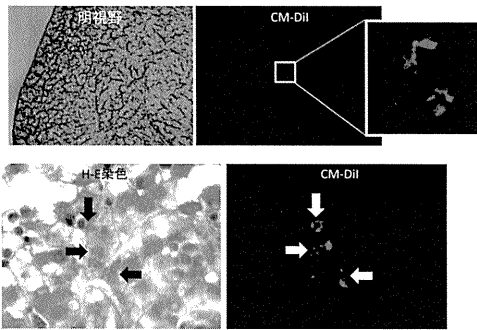
ホストマウスの改善  
 リポソーム封入クロドノート処理: ホストマウス肝臓中のクッパー細胞の除去  
 →クッパー細胞による移植細胞貪食がなくなるので生着向上?  
 X処理: マウス肝臓にさらに障害を与える  
 →肝細胞の肝細胞索への侵入、生着向上?

uPA/SCIDマウスへのヒトiPS細胞由来肝細胞置換率向上の試み

	平成22年度	平成23年度
X処理 (-)		X処理 (+)
血中ヒトアルブミン 測定可能匹数	5匹	6匹
血中ヒトアルブミン 測定不能匹数	37匹	1匹

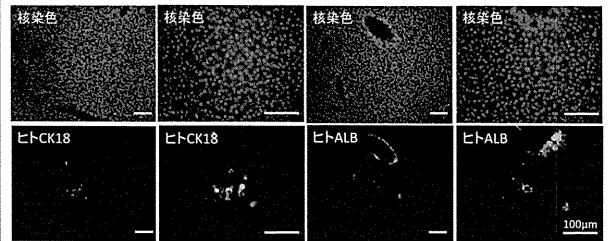


移植2日後(E18.5)の肝臓切片の観察



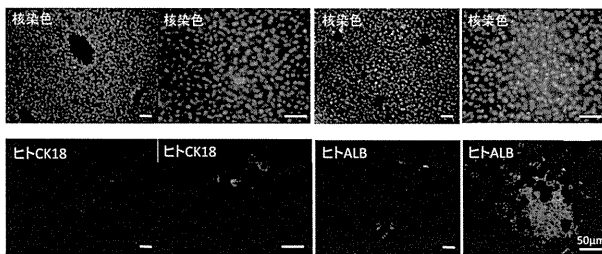
蛍光標識された移植細胞は、肝臓に生着している。

生後10日後の肝臓切片における免疫組織化学



生後10日後の肝臓において、ヒトCK18陽性細胞、ヒトALB陽性細胞が観察された。

生後30日後の肝臓切片における免疫組織化学



ヒトCK18陽性、ヒトALB陽性のヒトiPS細胞由来肝細胞が生後30日後のマウス肝臓で確認できた。

今後の展開

iPS細胞由来のキメラマウスを構築し、肝細胞の3次元培養系とともに、HBV感染実験をin vivo とin vitro 双方の条件下での検討。

iPS化に伴うエピジェネティック制御機構、肝細胞分化過程におけるエピジェネティック修飾変化の解析および遺伝子発現パターンの解析。

## 平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題：肝炎ウイルスによる発がん機構の解明に関する研究 (H21-肝炎-一般-009)

課題番号：H21-肝炎-一般-009

予定期間：H21 年度から H23 年度まで

研究代表者：堀田博

所属研究機関：神戸大学

所属部局：大学院医学研究科

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：

1 年目 39,000,000 円 2 年目 39,000,000 円 3 年目 33,150,000 円 計 111,150,000 円

### I. 研究の意義

- (1) C 型肝炎ウイルス (HCV) や B 型肝炎ウイルス (HBV) の肝発がん機序は未解明。
- (2) 肝発がんに関与する宿主因子・ウイルス因子を標的とした発症予防法・治療法の開発が必要。
- (3) 肝発がん高危険群を囲い込む予測診断と早期発見のためのウイルスマーカーの探索が必要。

### II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HCV や HBV の肝発がん機序の解明を目的。
- (2) HCV や HBV の肝発がん機序に基づく肝がんの分子標的発症予防法や治療法の開発を期待。
- (3) HCV の多様性に基づく肝発がん高危険群を囲い込む予測診断法の開発を期待。

### III. 3 年間の研究成果

#### ・研究代表者 (堀田博)

- (1) HCV NS3 トランスジェニックマウスを作製し、NS3 が肝がん発症に関与することを発見。
- (2) NS3 は発がん関連蛋白  $\Delta$ Np73 の発現を亢進させることを発見。
- (3) NS3 の点変異 (Y56/Q56) と肝がんの相関を実証。
- (4) NS3 変異 (Y56/Q56) とコア蛋白変異 (Q70) の組み合わせにより高発がん性 HCV 株を同定。

#### ・研究分担者 (河田純男、斎藤貴史)

- (1) 肝発がんの高危険群設定を示唆する HCV NS3 蛋白型の分類を提唱。
- (2) C 型慢性肝炎患者の PegIFN/RBV 併用治療効果予測に資する HCV NS3 蛋白型の分類に成功。

#### ・研究分担者 (小池和彦)

- (1) C 型肝炎等における肝内モノエン酸 (特にオレイン酸) 蓄積の肝発がんにおける意義を解明。
- (2) B 型肝炎における肝発がんの新たな経路 (HBx と TGF  $\beta$ 、PTTG1) を解明。

#### ・研究分担者 (丸澤宏之)

- (1) 肝炎ウイルス感染による炎症反応を介した遺伝子編集酵素 (AID と APOBEC2) の誘導の証明。
- (2) HCV 肝がん発生過程の遺伝子変異の全体像を次世代シーケンサーにより同定。

・ 研究分担者(佐々木裕)

- (1) 細胞死抵抗性を担う蛋白として約 30 種類の宿主蛋白を同定。
- (2) Nucleophosmin がアポトーシス誘導遺伝子の発現を抑制することを証明。

・ 研究分担者(森石恆司)

- (1) コア蛋白と結合する宿主蛋白 PA28 $\gamma$  とヒストンモノユビキチン化 E3 酵素の結合を発見。
- (2) コア蛋白及び PA28 $\gamma$  は宿主遺伝子発現の調節と肝細胞再生に関与していることを発見。

・ 研究分担者(加藤孝宣)

- (1) HCV-1b のコア蛋白変異(Q70)によりビリオン生成効率の低下とコア蛋白の細胞内蓄積を証明。
- (2) 上記の変異は細胞周期の進行阻止にも関与することを発見。

・ 研究分担者(加藤宣之、有海康雄)

- (1) HCV の複製に P-body や stress granule 因子、がん抑制因子 PML が関与することを発見。
- (2) HCV 感染で P-body や stress granule 因子が脂肪滴周辺にハイジャックされることを発見。

#### **IV. 今後考えられる新たな課題**

- (1) 前向き研究による肝発がん と HCV NS3 多型性の相関の確認。
- (2) HCV NS3 と  $\Delta$ Np73 の相互作用のより詳細な分子機序の解明。
- (3) HCV コア蛋白や HBV X 蛋白と宿主の発がん関連蛋白の相互作用のより詳細な解明。

#### **V. 行政施策への貢献の可能性**

- (1) 肝がんのリスク診断と早期診断の診療指針を確立し、C 型・B 型肝炎対策に貢献。
- (2) 新規の作用機序による HCV 治療法や肝がん発症予防法の確立。

#### **VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**

・ 研究代表者(堀田博)

- (1) Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. J Virol, 85: 8556-8568, 2011.
- (2) Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Hotta H, Sada K. Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. Microbiol Immunol, 55: 774-782, 2011.
- (3) Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. J Med Virol, 82: 1364-1370, 2010.
- (4) Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. J Hepatol, 50: 883-894, 2009.
- (5) Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu V-C, Hotta H, Tan Y-J. The hepatitis C virus core protein



- contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human MCL-1. *J Virol*, 83: 9993-10006, 2009.
- (6) Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma cells. *J Gen Virol*, 90: 1681-1691, 2009.
- (7) 堀田博. 特許第 4565180 号 p53 癌抑制蛋白との結合に關与する C 型肝炎ウイルス非構造蛋白 NS3 のアミノ酸残基の同定と、医薬開発への利用 平成 22 年 8 月 13 日
- (8) 堀田博. 特願 2010-206800 C 型肝炎ウイルス株の評価方法及びその利用
- 研究分担者(河田純男、齋藤貴史)  
Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol*, 82: 1364-1370, 2010.
  - 研究分担者(小池和彦)  
Molina-Jiménez F, Benedicto I, Murata M, Martín-Vílchez S, Seki T, Pintor-Toro JA, Tortolero M, Moreno-Otero R, Okazaki K, Koike K, Barbero JL, Matsuzaki K, Majano PL, López-Cabrera M. Expression of pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1)/securin in hepatitis B virus-associated liver diseases: Evidence for a hepatitis B virus X protein-mediated inhibition of PTTG1 ubiquitination and degradation. *Hepatology*, 51: 777-787, 2010.
  - 研究分担者(丸澤宏之)  
Marusawa H, Takai A, Chiba T. Role of activation-induced cytidine deaminase in inflammation-associated cancer development. *Adv Immunol*, 111: 109-141, 2011.
  - 研究分担者(佐々木裕)  
Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y, Harao M, Imai K, Baba H, Iwase H, Nomori H, Takahashi K, Daigo Y, Tsunoda T, Nakamura Y, Sasaki Y, Nishimura Y. The Forkhead Box M1 transcriptional factor as a possible immunotherapeutic tumor-associated antigen. *Int J Cancer*, 126: 2153-2163, 2009.
  - 研究分担者(森石恆司)  
Moriishi K, Shoj I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28 $\gamma$  in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology*, 52: 411-420, 2010.
  - 研究分担者(加藤孝宣)  
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.
  - 研究分担者(加藤宣之、有海康雄)  
Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J Virol*, 85: 6882-6892, 2011.

## Ⅶ. Ⅲ(3年間の研究成果)の概要図等

### 3年間の研究成果

#### HCV NS3の肝発がんへの関与の証明

- 肝発がん、肝病態を規定するウイルス因子の臨床的解析
  - ・HCV NS3多型に基づいた高発がん性HCV株の同定法を発見
  - ・HCV NS3多型とPEG-IFN/RBV治療応答性の相関を発見
- 動物実験モデルによる肝発がん機序の解明
  - ・HCV NS3トランスジェニックマウスの肝発がん発症を発見
  - ・NS3による発がん関連因子( $\Delta$ Np73)の発現亢進を発見

#### HCV肝発がんの分子機序の解明

- HCV感染により変動する宿主因子の網羅的解析
  - ・HCV肝がん特有の発現パターンを示す宿主蛋白を同定
  - ・HCV感染による遺伝子編集酵素AID、APOBEC2の誘導を証明
- HCV蛋白-宿主因子相互作用と病原性発現機序
  - ・HCVコア蛋白と宿主因子E6AP及びPA28 $\gamma$ の相互作用を解明
  - ・HCV蛋白に結合する多数の宿主因子を同定
  - ・がん抑制蛋白p53によるHCV複製の抑制を発見
  - ・がん抑制因子PMLのHCV複製への関与を証明

#### 行政施策への貢献の可能性

- > ウイルス多型性に基づく  
7 HCV肝発がんリスク予測診断法の開発  
1
- > ウイルス感染宿主因子の変動に基づく  
> HCV肝がん早期診断法の開発  
1
- > ウイルス肝発がんの分子標的に基づく  
7 発がん予防法や治療法の開発  
1
- > ウイルス-宿主相互作用を標的にした  
7 新規抗ウイルス薬の開発

肝炎ウイルス(HCV,HBV)感染者の  
発がん予防、早期発見、治療による  
QOLの向上

## ●研究代表者の研究歴等

※研究代表者に関するもののみを記載してください。(研究代表者には下線をつけて下さい)

### ・過去に所属した研究機関の履歴

1974年～1975年 大阪大学医学部附属病院

1975年～1997年 兵庫県立西宮病院

1977年～2001年 神戸大学医学部

(この間、1986年～1987年 米国ウイスター研究所に留学)

2001年～現在 神戸大学大学院医学研究科 (部局化に伴う所属の変更)

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

本間守男・神戸大学名誉教授 (前・神戸大学医学部教授)

### ・主な研究課題

1. C型肝炎ウイルスの発がん分子機序の解析

2. C型肝炎ウイルスの糖・脂質代謝異常誘導の分子機序の解析

3. C型肝炎ウイルスの遺伝子多様性とインターフェロン抵抗性及び肝がん発症頻度との相関についての臨床疫学的研究

### ・これまでの研究実績

※研究代表者の本研究の成果以外の実績も記載してください。

(成果概要VIと重複するものや本研究成果によるものは、太字・斜体文字で記載してください)

※ 発表論文名・学協会誌名・発表年(西暦)、知的財産権の取得及び申請状況、研究課題の実施を通じた政策提言(寄与した指針又はガイドライン等)のうち、主なものを選択し、直近年度から順に記載してください。

### <発表論文>

1. ***Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. J Virol. 85(17): 8556-8568, 2011.***
2. ***Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Hotta H, Sada K. Inhibition of hepatitis C virus replication through AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. Microbiol Immunol. 55(11): 774-782, 2011.***
3. ***Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, Hotta H. 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. 2011 (in press)***
4. Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. Microbes Infect. 2011 (in press)

5. *El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy. Intervirology. 5(1): 1-11, 2012.*
6. *El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, Deng L, Kawata S, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. Microbiol Immunol. 55(6): 418-426, 2011.*
7. *Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 $\beta$ -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. Microbiol Immunol. 54(11): 684-690, 2010.*
8. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. J Cell Biochem, 111(3): 676-685, 2010.
9. Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Amin M, Soetjipto, Hotta H, Hayashi Y. Serologic and molecular characteristics of hepatitis B virus among school children in East Java, Indonesia. Am J Trop Med Hyg, 83(1): 189-193, 2010.
10. Kim SR, Imoto S, Kudo M, Nakajima T, Ando K, Mita K, Fukuda K, Hong HS, Lee YH, Nakashima K, Shoji I, Nagano-Fujii M, Hotta H, Hayashi Y. Autoimmune thrombocytopenic purpura during pegylated interferon alpha treatment for chronic hepatitis C. Intern Med, 49(12): 1119-1122. 2010.
11. *Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. J Med Virol, 82(8): 1364-1370, 2010.*
12. Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. Intervirology, 53(1): 49-54, 2010.
13. Kim SR, Imoto S, Kudo M, Mita K, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Shoji I, Nagano-Fujii M, El-Shamy A, Hotta H, Nagai T, Nagata Y, Hayashi Y. Double-filtration plasmapheresis plus IFN for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy: early viral dynamics. Intervirology, 53(1): 44-48, 2010.
14. Sasayama M, Deng L, Kim SR, Ide Y-H, Shoji I, Hotta H. Analysis of neutralizing antibodies against hepatitis C virus in patients who were treated with peglated-Interferon plus ribavirin. Kobe J Med Sci, 56(2): E60-66, 2010.
15. An C, Ide Y-H, Nagano-Fujii M, Kitazawa S, Shoji I, Hotta H. A transgenic mouse line with a 58-kb fragment deletion in chromosome 11E1 that encompasses part of the Fam20a gene and its upstream region shows growth disorder. Kobe J Med Sci, 55(4): E82-92, 2010.
16. *Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. J Hepatol, 50: 883-894, 2009.*
17. *Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H.*