

201204007A

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）

アジアにおいて特に蔓延するウイルス性肝疾患の 制御へ向けた日米共同ウイルス肝炎研究

(H24-国医-指定-007)

平成24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25(2013)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）

アジアにおいて特に蔓延するウイルス性肝疾患の
制御へ向けた日米共同ウイルス肝炎研究

（H24- 国医 - 指定 -007）

平成 24 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 25（2013）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

アジアにおいて特に蔓延するウイルス性肝疾患の制御へ向けた
日米共同ウイルス肝炎研究

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 17

脇田 隆字

2. C型肝炎ウイルス genotype 別のインターフェロン応答に関する研究 20

茶山 一彰

3. B,C,E 型肝炎の疫学, 免疫学, アジアとの共同研究に関する研究 26

アクバル シェイクモハマドファズレ

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 32

金子 周一

III. 研究成果に関連した刊行物 (総説抜粋) 35

平成 24 年度 総括研究報告書

アジアにおいて特に蔓延するウイルス性肝疾患の制御へ向けた
日米共同ウイルス肝炎研究
(H24- 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。更に、最近A型肝炎についても対象として研究を行っている。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、A型肝炎についてはアジアにおける流行の実態解明を行なった。2013年3月には、シンガポールにおいて第33回目の肝炎部会を「アジアのB型肝炎：慢性HBV感染の治癒的治療の開発に向けて」と題して開催し、大きな成果が得られた。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』）

アクバル シェイクモハマドファズレ
東芝病院研究部主任研究員
（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』）

茶山一彰 広島大学医歯薬学総合研究科先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
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) 第33回 USJCMASP 肝炎部会は2013年3月12～13日にわたってシンガポール、マンダリンオリエンタルホテルにおいて開催された。今回は、USJCMASP 全体による Emerging Infectious Disease (EID)開催に併せて肝炎部会、ウイルス感染

部会、AIDS 部会、呼吸器感染部会の4つの部会(Panel)が同時並行的に開催されたのが特徴であった。

“A Symposium on Curative Therapy for Chronic HBV Infection”と題して行なわれた本部会は、1) Introduction to the Problem of Chronic hepatitis B、2) Targeting Virus Replication、3) Targeting the immune system for control of HBV、4) Cancer as a consequence of chronic hepatitis B の4つのセッションからなり、それぞれのセッションにおいて活発な議論が交わされた。アジアと米国におけるB型肝炎の現状、B型肝炎の再活性化、新規抗ウイルス薬開発のターゲット、T細胞機能の回復に向けた試み、自然免疫系の関わり、ワクチンと抗ウイルス薬の併用療法、バングラデシュにおけるワクチン療法、HBV排除におけるIL-1 β とAPOBECの役割、肝癌とmicroRNA、肝癌の免疫療法等、多岐に渡る話題が発表され、熱い議論が戦わされた。日本、米国、アジアにおけるB型肝炎の制圧に向けて有益な情報の得られた会議であった。

(2) 東京大学消化器内科における1年間の肝細胞癌局所治療症例数はのべで795例であったが、そのうちHBV関連肝細胞癌は93例、HCV関連が477例、非B非C型が225例であった。B型肝炎、C型肝炎において、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、ラジオ波治療によって長期の予後が期待されること、HBV、HCV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（小池班長）。

（3）東京大学消化器内科における最近10年間のHBV関連肝細胞癌の入院治療患者数は233例であった。HBV関連肝癌の病態、特に宿主因子の解明のため、過去5年間のHBV肝癌例の家族歴を調査したところ、HBV関連肝細胞癌121例のうち、母親のHBV感染や発癌が把握されていた例はそれぞれ39例、6例、また同胞のHBV感染や発癌が確認された例は30例、9例であった。複数の同胞が発癌している高度発癌集積家系が4例認められた。（小池班長）。

（4）HCVの複製増殖を許容するHuh7細胞およびその亜細胞株であるHuh7.5.1細胞株を用いて、本来の宿主であるヒト血清添加の影響を検討した。HCVの培養条件を検討した結果、低濃度のヒト血清を用いることにより、培地中のコア蛋白質濃度が高くなることを見いだした。HCV複製機序に関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（脇田班員）。

（5）アジア地域に蔓延する様々なHCV genotype間のインターフェロン（IFN）反応性の違いを検討した。ヒト肝細胞キメラマウスにgenotype 1型、2a型、2b型、5型および6型のC型肝炎患者血清を経静脈的に投与し、マウス血中HCV RNA量を測定した。HCV感染の確認後、IFN- α 、PegIFN- α または PegIFN- λ を2~4週間、筋肉注射した。Genotype 5型は他のgenotypeに比べてマウスへの感染率が低く、今後は血清採取時期や保存法の検討が

必要と思われた。Genotype 2a および 2b型は1型に比べIFN投与後の血中ウイルス低下量が多く、IFN反応性が高いことが示された。Genotype 6型は1型に比べPegIFN- α および PegIFN- λ 投与後の血中ウイルス低下量が多く、IFN反応性が高い可能性が示された（茶山班員）。

（6）アジアの発展途上国では適切な予防策がいまだに確立されておらず、公衆衛生システム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、予防目的のための健康保険もないアジアの発展途上国では、そういった予防策をそのまま適用することは困難である。バングラデシュ国民のHEVジェノタイプがほとんど知られていないため、バングラデシュ国内で発生した急性E型肝炎の突発的流行に関する200例から血清検体の収集を行った。その結果、バングラデシュで採取したHEVは全てジェノタイプIであった。バングラデシュにおけるCHBに関する3年間にわたる免疫学的研究、及び発症と治療についての調査から、バングラデシュの社会的・経済的状況と先進国で採用されてきた抗ウイルス剤（NA）を用いた治療法が相いれないことは明白である。こうしたことから、新たな科学的証拠に基づいた治療法、すなわち免疫療法がバングラデシュで開始された。第一相・第二相臨床試験は安全であり、ワクチンを用いた免疫療法の高い治療効果を確認した。この1年間、第三相臨床試験が二つの治療群のもとに着手されている。一つはHBsAg/HBcAg 混合ワクチンを接種した

群、もう一つは対照群としてペグインターフェロンを投与した群を設定している。投与は終了し、現段階ではワクチン治療の効果が明らかになることを観察している (Akbar 班員)。

(7) アジアにおいて多数の患者数が認められる肝炎ウイルス関連疾患における発現遺伝子解析を行い、その特徴を明らかにした。肝細胞がんは多様な遺伝子発現を示すが、EpCAM、CD90 および AFP と幹細胞性との関連が示された。その発現様式によって血管侵襲あるいは転移、さらには予後が規定されていた。この分子と MRI による肝細胞がんの画像所見との関連が示された。また、肝硬変症においては栄養に係わる遺伝子発現の違いがインターフェロン治療の反応性を規定していることも示された (金子班員)。

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進展し、主に経済的な理由から、一つの「ジャンボミーティング」を開催して同時に部会を開催するという方針となった。今年も、肝炎部会、ウイルス感染部会、AIDS 部会、呼吸器感染症部会が同時に部会を行なった。肝炎部会はアジアにおける B 型肝炎の制圧に向けた部会を開催し、大きな成果をあげることができた。アジアにおける B 型肝炎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こととした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 Jan 31. doi:pii: S0006-291X(13)00183-6. 10.1016/j.bbrc.2013.01.093. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23376718.
- 2) Hikita H, Enoku K, Satoh Y, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Tateishi R, Soroida Y, Sato M, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatol Res* 2013 Jan 3. doi:10.1111/hepr.12061. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23356977.
- 3) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki

- D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. *J Hepatol* 2013 Jan 12. doi:pii: S0168-8278(13)00011-1. 10.1016/j.jhep.2012.12.024. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23321320.
- 4) Gotoh H, Enooku K, Soroida Y, Sato M, Hikita H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Yamazaki T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement observed at a general health examination: A cross-sectional study. *Hepatol Res* 2012 Nov 27. doi: 10.1111/hepr.12029. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23279215.
- 5) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H. Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. *Hepatol Res* 2012 Nov 2. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01115.x. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23131000.
- 6) Ohki T, Isogawa A, Iwamoto M, Ohsugi M, Yoshida H, Toda N, Tagawa K, Omata M, Koike K. The effectiveness of liraglutide in nonalcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus compared to sitagliptin and pioglitazone. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:496453. Epub 2012 Aug 13. PubMed PMID:22927782.
- 7) Kurano M, Hara M, Tsuneyama K, Okamoto K, Iso-O N, Matsushima T, Koike K, Tsukamoto K. Modulation of lipid metabolism with the over-expression of NPC1L1 in mice liver. *J Lipid Res* 2012 Aug 13. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22891292.
- 8) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. *Hepatology* 2013;57:162-170. PubMed PMID: 22898998.
- 9) Hikita H, Nakagawa H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Yoshida H, Omata M, Soroida Y, Sato M, Gotoh H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2012 Jul 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790352.

- 10) Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2012 Jul 12. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790350.
- 11) Okushin K, Asaoka Y, Fukuda I, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Mikami S, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Tateishi R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Koike K. IGF-II producing hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: metabolic complications and a foresight to molecular targeting therapy to the IGF signal. *Case Rep Gastroenterol* 2012;6(3):784-789. PubMed PMID: 23341802.
- 12) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *J Infect Chemother* 2012;18(6):883-890. PubMed PMID: 22760340.
- 13) Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, Koike K, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:417-418. PubMed PMID: 22707340.
- 14) Shiina S, Tateishi R, Imamura M, Teratani T, Koike Y, Sato S, Obi S, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Omata M, Koike K. Percutaneous ethanol injection for hepatocellular carcinoma: 20-year outcome and prognostic factors. *Liver Int* 2012;32(9):1434-1442. PubMed PMID: 22712520.
- 15) Uchino K, Obi S, Tateishi R, Sato S, Kanda M, Sato T, Arano T, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Omata M, Yoshida H, Koike K. Systemic combination therapy of intravenous continuous 5-fluorouracil and subcutaneous pegylated interferon alfa-2a for advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2012;47(10):1152-1159. PubMed PMID: 22438097.
- 16) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Koike K. Mortality and morbidity of hepatectomy, radiofrequency ablation, and embolization for hepatocellular carcinoma: a national survey of 54,145 patients. *J Gastroenterol* 2012;47(10):1125-1133. PubMed PMID: 22426637.
- 17) Yoshikawa T, Takata A, Otsuka M, Kishikawa T, Kojima K, Yoshida H, Koike K. Silencing of microRNA-122 enhances interferon- α signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. *Sci Rep*

- 2012;2:637. Epub 2012 Sep 6. PubMed PMID: 22957141.
- 18) Mikami S, Tateishi R, Akahane M, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Computed Tomography Follow-up for the Detection of Hepatocellular Carcinoma Recurrence after Initial Radiofrequency Ablation: A Single-center Experience. *J Vasc Interv Radiol* 2012;23(10):1269-1275. doi:10.1016/j.jvir.2012.06.032. PubMed PMID: 22999746.
- 19) Nakagawa H, Isogawa A, Tateishi R, Tani M, Yoshida H, Yamakado M, Koike K. Serum gamma-glutamyltransferase level is associated with serum superoxide dismutase activity and metabolic syndrome in a Japanese population. *J Gastroenterol* 2012;47(2):187-194. PubMed PMID: 21976134.
- 20) Soroida Y, Ohkawa R, Nakagawa H, Satoh Y, Yoshida H, Kinoshita H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Shiina S, Sato T, Obi S, Hoshino T, Nagatomo R, Okubo S, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased activity of serum mitochondrial isoenzyme of creatine kinase in hepatocellular carcinoma patients predominantly with recurrence. *J Hepatol* 2012;57(2):330-336. PubMed PMID:22521349.
- 21) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Kudo Y, Goto T, Yoshida H, Koike K. A miRNA machinery component DDX20 controls NF- κ B via microRNA-140 function. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;420(3):564-569. PubMed PMID: 22445758.
- 22) Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Arano T, Uchino K, Enooku K, Goto E, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Goto T, Ikeda H, Shiina S, Omata M, Koike K. Assessment of disease progression in patients with transfusion-associated chronic hepatitis C using transient elastography. *World J Gastroenterol* 2012;18(12):1385-1390. PubMed PMID: 22493553; PubMed Central PMCID: PMC3319966.
- 23) Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci* 2012;103(4):670-676. PubMed PMID: 22320381.
- 24) 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.* 2012;47(4):477-485.
- 25) 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* 2012;107(4):569-577. PubMed PMID: 22158026.
- 26) 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.* 2012;47(1):71-78. PMID: 21935635.
- 脇田隆字
- 1) Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K, Kohara M. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS One.* 2012;7(12):e51656.
- 2) Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect.* 2013 15(1):45-55.
- 3) Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. *Gastroenterology.* 2013;144(1):56-58.e7.
- 4) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. *J Virol.* 2012 86(19):10805-20.
- 5) Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology.* 2012 432(1):29-38.
- 6) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 2012;8(3):e1002561.
- 7) Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. *Microbiol Immunol.* 2012 56(5):308-17.

- 1) Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K and Ohdan H. Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19: 418-425.
- 2) Suzuki Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Hu W, Eley T, McPhee F, Hughes E and Kumada H. Dual Oral Therapy with Daclatasvir and Asunaprevir for Patients with HCV Genotype 1b Infection and Limited Treatment Options. *J Hepatol.* 2012; In press.
- 3) Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA and Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med.* 2012; 18: 281-285.
- 4) Ohnishi M, Tsuge M, Kohno T, Zhang Y, Abe H, Hyogo H, Kimura Y, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Tanaka S, Arihiro K and Chayama K. IL28B polymorphism is associated with fatty change in the liver of chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 834-844.
- 5) Ochi H, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Uchiyama T, Kamatani N, Nakamura Y and Chayama K. Toward the establishment of a prediction system for the personalized treatment of chronic hepatitis C. *J Infect Dis.* 2012; 205: 204-210.
- 6) Nagaoki Y, Aikata H, Kobayashi T, Fukuhara T, Masaki K, Tanaka M, Naeshiro N, Nakahara T, Honda Y, Miyaki D, Kawaoka T, Takaki S, Tsuge M, Hiramatsu A, Imamura M, Hyogo H, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H and Chayama K. Risk factors for the exacerbation of esophageal varices or portosystemic encephalopathy after sustained virological response with IFN therapy for HCV-related compensated cirrhosis. *J Gastroenterol.* 2012; In press.
- 7) Murakami E, Aikata H, Miyaki D, Nagaoki Y, Katamura Y, Kawaoka T, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Takahashi S, Kimura T, Kenjo M, Nagata Y, Ishikawa M, Kakizawa H, Awai K and Chayama K. Hepatic arterial infusion chemotherapy using 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma in combination with or without three-dimensional conformal radiotherapy to venous tumor thrombosis in hepatic vein or inferior

- vena cava. *Hepatol Res.* 2012; 42: 442-453.
- 8) Miki D, Ohishi W, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Tsuge M, Imamura M, Kamatani N, Nakamura Y and Chayama K. Serum PAI-1 is a novel predictor for response to pegylated interferon-alpha-2b plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2012; 19: e126-133.
- 9) Matsuo J, Mizui M, Okita H, Katayama K, Aimitsu S, Sakata T, Obayashi M, Nakanishi T, Chayama K, Miyakawa Y, Yoshizawa H, Tanaka J and for the Hiroshima Hepatitis Study G. Follow up of the 987 blood donors found with hepatitis C virus infection over 9-18 years. *Hepatol Res.* 2012; 42: 637-647.
- 10) Kumada H, Toyota J, Okanoue T, Chayama K, Tsubouchi H and Hayashi N. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naive patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol.* 2012; 56: 78-84.
- 11) Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Miyakawa Y and Kumada H. Association of two polymorphisms of the IL28B gene with viral factors and treatment response in 1,518 patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 596-605.
- 12) Kawaoka T, Takahashi S, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Onoe T, Tashiro H, Ohdan H and Chayama K. Interleukin-28B single nucleotide polymorphism of donors and recipients can predict viral response to pegylated interferon/ribavirin therapy in patients with recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27: 1467-1472.
- 13) Karino Y, Toyota J, Ikeda K, Suzuki F, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Hernandez D, Yu F, McPhee F and Kumada H. Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. *J Hepatol.* 2012; In press.
- 14) Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Moriwaki H, Adachi H, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M and Kumada H. Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFNalpha-2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide

- multicenter cooperative study. *J Gastroenterol.* 2012;In press.
- 15) Hayes CN, Imamura M, Aikata H and Chayama K. Genetics of IL28B and HCV-response to infection and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012; 9: 406-417.
- 16) Hayashi N, Okanoue T, Tsubouchi H, Toyota J, Chayama K and Kumada H. Efficacy and safety of telaprevir, a new protease inhibitor, for difficult-to-treat patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2012; 19: e134-142.
- 17) Chayama K, Takahashi S, Toyota J, Karino Y, Ikeda K, Ishikawa H, Watanabe H, McPhee F, Hughes E and Kumada H. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *Hepatology.* 2012; 55: 742-748.
- 18) Chayama K, Hayes CN, Ohishi W and Kawakami Y. Treatment of chronic hepatitis C virus infection in Japan: update on therapy and guidelines. *J Gastroenterol.* 2012;In press.
- 19) Chayama K, Hayes CN and Imamura M. Impact of interleukin-28B genotype on in vitro and in vivo systems of hepatitis C virus replication. *Hepatol Res.* 2012; 42: 841-853.
- 20) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y and Kumada H. Amino acid substitution in HCV core/NS5A region and genetic variation near IL28B gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy. *Intervirology.* 2012; 55: 231-241.
- 21) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y and Kumada H. Amino acid substitution in HCV core region and genetic variation near the IL28B gene affect viral dynamics during telaprevir, peginterferon and ribavirin treatment. *Intervirology.* 2012; 55: 417-425.
- 22) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K and Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *J Infect Chemother.* 2012;In press.
- 23) Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H and Chayama K. Severe necroinflammatory

- reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology*. 2012; 56: 555-566.
- 24) Ohishi W and Chayama K. Treatment of chronic hepatitis B with nucleos(t)ide analogues. *Hepatology Res*. 2012; 42: 219-225.
- 25) Nagaoki Y, Hyogo H, Aikata H, Tanaka M, Naeshiro N, Nakahara T, Honda Y, Miyaki D, Kawaoka T, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S and Chayama K. Recent trend of clinical features in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology Res*. 2012; 42: 368-375.
- 26) Miki D, Ochi H, Hayes CN, Aikata H and Chayama K. Hepatocellular carcinoma: towards personalized medicine. *Cancer Sci*. 2012; 103: 846-850.
- 27) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsushashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y and Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology Res*. 2012; 42: 139-149.
- 28) Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W and Chayama K. Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. *PLoS One*. 2012; 7: e47490.
- 29) Fujimoto A, (この間 32 人) , Chayama K, Yamaue H, Kamatani N, Miyano S, Nakagama H, Nakamura Y, Tsunoda T, Shibata T and Nakagawa H. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet*. 2012; 44: 760-764.
- アクバル シェイク MF
- 1) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Strong and multi-antigen specific immunity by hepatitis B core antigen (HBcAg)-based vaccines in a murine model of chronic hepatitis B: HBcAg is a candidate for a therapeutic vaccine against hepatitis B virus. *Antiviral Res*. 2012; 96(1):59-64.
- 2) Akbar SM, Hiasa Y, Al-Mahtab M, Onji M. Dendritic cell-based immune therapy in liver diseases. *Current Immunology Review* 2012; 8(1): 28-36.
- 3) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Abe M, Yoshida O, Iheda Y, Hiasa Y, Onji M. Suppression of inflammatory mucosal milieu by administration of regulatory

- dendritic cells in an animal model of primary biliary cirrhosis. *Euroasian J Hepato-Gastroenterology* 2012 ;2: 30-34.
- 4) Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S, Kamal M, Khan MSI. Biochemical, virological, immunological and histopathological features of 702 incidentally detected chronic hepatitis B virus carriers in Bangladesh. *Digestion* 2012; 86 (1): 1-5.
- 5) Hoshino H, Hino K, Miyakawa H, Takahashi K, Akbar SM, Mishiro S. Inter-genotypic recombinant hepatitis C virus strains in Japan noticed by discrepancies between immunoassay and sequencing. *J Med Virol* 84: 1018-1024
- 6) Khan MSI, Akbar SM, Hossain ST, Mahtab M, Hossain MM, Idris Z. Possible route of transmission of highly pathogenic avian influenza virus type H5N1 in family poultry at rural Bangladesh. *Pakistan Veterinary Journal* 2012; 31 (1): 112-116.
- 7) Miyashita K, Kang J-H, Saga A, Takahashi K, Shimamura T, Yasumoto A, Fukushima H, Sogabe S, Konishi K, Uchida K, Fujinaga A, Matsui T, Sakura Y, Tsuji T, Maguchi H, Taniguchi M, Abe N, Akbar SM, Arai M, Mishiro S. Three Cases of Acute or Fulminant Hepatitis E Caused by Ingestion of Pork Meat and Entrails in Hokkaido, Japan; Zoonotic Food-Borne Transmission of Hepatitis E Virus and Public Health Concerns. *Hepatol Res.* 2012; 42(9):870-878.
- 8) Onji H, Koizumi Y, Hanayama M, Akbar SM, Hirooka M, Tokumoto Y, Abe M, Hiasa Y, Aoto M, Mitsuda N, Onji M. A Case of de novo Hepatitis B Complicated due to Lack of Comprehensive Interventional Approach. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology* 2012; 2(2):122-125.
- 9) Hossain MF, Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S. Serum aspartate transaminase platelet ratio index (APRI) in patients with non-alcoholic fatty liver disease in Bangladesh. *KMUJ* 2012; 4(2):48-52.
- 金子周一
- 1) T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, M Baba, K Nio, Y Hara, SS Zeng, TH Kondo, H Takatori, T Yamashita, E Mizukoshi, H Ikeda, Y Zen, H Takamura, XW Wang, S Kaneko. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (in press)
- 2) E Mizukoshi, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, T Ueda, F Arihara, T Kagaya, T Yamashita, K Fushimi, S Kaneko. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma.

Hepatology (in press)

- 3) A Kitao, O Matsui, N Yoneda, K Kozaka, S Kobayashi, W Koda, T Gabata, T Yamashita, S Kaneko, Y Nakanuma, R Kita, S Arii. Hypervascular Hepatocellular Carcinoma: Correlation between Biologic Features and Signal Intensity on Gadoteric Acid-enhanced MR Images. Radiology 2012;265(3):780-9.
- 4) E Mizukoshi, K Fushimi, K Arai, T Yamashita, M Honda, S Kaneko. Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. Liver Int 2012;32(10):1516-26.

2. 学会発表

- 1) Akbar SM, Chen S, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Myeloid-derived suppressor cells: a critical regulator of intrahepatic immunity in chronic HBV infection. 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Taipei, Taiwan, 16th-19th February 2012
- 2) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Hiasa Y, Onji M. Mechanism underlying insignificant therapeutic effects of combination of antiviral and vaccine therapy in patients with chronic hepatitis B: need of maintenance of hepatitis B core antigen-specific immune responses. 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Taipei, Taiwan, 16th-19th February 2012
- 3) Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S. Response to combination therapy with shorter duration 'half dose pegylated interferon and entecavir' in chronic hepatitis B in Bangladesh. 47th Annual meeting of the European Association for the Study of the Liver, Barcelona, Spain, 18th-22nd April 2012
- 4) Akbar SM and Al-Mahtab. Bridging clinical outcome with immunological events for preclinical and clinical trial. 6th Annual World Vaccine Congress Asia 2012, Singapore, 11th-14th June 2012
- 5) Akbar SM, Al-Mahtab M, Aguilar J, Onji M, Mishiro S. Activation of Dendritic Cells and Induction of Antigen-Specific Immunocytes by a Therapeutic Vaccine Containing Both HBsAg and HBcAg Administered Through Nasal Route in Chronic Hepatitis B; A Patient-Friendly and Evidence-Based Therapeutic Approach. 14th International Symposium on Viral Hepatitis and liver Disease (ISVHLD), Shanghai, China, 22nd-25th June 2012
- 6) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Hiasa Y, Onji M. HBsAg-specific immune responses by HBcAg-pulsed dendritic cells: Role of antigen and adjuvant in therapeutic vaccine against chronic hepatitis B. 14th International Symposium on Viral Hepatitis and liver Disease (ISVHLD), Shanghai, China, 22nd-25th June 2012

- 7) Akbar SM. Designing and Engineering Immune Therapy Against Chronic HBV infection. 9th Turkish Hepato Gastroenterology Congress, Cyprus, Turkey, 26th - 30th September 2012
- 8) Akbar SM. Immune pathogenesis of HBV-related liver damages. APASL 3rd Single Topic Conference on HBV. Dhaka, Bangladesh, 6th -7th October 2012
- 9) Akbar SM. Immune responses and immune therapy in HCC. 6th Annual Meeting of Pakistan Society for the Study of Liver Diseases. Karachi, Pakistan, 14th -16th December 2012
- 10) Akbar SM. Treatment: What is new in pipeline-Therapeutic vaccine for hepatitis B. 6th Annual Meeting of Pakistan Society for the Study of Liver Diseases. Karachi, Pakistan, 14th -16th December 2012

I. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

分担研究報告書

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・肝臓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型肝炎ウイルスの培養細胞における複製増殖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。しかし、培養細胞におけるウイルス増殖は必ずしも効率が良いとは言えない。そこで、より良い培養条件の検討をおこなった。

B. 研究方法

HCVの複製増殖を許容するHuh7細胞およびその亜細胞株であるHuh7.5.1細胞株を用いた。培養液に添加する血清としてウシ胎児血清(FCS)と市販のヒト血清(HS)を使用した。HSはヒトAB血清とプール血清を比較した。JFH-1株の合成全長遺伝子を細胞にトランスフェクションした後2%FCSまたは2%HSを含む培地で培養した。7日後に細胞を経代し、その後は培地の交換のみで、培地中のウイルス蛋白産生

を観察した。

(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、個人情報等を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

トランスフェクション後2%のFCSまたはHSで培養すると、約1週間で細胞は分裂をほぼ停止した。培地の交換を3-4日毎に約2ヶ月間継続した。培地中のコア蛋白