

用い、HCV 感染の自然予後、とくに HCV 自然治癒と肝発癌、ALT 値との関連について、その関連因子を解析した。

B. 研究方法

1991 年から 1995 年まで C 型肝炎高浸淫地域住民 7,925 名を対象に HCV 抗体検査を行ったところ、HCV 抗体陽性者は 1,078 名 (HCV 抗体陽性率 13%) であった。これら全員に対し、自記式質問票による感染要因調査、身長、体重、BMI、血液生化学検査、HCV 抗体、HCV genotype、HCV RNA (TaqMan) などのほか、専門医による腹部超音波を用いた肝がん検診を行い、さらに同意を得られた住民においては IL-28B 遺伝子多型 (rs8099917) を測定した。

これら 1,078 名のうち、HBs 抗原陽性例やインターフェロン治療例、30 歳未満の若年者および 80 歳以上の高齢者を除いた 913 名について自然治癒関連因子を解析した。またコホート開始から 20 年間の HCV 抗体陽性者の肝発癌調査、ALT 値変動、生命予後調査を行った。

C. 研究結果

TaqMan HCV による HCV RNA 自然陰性化は 66 例で認められ、人年法による解析では、0.6%/year person の頻度で HCV が自然治癒している可能性があることが明らかとなった。本コホートにおける HCV 抗体陽性例 1,078 名全体の IL-28B 遺伝子多型の頻度は、メジャーホモタイプ (T/T) が 877 例 (81.4%)、ヘテロタイプ (T/G) が 183 例 (17.0%)、マイナーホモタイプ (G/G) が 18 例 (1.6%) であったが、IL-28B 遺伝子多型の頻度と HCV 自然治癒との関係を検討したところ、HCV 自然治癒群においてはメジャーホモタイプが 65 / 66 (96.7%) を占め、その頻度が有意に高

く、一方 HCV 持続感染群においてはメジャーホモタイプ 75.1%、ヘテロ/マイナータイプ 24.9% と、ヘテロ/マイナータイプの頻度が有意に高かった。さらに HCV 自然治癒に関連する因子を多変量解析したところ、IL-28B 遺伝子多型が最も重要な因子であり (ハザード比 10.83, 95%CI: 2.64 - 44.4, $p < 0.01$)、ほかに ZTT 値などが独立した自然治癒関連因子であった。

本コホートにおける累積肝発癌率を Kaplan-Meier 法で検討すると、男性、ALT 値 31 単位以上、genotype 1b、BMI 23 以上の場合において有意に肝発癌率が高かった。とくに初回受診時 ALT 値を層別化し、その後の肝発癌リスクをみてみると、初回受診時 ALT 値 ≤ 30 IU/L の群に比べ、ALT 値 ≥ 31 IU/L、ALT 値 ≥ 61 IU/L の群においてそれぞれ有意に肝発癌率が高かった ($P < 0.001$)。肝発癌例 78 例と非発癌例 819 例を比較すると、男性、BMI 高値例、肝機能異常例、HCV RNA 持続陽性例、超音波検査で慢性肝疾患所見を有する例などにおいて発癌が多くみられ、IL-28B 遺伝子多型との関連では肝発癌例における IL-28B ヘテロ/マイナーの頻度が 27% を占める一方、非発癌例では 17% とその頻度に差を認めた。

さらにこれまでの研究成果から、本コホートにおける HCV 自然治癒例では肝機能検査値が低い例が多くみられたことから、観察開始から 20 年間の ALT 値の推移を検討した。1991 年のコホート開始から 1995 年までのスクリーニング期において、HCV RNA 陽性であった 600 名の ALT 値をみてみると、初回受診時 ALT 値 31 IU/L 以上が 181 名 (28%)、ALT 値 30 IU/L 以下が 469 名 (72%) であった。このうち ALT 値 30 IU/L 以下の住民の ALT 値を、1996 年から現在まで追跡すると、ALT

値が 31 IU/L 以上となったのは 117 名 (25%)、ALT 値が持続的に 30 IU/L 以下であったのは 352 名 (75%) であった。そこで ALT 値の上昇がみられた群と ALT 値持続正常群において、宿主因子 IL-28B の遺伝子多型を調べてみると、ALT 値持続正常群では IL-28B メジャーホモタイプが 299 例 (85%) と、ALT 値上昇群 87 例 (75%) に比し、その頻度が有意に高かった ($P < 0.01$)。

一方、関連自治体の協力を得、死亡診断書をもとに過去 20 年の HCV 抗体陽性 1,078 名の生命予後調査と死因調査を行ったところ、HCV RNA 陽性者は陰性者に比べ肝疾患関連死の頻度が高かった (13.4% vs. 4.5%; $P < 0.01$)。これを性別でみると、男性が女性より総死亡に占める肝疾患関連死の頻度が高かったが、有意差はなかった (12.4% vs. 7.3%)。

D. 考察

慢性感染におけるウイルス自然消失にはさまざまなウイルス側因子、宿主側因子が影響すると考えられているが、そのほとんどは患者コホートによるものである。30 歳以上 80 歳未満のインターフェロン治療歴のない住民ベースの肝炎コホートにおいては、IL-28B 遺伝子多型が最も自然治癒に関連した因子であった。

さらに、HCV 感染住民の ALT 値の 20 年間の推移を検討したところ、住民コホートという性格上採血間隔に限りはあるものの、ALT 値持続正常例では ALT 値変動例に比べ、IL-28B 遺伝子多型のメジャーホモタイプが多くみられた。これまでの当班研究において、本コホートの HCV 持続感染例における自然治癒例では、IL-28B メジャーホモタイプが有意に多くみられたことから、宿主因子が ALT 値の変動とも関連がある可能性が示唆さ

れた。

また肝炎コホートからの肝発癌例について検討すると、IL-28B ヘテロ/マイナータイプの頻度が肝発癌例において高い結果であった。HCV 感染に伴う肝発癌と IL-28B 遺伝子多型との関連はいまだ結論に至っていないが、これらヘテロ/マイナータイプにおいては自然経過あるいは抗ウイルス治療による HCV 排除が得られにくいことが発癌と関連している可能性が考えられた。最近、HCV 感染経過に関わる複数の宿主因子が報告されているが、宿主の遺伝子多型は、報告されているような抗ウイルス治療効果予測因子であるばかりでなく、C 型肝炎の病態に密接に関連している可能性がコホート研究からも示された。

HCV 抗体陽性者 1,078 名の生命予後調査からは、これまでの患者コホートにおける検討と同様、HCV RNA 陽性者において有意に肝疾患関連死が多く、HCV 感染住民においてもウイルス血症に対する抗ウイルス治療の積極的な介入および定期的なマネージメントが不可欠であることを示唆するものと考えられた。

E. 結論

一般住民における肝炎コホートにおいて、IL-28B 遺伝子多型は、HCV 感染者の感染自然予後を規定する宿主因子であることが示唆された。また治療による HCV 排除と肝炎鎮静化が、肝発癌防止、生命予後の改善に重要であることが住民コホート研究からも示された。地域に潜在する HCV 感染者は肝癌ハイリスクグループであり、将来的には宿主因子を含めた肝炎自然予後予測が可能になることを期待したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe H, Wells F, and Major ME: Clearance

- of hepatitis C in chimpanzees is associated with intrahepatic T-cell perforin expression during late acute phase. *J Viral Hepatitis* 17: 245-253, 2010.
2. Haga H, Saito T, Okumoto K, Ugajin S, Sato C, Ishii R, Nishise Y, Ito J, **Watanabe H**, Saito K, Togashi H, Kawata S: Enhanced expression of fibroblast growth factor 2 in bone marrow cells and its potential role in the differentiation of hepatic epithelial stem-like cells into the hepatocyte lineage. *Cell Tissue Res* 343: 371-378, 2010.
 3. Sanjo M, Saito T, 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. Nishise Y, Saito T, Makino N, Okumoto K, Ito J, **Watanabe H**, Saito K, Togashi H, Ikeda C, Kubota I, Daimon M, Kato T, Fukao A, Kawata S: Relationship between alcohol consumption and serum adiponection levels: the Takahata study- a cross-sectional study of a healthy Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 3828-3835, 2010.
 5. Hattori E, Shu HJ, Saito T, Okumoto K, Haga H, Yokozawa J, Ito J, **Watanabe H**, Saito K, Togashi H, Kawata S: Expression of the RNA-binding protein Musashi1 in adult liver stem-like cells. *Hepatology Res* 40: 432-437, 2010.
 6. 渡辺久剛、斎藤貴史、西瀬雄子、邵力、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、奥本和夫、斎藤孝治、富樫 整、新沢陽英、河田純男：HCV コホート研究による持続感染者の自然経過。HCV 感染の natural course を探る：わが国におけるコホート研究（河田純男監修、佐田通夫・新沢陽英・斎藤貴史編）p45-50, 山形大学出版, 山形, 2011.
 7. Kachko A, Kochneva G, Sivolobova G, Grazhdantseva A, Lupan T, Zubkova I, Wells F, Merchlinsky M, Williams O, **Watanabe H**, Ivanova A, Shvalov A, Loktev V, Netesov S, Major M: New neutralizing antibody epitopes in hepatitis C virus envelope glycoproteins are revealed by dissecting peptide recognition profiles. *Vaccine* 30: 69-77, 2011
 8. 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, Saito T, 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: 896-905, 2011
 9. 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: 418-426, 2011
 10. Saito T, 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: 1503-1510, 2011.
 11. Ishii R, Togashi H, Iwaba A, Sato C, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito J, **Watanabe H**, Saito K, Okada A, Takahashi K, Saito T, 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: 520-523, 2011
 12. 渡辺久剛、斎藤貴史、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, 753-755, 2011.
 13. 渡辺久剛、斎藤貴史、富田恭子、佐藤智佳子、芳賀弘明、石井里佳、奥本和夫、西瀬雄子、新澤陽英、河田純男：遺伝子多型を含めたHCVコホート研究。肝胆膵 63(6): 877-885, 2011.
 14. 渡辺久剛、河田純男：C型肝炎の自然経過。日本臨床「新時代のウイルス肝炎学」69(4): 23-28, 2011.
 15. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang DP, 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* 84: 229-234, 2012.
 16. 渡辺久剛、斎藤貴史、河田純男：肝炎コホートにおけるHCV自然治癒および肝発癌関連因子から見たC型慢性肝炎に対する個別化医療の可

能性. 消化器内科 55 (2) : 248-252, 2012.

2. 学会発表

1. **Watanabe H**, Saito T, Ishii R, Sato C, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito J, Saito K, Kawata S: Incidence of hepatocellular carcinoma after achieving sustained virological response to interferon therapy for chronic hepatitis C. The 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, November 2010.
2. **Watanabe H**, Wells F, Saito T, Sato C, Ishii R, Haga H, Sanjo M, Okumoto K, Nishise Y, Ito J, Saito K, Kawata S, and Major ME: Clearance of hepatitis C virus in chimpanzees is associated with intrahepatic perforin expression during the late acute phase. 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona, Spain, October 2010.
3. **渡辺久剛**、斎藤貴史、西瀬雄子、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、三條麻衣、奥本和夫、伊藤純一、斉藤孝治、富樫 整、新澤陽英、河田純男：B型肝炎ジェノタイプB型高浸淫地域における急性B型肝炎の実態. 第14回日本肝臓学会大会, 2010年10月.
4. **渡辺久剛**、斎藤貴史、西瀬雄子、邵 力、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、三條麻衣、奥本和夫、伊藤純一、斉藤孝治、石橋正道、富樫 整、新澤陽英、河田純男：HCV コホート研究による持続感染者の自然経過. 第46回日本肝臓学会総会サテライトシンポジウム「HCV 感染の natural course を探る：わが国におけるコホート研究」, 2010年5月.
5. **渡辺久剛**、斎藤貴史、西瀬雄子、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、三條麻衣、奥本和夫、伊藤純一、斉藤孝治、富樫 整、新澤陽英、河田純男：HCV コホートにおけるウイルス自然治癒および肝発癌の検討. 第46回日本肝臓学会総会, 2010年5月.
6. **Watanabe H**, Saito T, Sato C, Ishii R, Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Shinzawa H, and Kawata S. A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus (HCV) RNA in a population-based, long-term cohort study of chronic HCV carriers. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, November 2011.
7. Nishise Y, Saito T, Sato C, Ishii R, Haga H, Okumoto K, **Watanabe H**, Togashi H, Hotta H, and Kawata S. Hepatocellular carcinoma and secondary structure of hepatitis C virus (HCV) NS3 protein amino-terminus among patients received peginterferon plus ribavirin combination therapy for chronic HCV subtype 1b infection. The 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, San Francisco, November 2011.
8. **渡辺久剛**、斎藤貴史、河田純男：肝炎コホートにおけるHCV自然治癒および肝発癌関連因子からみたC型慢性肝炎に対する個別化医療の可能性. シンポジウム「C型肝炎個別化医療のための宿主因子、ウイルス因子」第53回日本消化器病学会大会、福岡；2011年10月
9. **渡辺久剛**、斎藤貴史、佐藤智佳子、石井里佳、芳賀弘明、奥本和夫、西瀬雄子、斉藤孝治、富樫整、河田純男：急性B型肝炎におけるジェノタイプA型感染の実態と臨床経過 第47回日本肝臓学会総会、東京；2011年6月
10. **Watanabe H**, Saito T, Katsumi T, Tomita K, Sato C, Ishii R, Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Suzuki Y, Suzuki K, Ishibashi M, Saito K, Shinzawa H, Ueno Y and Kawata S. Pegylated interferon plus ribavirin therapy is associated with improvement of the serum adiponectin and insulin resistance in patients with genotype 1b chronic hepatitis C. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 2012.
11. **Watanabe H**, Saito T, Tomita K, Sato C, Ishii R, Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Ueno Y and Kawata S. Transition in hepatitis B virus genotypes responsible for acute hepatitis B in a hyperendemic area for genotype B infection – 20 years follow-up study in Japan. DDW2012, San Diego, USA, May 20, 2012
12. **渡辺久剛**、斎藤貴史、河田純男：地域コホート研究からみたC型肝炎ウイルス持続感染者の自然史 第16回日本肝臓学会大会、神戸；2012年10月
13. 佐藤智佳子、**渡辺久剛**、上野義之：非アルコール性脂肪性肝障害を基盤とした肝癌症例の臨床的特徴 第16回日本肝臓学会大会、神戸；2012年10月11日
14. **渡辺久剛**、石井里佳、斎藤貴史、新澤陽英、河田純男、上野義之：肝炎患診療連携拠点病院を

中心とした山形県肝炎診療の現状と医療費助成
制度によるアウトカム. 第48回日本肝臓学会総
会、金沢；2012年6月

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ウイルス肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた
情報のデータベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者：坂本 直哉 北海道大学大学院医学研究科 消化器肝臓病学・消化器内科 教授
(前職;東京医科歯科大学・分子肝炎制御学講座 准教授)

分担研究課題：宿主遺伝子に関連した治療抵抗性機構の解析

研究要旨：我々は機能が未知である IFN λ s の働きを解明し、その作用を増強する薬剤をすることを目的として研究を遂行している。今回我々はインターフェロン作用を増強する化合物のスクリーニングを遂行し、植物界に広く分布するトリテルペノイド化合物の一つである toosendanin に HCV 増殖抑制効果および interferon 作用増強効果があることを見いだした。HCV レプリコン細胞に toosendanin 存在下で 24 時間培養後インターフェロン α を添加することにより、ISG 発現増強とともに HCV 増殖が相乗的に抑制された。さらに IFN λ 下流のシグナルを亢進することも確認された。以上の結果より Toosendanin 関連化合物は IFN 作用増強薬として有用である可能性が示唆された。

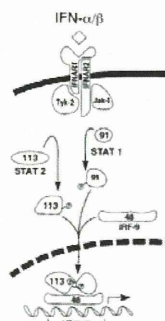
A. 研究目的

現在まで多くの抗 HCV 薬の開発が行われているがインターフェロン α は今なお、抗 HCV 薬の key drug である。我々は、独自に開発した HCV 培養増殖系を用い、抗ウイルス薬感受性に関わる宿主蛋白の探索、機能解析を進め、新たな抗ウイルス療法を開発することを目的として研究を遂行している。本研究において坂本は、ランダム合成化合物ライブラリーの High-throughput screening (HTS)により、IFN- λ レセプター下流のシグナルを制御する小分子を探索し、植物界に広く分布するトリテルペノイド化合物の一つである toosendanin に HCV 増殖抑制効果および interferon 作用増強効果があることを見いだしたのでその作用機構を解析した。

ISRE-Reporterを用いたIFN- α 作用増強薬のスクリーニング

ISRE-Luciferase

- 1日目 細胞播種
- 2日目 transfection (pISRE TA luc, pRL-CMV)
- 3日目 候補化合物添加
- 4日目 IFN α 添加
6時間後、ルシフェラーゼ発光測定



B. 研究方法

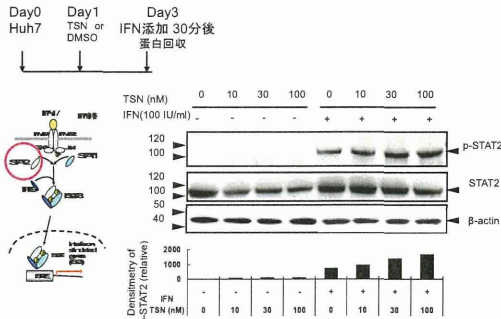
(1) Toosendanin を Huh751/1b レプリコン発現細胞 (Huh7/Rep-Feo) に添加し、IFN 併用・非併用下での HCV 増殖抑制効果を評価し、50%作用濃度 (EC50)を算出した。同時に細胞毒性試験として MTSassay により 50%毒性濃度 (CC50)を測定した。インターフェロン効果は ISRE-luciferase リポーターアッセイにて評価し、ISGF3 の成分である STAT1、STAT2、IRF9 を real time RT-PCR にて、STAT1、STAT2 のリン酸化を Western blotting にて解析した。

(2) IL28B(IFN- λ 2)転写調節領域の下流にルシフェラーゼリポーター遺伝子を挿入したプラスミドベクターを HEK293 細胞に恒常的に導入した細胞株、293/IL28B を樹立し、ランダム合成化合物ライブラリー約 10,000 化合物の High-throughput screening (HTS)を行い、IFN- λ 発現を増強する化合物、および IFN- λ 依存性の遺伝子発現を増強する化合物を探索した。使用するライブラリーは炭素骨格を基本とし生体利用可能な化合物から構成される。

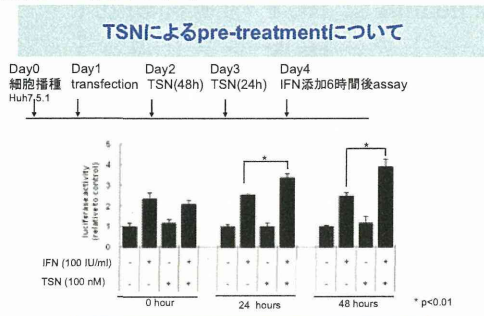
C. 研究結果

(1) Toosendanin は HCV レプリコンを細胞毒性を示さず特異的に抑制した (IC50=8ng/ml、CC50>30 μ g/ml、selectivity index>3.8 $\times 10^3$)。Toosendanin と IFN の併用は、それぞれの単独投

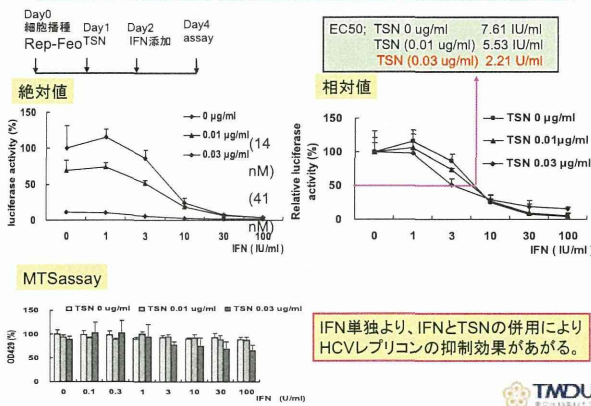
与に較べ低濃度で同等の HCV 増殖抑制効果が見られ、相乗的に作用すると考えられた。



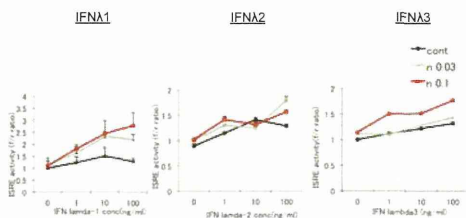
IFN による ISRE リポーター誘導能は Toosendanin 0.01~0.1μg/ml 併用下では有意に高く、IFN 作用を増強することが示された。Toosendanin 併用下では IFN による STAT2 リン酸化が増強した。



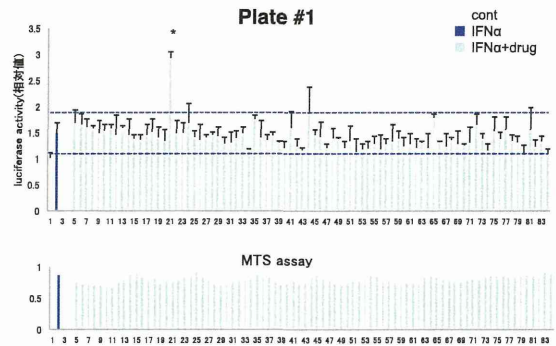
TSNとIFN併用におけるレプリコンへの効果①



Toosendanin 前投与 24 時間後に IFN-λ1、λ2、λ3 をそれぞれ添加したところ IFN 誘導性の ISRE リポーター活性の誘導がより顕著に見られ、Toosendanin は IFN-λ 下流のシグナルを亢進することが示された。



(2) HEK293/IL28B 細胞株を用いて、1,037 化合物の一次スクリーニングを終了し、IFN-λ (IL28B) プロモーター活性を亢進させる 68 化合物を同定した。



D. 考察

本研究で同定された IFNλ 発現を増強する化合物、および IFN-λ 依存性の遺伝子発現を増強する化合物を探索を継続し、同定された小分子の IFN-λ シグナル増強機構を解析することが必要と考えられる。さらに、独自に開発した HCV レプリコン系および HCV-JFH1 ウイルス培養系を用いて抗ウイルス効果の検証を行っていく。

E. 結論

Toosendanin は強力かつ特異的な HCV 複製抑制効果を認め、新規抗 HCV 治療薬としての可能性が示唆された。作用基序として、ISRE 活性の上昇およびその上流 STAT 2 のリン酸化が増加しており、ISG3 量体もしくはその上流に作用点があると考えられた。

F. 研究発表

[論文発表]

1. Kaushik-Basu N, **Sakamoto N**: Inhibition of hepatitis C virus NS5B polymerase by S-trityl-L-cysteine derivatives. *Eur J Med Chem* 2012; in press.
2. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, **Sakamoto N**, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Izumi N: Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther* 2011; in press.
3. Kusano-Kitazume A, **Sakamoto N**, Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S,

- Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M: Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother* 2011; Epub ahead of Print.
4. Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, **Sakamoto N**, Nakagawa M, Izumi N: Data Mining Analysis of Hepatocellular Carcinoma Risk Predictors in Chronic Hepatitis C. *J Hepatol* 2011; Epub ahead of Print.
 5. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, **Sakamoto N**, Izumi N: Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response. *Hepatology* 2011; 55(1):20-29.
 6. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, **Sakamoto N**, Watanabe M, Enomoto N: Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. *Hepatol Int* 2011; 5(3):789-799.
 7. Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, **Sakamoto N**, Matsuura Y, Mizuguchi H, Yagi K: Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 416(1-2):119-124.
 8. Takaya D, Yamashita A, Kamijo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, **Sakamoto N**, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S: A new method for induced fit docking (GENIUS) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011; 19(22):6892-6905.
 9. Ueyama M, Nakagawa M, **Sakamoto N**, Onozuka I, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Kitazume A, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Sekine-Osajima Y, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M, Ochanomizu-Liver Conference Study Group: Serum interleukin-6 levels correlate with resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon-alpha2b plus ribavirin. *Antivir Ther* 2011;16(7):1081-1091.
 10. Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, **Sakamoto N**, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M: Genome-wide association study identified ITPA/DDRGL1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Human Molecular Genetics* 2011; 20 (17):3507-3516.
 11. Hiramatsu N, Kurosaki M, **Sakamoto N**, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Sugauchi F, Tamori A, Kakinuma S, Matsuura K, and Izumi N: Pretreatment Prediction of Anemia Progression by Peginterferon Plus Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C: Decision-Tree Analysis. *J Gastroenterol* 2011; 46 (9): 1111-1119.
 12. Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, **Sakamoto N**, Watanabe M, Enomoto N: Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy. *PLoS One* 2011;6 (9):e24514.
 13. Kurosaki M, **Sakamoto N**, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsuhashi H, Izumi N: Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using data mining analysis. *J Gastroenterol* 2011; 46(3):401-409.
 14. Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, **Sakamoto N**, Yagi K: Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(10):e64.
 15. Funaoka Y, **Sakamoto N**, Suda G, Itsui Y,

- Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe T, Mishima K, Ueyama M, Onozuka I, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Watanabe M: Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. *J Virol* 2011; 85(12):5986-5994.
16. Watanabe T, **Sakamoto N**, Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Nishimura-Sakurai Y, Ueyama M, Funaoka Y, Kitazume A, Nitta S, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Oooka S, Watanabe M: Inhibitory effect of a triterpenoid compound, with or without alpha interferon, on hepatitis C virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(6):2537-2545.
 17. Yamamoto M, **Sakamoto N**, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Tsuchiya K, Kato T, Wakita T, Watanabe M: Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatol Res* 2011;41:258-269.
 18. Toyoda M, Kitaoka A, Machida K, Nishinakagawa T, Yada R, Kohjima M, Kato M, Kotoh K, **Sakamoto N**, Shiota G, Nakamura M, Nakashima M, Enjoji M: Association between lipid accumulation and the cannabinoid system in Huh7 cells expressing HCV genes. *Int J Mol Med* 2011;27:619-624.
 19. **Sakamoto N**, Nakagawa M, Tanaka Y, Sekine-Osajima Y, Ueyama M, Kurosaki M, Nishida N, Tamori A, Yuki NS, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Hiasa Y, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M: Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J Med Virol* 2011;83:871-878.
 20. Onozuka I, Kakinuma S, Kamiya A, Miyoshi M, **Sakamoto N**, Kiyohashi K, Watanabe T, Funaoka Y, Ueyama M, Nakagawa M, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Watanabe M: Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406:134-140.
 21. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, **Sakamoto N**, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M: Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol* 2011;54:439-448.
 22. Kurosaki M, **Sakamoto N**, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Tamori A, Nakagawa M, Izumi N: Sequences in the interferon sensitivity-determining region and core region of hepatitis C virus impact pretreatment prediction of response to PEG-interferon plus ribavirin: data mining analysis. *J Med Virol* 2011;83:445-452.
 23. **Sakamoto N**, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Honda M, Ito K, Mizokami M, Watanabe M. ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2010;40(11) :1063-1071.
 24. Suda G, **Sakamoto N**, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010;407(1) :80-90.
 25. Nakagawa M, **Sakamoto N**, Ueyama M, Mogushi K, Nagaie S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M. Mutations in the Interferon Sensitivity Determining Region and virological response to combination therapy with Pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection. *J Gastroenterol* 2010;45(6) :656-665.
 26. Mizui T, Yamashina S, Tanida I, Takei Y, Ueno T, **Sakamoto N**, Ikejima K, Kitamura T, Enomoto N, Sakai T, Kominami E, Watanabe S.

Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *J Gastroenterol* 2010;45(2) :193-203.

[総説]

1. 坂本直哉：インターロイキン 28-29(IL-28・IL-29) -インターフェロンλ. 臨床免疫・アレルギー科特集：サイトカインのすべて 2011 in press.
2. 坂本直哉：海外における DAA 開発臨床試験：最近の動向. 化学療法 2011; 63: 1112-1118, 2011.12.1 発行.
3. 坂本直哉：海外における DAA 開発臨床試験：最近の動向. 肝胆膵 2011; 63: 1112-1118, 2011.12.1 発行.
4. 須田剛生、坂本直哉：インターフェロン治療抵抗性に関わるサイトカイン. ネットワーク 肝胆膵 2011; 63: 1112-1118, 2011.12.1 発行
5. 藤田めぐみ、加藤孝宣、坂本直哉：HCV による自然免疫系の抑制機構：NS3、NS4B. 肝胆膵 2011; 63:1 107-1111, 2011.12.1 発行.
6. 箆島裕子、中川美奈、坂本直哉：HCV の複製・増殖機構と遺伝子型・遺伝子変異. 日本臨床 2011; 69:52-58.
7. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守：シクロフィリン阻害剤. 肝胆膵 2011;62:403-412.
8. 坂本直哉：STAT-C 多剤併用療法：脱インターフェロン治療なるか？ 肝胆膵 2011; 62:421-426.

[学会発表]

1. **Sakamoto N**, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Enomoto N, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Watanabe M: ITPA gene variant protects against treatment-induced anemia and improves viral clearance by pegylated interferon-alfa and ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #1016)
2. Kakinuma S, Kamiya A, **Sakamoto N**, Nakauchi H, Watanabe M: MMP-2 and MMP-14 derived from donor cells enhance therapeutic efficacy of liver cell transplantation in mice. 62th. Annual

Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #670)

3. Kusano-Kitazume A, **Sakamoto N**, Okuno Y, Yamamoto M, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyohashi K, Nitta S, Murakawa M, Hagiwara M, Watanabe M: A high-content screening assay using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus reveals candidates for small molecule inhibitors of viral entry. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #383)
4. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, **Sakamoto N**, Nakauchi H, Watanabe M: Loww of Wnt5A promotes biliary differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Oral presentation #176)
5. Itsui Y, **Sakamoto N**, Yauchi T, Watanabe M: Antiviral effect of a novel interferon-inducible protein, IFI-27, against hepatitis C virus replication. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #2086)
6. Suda G, **Sakamoto N**, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M: IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #2040)
7. Kurosaki M, Itakura J, Yasui Y, Tsuchiya K, Nakanishi H, Takahashi Y, Asahina Y, Tanaka Y, Mizokami M, **Sakamoto N**, Enomoto N, Izumi N: Prediction model of ribavirin-induced anemia incorporating ITPA genotype could identify chronic hepatitis C patients at high risk of relapse among virological responders to pegylated-interferon and ribavirin. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #982)

8. Matsuura K, Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Watanabe T, Sugauchi F, Kurosaki M, Izumi N, **Sakamoto N**, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Kaneko S, Nojiri S, Joh T, Tokunaga K, Mizokami M: IL28B and ITPA gene variants correlate with treatment efficacy in pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #994)
9. Kurosaki M, **Sakamoto N**, Matsuura K, Kakinuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N: Mutations in the interferon sensitivity determining region of HCV, age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy. 62th. Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-4-2011, San Francisco, CA. (Poster #995)
10. Takeshi Yoshida, Fumi Satoh, Watari Akihiro, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, **Naoya Sakamoto**, Kiyohito Yagi: Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.
11. **Naoya Sakamoto**, Yusuke Funaoka, Goki Suda, Mina Nakagawa, Sei Kakinuma, Mamoru Watanabe: Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.
12. Sayuri Nitta, **Naoya Sakamoto**, Megumi Tasaka-Fujita, Kei Kiyohashi, Akiko Kusano-Kitazume, Miyako Murakawa, Kouhei Yoshino, Kako Mishima, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Mamoru Watanabe: HCV-NS4B targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon- dependent innate immune response. 18th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Sep-8-2011, Seattle, WA.
13. Yoshiaki Yamagishi, Takeshi Yoshida, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, **Naoya Sakamoto**, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi: Development of RNA pol-driven adenovirus vector expressing hepatitis C virus replicon. Experimental Biology 2011, Apr-13-2011, Washington, DC.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

出願番号：特願 2011-194082

発明の名称：C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する医薬組成物

発明者：坂本直哉、渡辺守、北詰晶子、萩原正敏、奥野友紀子

特許出願人：東京医科歯科大学

提出日：平成 23 年 9 月 6 日

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 22～24 年度）

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者： 本多 政夫 金沢大学医学部先端医療技術学 教授

分担研究課題： 肝炎の進展、治療反応性に寄与する宿主遺伝子発現データ
ベースの構築

研究要旨：ゲノムワイド関連解析（GWAS）による一塩基多型（SNP）解析により、IFN 療法に対する反応性に加え、肝炎の進展に寄与する宿主因子の違いも明らかにされることが期待される。本研究期間、PegIFN+RBV 併用療法を受けた 91 症例の C 型慢性肝炎症例の治療前末梢血液及び肝組織の遺伝子発現プロファイル及び 168 症例の末梢血及び肝組織 ISG の発現変化と治療効果並びに IL28B 遺伝子多型との関連性について検討した。さらに、15 例の治療前の肝組織を用いてレーザーキャプチャー・マイクロダイセクション（LCM）にて肝小葉部と門脈域細胞浸潤を別々に採取し、遺伝子発現を解析した。IL28B メジャーでは肝小葉部と門脈域細胞浸潤の ISG 発現パターンが一致していたが、IL28B マイナーでは肝小葉部の ISG 発現が高値にかかわらず門脈域細胞浸潤の ISG 発現が低く肝小葉と門脈域間の細胞浸潤の障害が示唆された。免疫染色では IL28B マイナーでマクロファージや T 細胞の免疫担当細胞の浸潤が抑制されていた。従って IL28B マイナーでは IFN 療法の反応不良の要因として、治療前の ISG 高値に加え、免疫担当細胞の浸潤不良が要因の一つとして挙げられた。また、遺伝子発現プロファイルの検討から IL28B マイナーでは non-canonical wnt シグナル・リガンドである Wnt5A の発現亢進が認められた。Wnt5A シグナルの活性化が ISG 高値と関連している可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝炎の進展や IFN 療法の反応性の違いにはウイルス側因子に加え、宿主側因子の果たす役割が極めて重要と考えられる。ゲノムワイド関連解析（GWAS）による一塩基多型（SNP）解析により、IFN 療法に対する反応性の違いや、肝炎の進展に寄与する宿主因子の違いが明らかにされること

が期待される。一方で、ゲノム上で認められる変化が実際に遺伝子発現の変化として再現されるかを網羅的遺伝子発現により解析することが病態の解明と治療への応用という観点から重要である。

B. 研究方法

PegIFN+Rib 併用療法を施行した C 型慢性肝炎症例 168 例を対象とした。91 症例において治療前の肝組織及び末梢血液の遺伝子発現プロファイルリングを Affymetrics gene chip (133U Plus 2.0) にて解析した。また、治療前の末梢血液の ISG の発現変化と治療効果及び IL28B 遺伝子多型との関連性に付き検討した。さらに、15 例の治療前の肝組織を用いてレーザーキャプチャー・マイクロダイセクション (LCM) にて肝小葉部と門脈域細胞浸潤を別々に採取し、遺伝子発現を解析した。

C. 研究結果

PegIFN+Rib 併用療法を施行した症例の治療前の肝生検組織では ISG を高発現している群では IFN 療法の反応が不良であり、ISG 低発現群では IFN 療法の反応が良好である傾向が認められることを先に報告した (Gastroenterology 2010)。治療前の末梢血液の ISG 発現は肝組織と異なり末梢血液では治療反応例と不応例では ISG の発現に差は認められなかった。治療前の肝組織と末梢血液の遺伝子発現を比較すると、IL28B メジャーでは肝組織における ISG 発現と末梢血液の ISG 発現は有意に相関し、肝組織における遺伝子発現と末梢血液の遺伝子発現は一致した傾向が認められた。一方、IL28B マイナーでは肝組織と末梢血液の ISG 発現の関連性は消失し、肝組織で ISG 高値にかかわらず末梢血の ISG は低い傾向が認められた。LCM の検討では、IL28B メジャーでは肝小葉部の ISG 発現パターンと門脈域細胞浸潤の ISG 発現パターンが一致していたが、IL28B マイ

ナーでは肝小葉部の ISG 発現が高値にかかわらず門脈域細胞浸潤の ISG 発現が低い傾向が認められた。ISG の一つである IFI44L 及び CD163、CD8 の免疫染色では IL28B マイナーでは、肝細胞では IFI44L の高発現が見られるものの、CD163、CD8 などのマクロファージや T 細胞の免疫担当細胞の浸潤が抑制されていた。従って、IL28B マイナーでは IFN 療法の反応不良の要因として、治療前の ISG 高値に加え、免疫担当細胞の浸潤不良が要因の一つと考えられた。

一方、ISGs 誘導因子に関して、IL28A/B 発現は肝内 ISGs と有意な相関を示したが、IFN- β 発現は肝内 ISGs と相関せず、肝内 ISGs は主に IL28A/B で誘導されていることが明らかとなった。IL28B マイナーでは肝内 ISGs 高値に見合った IL28A/B の発現が見られず、IL28A/B 以外にも ISGs を誘導する因子の存在が示唆された。

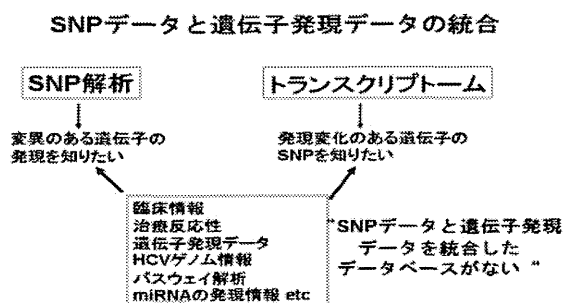
遺伝子発現プロファイルの検討から IL28B マイナーでは non-canonical wnt シグナル・リガンドである Wnt5A の発現亢進が認められた。Wnt5A とそのレセプター FZD5 の発現は IL28B マイナーで有意に発現亢進しており、肝内 ISGs と有意な相関を認めた。

IL28B マイナーでは Wnt5A シグナルの活性化が ISG 高値と関連している可能性が示唆された。現在、培養細胞を用いて Wnt5A の ISGs 発現に及ぼす影響、HCV 複製に対する作用について検討を進めている。

D. 考察

遺伝子発現解析とゲノムワイド関連解析を組み合わせるにより、病態の解明と新しい治療

法開発が可能になると考えられる。



今回の検討から、IL28B マイナーでは IFN 療法の反応不良の要因として、治療前の ISG 高値に加え、免疫担当細胞の浸潤不良が要因の一つとして考えられた。さらに、IL28B マイナーでは Wnt5A の発現亢進が認められ、ISGs 高値に寄与している可能性が示唆された。IL28B マイナーの ISGs 高値には Wnt5A 以外にも IFN- λ 4 の関与が示唆され、今後の検討を要する。

E. 結論

IL28B マイナーの治療抵抗性の要因として、治療前の ISG 高値に加え、免疫担当細胞の浸潤不良が示唆された。また、IL28B マイナーの ISGs 高値の要因として Wnt5A の発現亢進の関与が示唆され、IFN- λ 4 との関連性の検討が必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Ueda T, **Honda M**, Horimoto K, Aburatani S, Saito S, Yamashita T, Sakai S, Nakamura M, Takatori H, Sunagozaka H, Kaneko S. *Genomics*. *in press*

2) Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. Hodo Y, **Honda M**, Tanaka A, Nomura Y, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Sasaki M, Nakanuma Y, Moriyama M, Kaneko S. *Clinical Cancer Research*. *in press*

3) Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Yamashita T, **Honda M**, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Kondo TH, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. *Hepatology*. 2012 Nov 23. [Epub ahead of print]

4) Association of changes in the gene expression profile of blood cells with the local tumor inflammatory response in a murine tumor model. Sakai Y, Tatsumi I, Higashimoto M, Seki A, Nasti A, Yoshida K, Kawaguchi K, Wada T, **Honda M**, Komura T, Kaneko S. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 9;428(1):36-43.

5) Genome-wide Association Study Identifies TNFSF15 and POU2AF1 as Susceptibility Loci for Primary Biliary Cirrhosis in the Japanese Population. Nakamura M, Nishida N, Kawashima M, Aiba Y, Tanaka A, Yasunami M, Nakamura H, Komori A, Nakamura M, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Onji M, Kaneko S, **Honda M**, Yamagiwa S, Nakao K, Ichida T, Takikawa H, Seike M, Umemura T, Ueno Y, Sakisaka S, Kikuchi K, Ebinuma H, Yamashiki N, Tamura S, Sugawara Y, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Taketomi A, Arai K, Monoe K, Ichikawa T, Tani M, Miyake Y, Kumagi T, Abe M, Yoshizawa K, Joshita S, Shimoda S, Honda K, Takahashi H, Hirano K, Takeyama Y, Harada K, Migita K, Ito M, Yatsuhashi H, Fukushima N, Ota H, Komatsu T, Saoshiro T, Ishida J, Kouno H, Kouno H, Yagura M, Kobayashi M, Muro T, Masaki N, Hirata K, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima N, Komeda T, Sugi K, Koga M, Ario K, Takesaki E, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Tsubouchi H, Mizokami M, Nakanuma Y, Tokunaga K, Ishibashi

- H. *Am J Hum Genet.* 2012 Oct 5;91(4):721-728.
- 6) Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. Mizukoshi E, Fushimi K, Arai K, Yamashita T, **Honda M**, Kaneko S. *Liver Int.* 2012 Nov;32(10):1516-26.
- 7) Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, **Honda M**, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. *PLoS One.* 2012;7(6). e39175.
- 8) No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, **Honda M**, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. *BMC Med Genet.* 2012 Jun; 13: 47.
- 9) Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. Okada H, **Honda M**, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S. *Cancer Res.* 2012 Sep 1;72(17):4459-71.
- 10) Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, **Honda M**, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y. *Hepatol Res.* 2012 Jun;42(6):523-542.
- 11) Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: implications for type 2 diabetes. Takeshita Y, Takamura T, Kita Y, Ando H, Ueda T, Kato K, Misu H, Sunagozaka H, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. *Metabolism.* 2012 Oct;61(10):1388-94.
- 12) Coexpression network analysis in chronic hepatitis B and C hepatic lesions reveals distinct patterns of disease progression to hepatocellular carcinoma. He D, Liu ZP, **Honda M**, Kaneko S, Chen L. *J Mol Cell Biol.* 2012 Jun;4(3):140-52.
- 13) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma. Mizuno H, **Honda M**, Shirasaki T, Yamashita T, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *Liver Int.* 2012 Aug;32(7):1146-55.
- 14) Induction of elastin expression in vascular endothelial cells relates to hepatoportal sclerosis in idiopathic portal hypertension: possible link to serum anti-endothelial cell antibodies. Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, Shiomi S, **Honda M**, Kaneko S, Nakanuma Y. *Clin Exp Immunol.* 2012 Mar;167(3):532-42.
- 15) Identification of blood biomarkers of aging by transcript profiling of whole blood. Nakamura S, Kawai K, Takeshita Y, **Honda M**, Takamura T, Kaneko S, Matoba R, Matsubara K. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Feb 10;418(2):313-8.
- 16) A randomized phase II trial of intra-arterial chemotherapy using SM-11355 (Miriplatin) for hepatocellular carcinoma. Okusaka T, Kasugai H, Ishii H, Kudo M, Sata M,

- Tanaka K, Shioyama Y, Chayama K, Kumada H, Yoshikawa M, Seki T, Saito H, Hayashi N, Shiratori K, Okita K, Sakaida I, **Honda M**, Kusumoto Y, Tsutsumi T, Sakata K. *Invest New Drugs*. 2012 Oct;30(5):2015-25.
- 17) Induction of elastin expression in vascular endothelial cells relates to hepatoportal sclerosis in idiopathic portal hypertension: possible link to serum anti-endothelial cell antibodies. Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, Shiomi S, **Honda M**, Kaneko S, Nakanuma Y. *Clin Exp Immunol*. 2012;167(3):532-42.
- 18) Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, **Honda M**, Kaneko S. *Oncology*. 2011;81(5-6):281-290.
- 19) Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada SI, Asahina Y, Izumi N, **Honda M**, Kaneko S, Enomoto N. *Hepatol Int*. 2011 Aug 18. [Epub ahead of print]
- 20) Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, **Honda M**, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. *Hum Mol Genet*. 2011 Sep 1;20(17):3507-16.
- 21) Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, **Honda M**, Kaneko S. *Hepatology*. 2011 Apr;53(4):1206-16.
- 22) Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. **Honda M**, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. *Gastroenterology*. 2011 Jul;141(1):128-40.
- 23) Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. Yamashita T, **Honda M**, Kaneko S. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jun;26(6):960-4.
- 24) Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, **Honda M**, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. *J Hepatol*. 2011 Mar;54(3):439-48.
- 25) Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. Sunagozaka H, **Honda M**, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. *Int J Cancer*. 2011 Oct 1;129(7):1576-85.
- 26) A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. Misu H, Takamura T, Takayama H, Hayashi H, Matsuzawa-Nagata N, Kurita S, Ishikura K, Ando H, Takeshita Y, Ota T, Sakurai M, Yamashita T, Mizukoshi E, Yamashita T, **Honda M**, Miyamoto K, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Kim HJ, Lee IK, Minokoshi Y, Saito Y, Takahashi K, Yamada Y,

- Takakura N, Kaneko S. *Cell Metab.* 2010 Nov 3;12(5):483-95.
- 27) Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. Honda M, Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. *J Hepatol.* 2010 Nov;53(5):817-26.
- 28) La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. *J Infect Dis.* 2010 Jul 1;202(1):75-85.
- 29) Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. Yamashita T, Honda M, Nio K, Nakamoto Y, Yamashita T, Takamura H, Tani T, Zen Y, Kaneko S. *Cancer Res.* 2010 Jun 1;70(11):4687-97.
- 30) Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Sep 10;400(1):7-15.
- 31) Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. *Gastroenterology.* 2010 Aug;139(2):499-509.
- 32) Altered hepatic gene expression profiles associated with myocardial ischemia. Ootsuji H, Honda M, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010 ;3(1):68-77.
- 33) Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. Hodo Y, Hashimoto S, Honda M, Yamashita T, Suzuki Y, Sugano S, Kaneko S, Matsushima K. *Genomics.* 2010 95(4):217-23.
- 34) dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Takatori H, Yamashita T, Honda M, Nishino R, Arai K, Yamashita T, Takamura H, Ohta T, Zen Y, Kaneko S. *Liver Int.* 2010 30(3):438-46.
- 35) CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes. Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S. *Diabetes.* 2010 59(3):634-43.

2. 学会発表

- 1) Impaired Infiltration of Immune Regulatory Cells into Liver Lobules of Chronic Hepatitis C Patients with Interferon-Resistant IL28B Genotype. M. Honda, A. Sakai, T. Shirasaki, M. Nakamura, T. Yamashita, K. Arai, T. Shimakami, Y. Sakai, T. Yamashita, E. Mizukoshi, S. Kaneko. AASLD2012(63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012)., Boston, U.S.A., 2012.

G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 22～24 年度）

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者：五條堀 孝 国立遺伝学研究所 生命情報研究センター 教授

分担研究課題：肝炎ウイルス統合データベースの構築およびネットワーク解析

研究要旨：ウイルス性肝炎に関して、宿主(ヒト)側とウイルス側双方の要因のデータを収集し、患者より得られた臨床情報を加えて多次的に構成されたデータベースを構築し、継続的に情報および機能の拡充を図った。また、C型肝炎の薬剤反応性に影響を及ぼすと考えられる遺伝子およびそれらと相互作用の推定される遺伝子に関するネットワーク解析を、同データベースを応用して遂行した。併せて、同解析により得られた知見を基に、同データベースの拡充に必要な機能定義を行った。

A. 研究目的

本研究では、ウイルス性肝炎を特徴付けるプロファイルを構築し、それがテラーメイド医療の分野で利用されることを目的としている。その実現のために構築されたデータベースを、実際にホスト側要因のネットワーク解析に応用し、特にC型肝炎の治療効果を決める因子の関係性に関する知見を得る。さらに、その知見を踏まえ、同データベースの有用性向上を目指した機能拡充の方向付けを行う。

B. 研究方法

同データベースより、C型肝炎の薬剤反応性やインターフェロン副作用に相関する SNP を探索し、その周辺の遺伝子を抽出する。それらの遺伝子産物およびその周辺の蛋白質間相互作用を対象に計算機上でネットワーク解析を行う。その結果をフィードバックすることで、同データベースの機能拡充の指針を策定する。

C. 研究結果

薬剤反応性関連 SNP の近傍遺伝子 IL28B について蛋白質間相互作用解析をゲノムネットワークプラットフォームで遂行し、IFN λ と IFN α の相互作用、および JAK-STAT 経路との関連性を示すことができた。副作用関連 SNP の近傍遺伝子 ITPA についても同様の解析を遂行し、IFN λ 特異的 ISG、肝臓特異的 ISG を同定した。

D. 考察

蛋白質間相互作用ネットワーク解析が C 型肝炎の治療機序を決める因子の関係性を調べる上で重要であると示されており、同解析に活用可能な相互作用情報、遺伝子発現情報のデータベースへの導入が有用性向上に効果的であると考えられる。

E. 結論

蛋白質間相互作用ネットワーク解析の有用性

を示すことができ、それを基にデータベースの機能拡充の指針を策定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeda J, Yamasaki C, Murakami K, Nagai Y, Sera M, Hara Y, Obi N, Habara T, **Gojobori T**, Imanishi T (2013). H-InvDB in 2013: an omics study platform for human functional gene and transcript discovery. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D915-9.
2. Takayama K, Tsutsumi S, Katayama S, Okayama T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Kawazu C, Hasegawa A, Ikeo K, **Gojobori T**, Ouchi Y, Hayashizaki Y, Aburatani H, Inoue S. (2011). Integration of cap analysis of gene expression and chromatin immunoprecipitation analysis on array reveals genome-wide androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Oncogene* .30: 619-630.
3. Fukuchi S, Hosoda K, Homma K, **Gojobori T**, and Nishikawa K. (2011). Binary classification of protein molecules into intrinsically disordered and ordered segments. *BMC Struct Biol.* 11 (1) : 1-29.
4. Bousquet J, Anto J, Sterk P, Adcock I, Brahmachari S, Roca J, Agusti A, **Gojobori T**, Auffray C, et al. (2011). Systems medicine and integrated care to combat chronic noncommunicable diseases. *Genome Medicine.* (3 (43): 1-12.
5. Taniya T, Tanaka S, Yamaguchi-Kabata Y, Imanishi T, **Gojobori T**. (2012). A prioritization analysis of disease association by data-mining of functional annotation of human genes. *Genomics.* 99(1):1-9.
6. Gaudet P, Bairoch A, Field D, Sansone SA, Taylor C, Attwood TK, Bateman A, Blake JA, Bult CJ, Cherry JM, Chisholm RL, Cochrane G, Cook CE, Eppig JT, Galperin MY, Gentleman R, Goble CA, **Gojobori T**, Hancock JM, Howe DG, Imanishi T, Kelso J, Landsman D, Lewis SE, Mizrachi IK, Orchard S, Ouellette BF, Ranganathan S, Richardson L, Rocca-Serra P, Schofield PN, Smedley D, Southan C, Tan TW, Tatusova T, Whetzel PL, White O,

- Yamasaki C(2011) Towards BioDBcore: a community-defined information specification for biological databases. *Nucleic Acids Res.* 39,D7-D10.
7. Nakamura Y, Komiyama T, Furue M, **Gojobori T**, and Akiyama Y(2010) CIG-DB: The database for human or mouse immunoglobulin and T cell receptor genes available for cancer studies. *BMC Bioinformatics.*11 (398) ,1-9.
 8. Moolhuijzen P, Kulski JK, Dunn DS, Schibeci D, Barrero R, **Gojobori T**, Bellgard M.(2010) The transcript repeat element: the human Alu sequence as a component of gene networks influencing cancer. *Funct Integr Genomics.* 10 (3), 307-319.

2. 学会発表

1. **五條堀 孝** (2011) 「ライフサイエンス革命によるゲノム情報社会の将来形成」、九州大学創立百周年記念講演会、九州大学（福岡）6月18日
2. **五條堀 孝** (2011) 「ゲノム情報とバイオインフォマティクス」、北九州産業学術研究都市産学連携フェア、バイオ分野セミナー、北九州学術研究都市学術情報センター（福岡県北九州市）10月19日
3. **五條堀 孝** (2011) (講義)「比較ゲノム学の革新的発展とデータベースの役割」、東京大学大学院生命化学フロンティア II 講義、東京大学農学部（東京）12月2日
4. **五條堀 孝** (2011) 「次世代シーケンサー時代のデータベースを考える」 “What is useful integration of biological information in genome science?”、ワークショップ「役に立つデータベース、役に立たないデータベース」 “Useful and Useless database”、日本分子生物学会、パシフィコ横浜（神奈川）12月14日
5. **T Gojobori** (2011) “Progress of genome studies using a next generation sequencer” “次世代シーケンサーを用いたゲノム関連研究の展開”、放射線影響研究所（広島）12月16日

6. **T Gojobori** (2010) “Genomic evolution of hepatitis C virus and its implication to understanding of dynamic molecular interaction with the host system”

(基調講演)、HCV2010 (第 17 回 C 型肝炎及び関連ウイルスに関する国際会議、パシフィコ横浜 (神奈川) 9 月 10 日

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし