

っては、東京医科歯科大学組み換え DNA 実験安全管理委員会の承認、および文部科学大臣の確認を取得している。

C. 研究結果

ヒト iPS 細胞をマトリゲル上で培養し、activin-A、bFGF・hBMP-4 および hHGF を添加し、それぞれ未分化内胚葉細胞、肝幹前駆細胞および成熟肝細胞各段階への分化誘導を試み、細胞分化度を調節しうる培養系を確立し、異なる細胞分化度が HBV 増殖系に与える影響を解析する基盤を確立した。導入 HBV ベクターとして、in vitro で複製可能な 1.24 倍長の HBV ベクターを構築し、HBx 遺伝子機能解析のために HBx 遺伝子を網羅的にアラニン置換した発現プラスミド・シリーズを構築した。尚、ヒト iPS 細胞に関わる研究は、東海大学 紙谷聡英 准教授・東京大学 中内啓光 教授からの技術支援と緊密な連携の基に行われている。

D. 考察

本研究の成果により、細胞分化の変化と HBV ライフサイクルに関連する新たなウイルス・宿主因子の同定し、現在の B 型肝炎治療を補完する新規クラスの抗ウイルス治療法の創出が期待できる。また、薬剤スクリーニング・ケミカルバイオロジー技術の応用範囲の拡大が期待でき、多分野での新たな研究の創造が期待できる。

E. 結論

細胞分化度を調整し得るヒト肝細胞培養系を構築した。肝細胞の分化状態の違いが HBV ライフサイクルに与える影響を解明し、

従来の薬剤開発とは視点を異にする細胞分化機構を標的とした新規治療の創出に新たな知的・技術的基盤を確立するために、本系は有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology*. 57(1):46-58, 2013.
- Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology Research* 2013; 43: 1-34
- 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 interleukin 28B with antiviral response. *Hepatology*. 55: 20- 29, 2012.
- Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H,

- Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M: Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Hepatology*. 2012; in press.
5. 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, Morikawa H, Adachi K, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H: Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN α 2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multi-center cooperative study. *J Gastroenterol*. (Epub ahead of print) 2012.
6. 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, Ttoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T: Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One* 7(6):e39175, 2012.
7. 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: No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet*. 13: 47 2012.
8. Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N: Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis CN. *J Viral Hepat*. 20(1):72-76, 2012.
9. Toyoda J, Ozeki I, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H: Virologic response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. *J Viral Hepat*. 20(3):167-173 2012.
10. 朝比奈靖浩、泉 並木、桶谷 眞、熊田博光、小池和彦、鈴木文孝、滝川一、田中 篤、坪内博仁、林 紀夫、平松直樹、四柳 宏 (日本肝臓学会肝炎ガイドライン作成委員会) : C型肝炎治療ガイドライン (第1版) 肝臓. 53(6): 355-395 社団法人日本肝臓学会, 2012
2. 著書
1. 朝比奈靖浩: 肝疾患 臨床検査のガイドライン. 272-278 株式会社宇宙堂八木書店, 2012
2. 朝比奈靖浩: C型肝炎ウイルスマーカー 感度と特異度からひもとく 感染症診療のDecision Making 242-247 文光堂, 2012
3. 朝比奈靖浩: C型肝炎の経過と予後 肝炎ウイルス-B型・C型 70-75 医薬ジャーナル社, 2012
4. 朝比奈靖浩: 肝発癌抑制を目指したインターフェロン療法 最新! C型肝炎の使いかた. 43-45 診断と治療社, 2012
5. 朝比奈靖浩: 4. ウイルス学的検査 A. A型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 34

南江堂, 2012

6. 朝比奈靖浩: 4. ウイルス学的検査 B. B型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 35-40 南江堂, 2012
7. 朝比奈靖浩: 4. ウイルス学的検査 C. C型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 40-43 南江堂, 2012
8. 朝比奈靖浩: 4. ウイルス学的検査 D. D型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 43-44 南江堂, 2012
9. 朝比奈靖浩: 4. ウイルス学的検査 E. E型肝炎ウイルスマーカー 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 44 南江堂, 2012
10. 朝比奈靖浩: 6. C型慢性肝炎 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 95-101 南江堂, 2012
11. 朝比奈靖浩: A-2. C型慢性肝炎 肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版. 189-219 南江堂, 2012

2. 学会発表

1. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Katoh T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N: Suppression of Alpha-fetoprotein by Interferon Therapy Reduces The Risk of Hepatocarcinogenesis in Patients with Chronic Hepatitis C. EASL: The international liver congress 2012. Barcelona, 2012年4月21日
2. Akiko Kusano-Kitazume, Naoya Sakamoto, Yukiko Okuno, Kenichi Mori, Mina Nakagawa; Sei Kakinuma, Sayuri

Nitta, Miyako Murakawa, Seishin Azuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Akihiro Matsumoto, Masatoshi Hagiwara, Yasuhiro Asahina, Mamoru Watanabe; Antiviral effects and action mechanisms of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds against hepatitis C virus. 63rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-11-2012, Boston, MA. USA.

3. Yasuhiro Asahina, Miyako Murakawa, Naoya Sakamoto, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Seishin Azuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Sayuri Nitta, Akiko Kusano-Kitazume, Mamoru Watanabe; Impaired IL28B gene induction and poor IL28B promoter activity influenced by the IL28B minor allele are closely associated with a null response to interferon in chronic hepatitis C patients. 63rd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Nov-11-2012, Boston, MA. USA.

4. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Watanabe M: HCV-NS4B Protein Binds STING and Blocks the RIG-I Mediated IFN Pathway. The 10th JSH Single Topic Conference, Nov-21-2012, Tokyo.

5. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Watanabe M: Association of Gene Expression Involving Innate Immunity and IFN Signaling with Genetic Variation in IL28B in Patients with Chronic Hepatitis C. The 10th JSH Single Topic Conference, Nov-21-2012, Tokyo.
6. Akiko Kusano-Kitazume, Naoya Sakamoto, Yukiko Okuno, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Masatoshi Hagiwara, Yasuhiro Asahina, Mamoru Watanabe; Discovery of N-(morpholine-4-carbonyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. The 10th JSH Single Topic Conference, Nov-21-2012, Tokyo.
7. Murakawa M, Sakamoto N, Nakagawa M, Kawai F, Fuziki J, Otani S, Yamanaka H, Kitazume A, Nitta S, Watanabe T, Sakurai Y, Kakinuma S, Asahina Y, Watanabe M : Impaired induction of IL28B expression in PBMC is associated with null response to interferon therapy in chronic hepatitis C. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Oct-8-2012, Venice, Italy.
8. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Mishima K, Murakawa M, Kitazume- Kusano A, Yoshino K, Kiyohashi K, Kakinuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Watanabe M: HCV-NS4B blocks the RIG-I mediated IFN pathway through targeting of STING. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Oct-8-2012, Venice, Italy.
9. 朝比奈靖浩、村川美也子、渡辺守: C 型肝炎治療不能性に関わる自然免疫分子機構と HCV 逃避機構 (シンポジウム 1) 第 39 回日本肝臓学会東部会 2012 年 12 月 6 日 東京.
10. 柿沼晴、中川美奈、朝比奈靖浩 : Matrix Metalloproteinase-2 の肝線維化過程における機能の解析 (特別企画 3) 第 39 回日本肝臓学会東部会 2012 年 12 月 7 日 東京.
11. 柿沼晴、朝比奈靖浩、渡辺守: Non-canonical Wnt 経路による肝幹/前駆細胞の増殖/分化の調節 (シンポジウム 8 肝発癌・進展機序研究に与える幹細胞学のインパクト) JDDW 2012 第 16 回日本肝臓学会大会 2012 年 10 月 11 日 神戸.
12. 新田沙由梨 坂本直哉 吉野耕平 村川美也子 北詰晶子 幾世橋佳 東正新 柿沼晴 中川美奈 朝比奈靖浩 渡辺守: HCV NS4B 蛋白による RIG-I 誘導性 Interferon 発現経路の抑制機構についての解析 (一般演題) JDDW 2012 第 16 回日本肝臓学会大会 2012 年 10 月 10 日 神戸.
13. 新田沙由梨、朝比奈靖浩、坂本直哉、村川美也子、北詰晶子、幾世橋佳、東正新、柿沼晴、中川美奈、渡辺守: IFN 不応例における宿主自然免疫応答と HCV 逃避機構 (シンポジウム 1 ウイルス増殖制御

機構の最新情報) 第 77 回インターフェロンサイトカイン学会 2012 年 6 月 21 日 神戸.

14. 鈴木祥子、朝比奈靖浩、村岡 優、田中佳祐、鈴木雄一郎、玉城信治、星岡賢英、安井 豊、加藤知爾、細川貴範、上田 研、土谷 薫、中西裕之、板倉潤、高橋有香、黒崎雅之、泉 並木：ペグインターフェロン・リバビリン併用療法の早期 HCV 動態からみた IL28B genotype とインターフェロン応答性の予測 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 8 日
15. 朝比奈靖浩、土谷 薫、泉 並木：肝癌悪性度評価を考慮した治療アルゴリズムの有用性の検討 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 7 日
16. 黒崎雅之、朝比奈靖浩、泉 並木：臨床背景の評価に基づく C 型肝炎の治療選択 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 7 日
17. 土谷 薫、小無田美菜、村岡 優、田中佳祐、鈴木雄一郎、星岡賢英、玉城信治、加藤知爾、安井 豊、細川貴範、上田 研、中西裕之、板倉 潤、高橋有香、黒崎雅之、朝比奈靖浩、坂元亨宇：肝癌 RFA 治療例における progenitor cell feature marker の臨床的有用性 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 7 日
18. 村岡 優、加藤知爾、土谷 薫、田中佳祐、鈴木雄一郎、星岡賢英、玉城信治、安井 豊、細川貴範、上田 研、中西裕之、板倉 潤、高橋有香、黒崎雅之、

- 朝比奈靖浩、泉 並木：C 型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌局所根治療法後ペグインターフェロン・リバビリン併用療法における IL-28B 遺伝子多型の臨床的意義 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 7 日
19. 朝比奈靖浩、泉 並木：インターフェロン応答性とプロテアーゼ阻害薬 3 剤併用療法の治療効果 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 8 日
 20. 板倉 潤、村岡 優、星岡賢英、田中佳祐、鈴木雄一郎、加藤知爾、玉城信治、安井 豊、細川貴範、山田航希、上田 研、土谷 薫、中西裕之、黒崎雅之、朝比奈靖浩、泉 並木：B 型・C 型慢性肝炎患者に対する医療費助成の効果と拠点病院 第 48 回 日本肝臓学会総会 金沢, 2012 年 6 月 8 日
 21. 朝比奈靖浩、泉 並木：インターフェロン不応性の予測とプロテアーゼ阻害薬 3 剤併用療法の治療効果 第 98 回 日本消化器病学会総会 東京, 2012 年 4 月 20 日

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

■ 平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金 (B 型肝炎創薬実用化等研究事業)

B 型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究 研究分担報告書

HBV の cccDNA 制御と感染による変動分子

研究分担者 森石 恆司 山梨大学医学部 教授

研究要旨 : B 型肝炎ウイルス (HBV) のコア蛋白質遺伝子上流のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子と連結させ、海洋生物抽出物ライブラリーの 45 抽出物をスクリーニングした。その中の 1 抽出物が細胞増殖に影響せず、コア蛋白質プロモーター活性を抑制する活性を示した。また、HBV が持続感染している細胞 HepG2. 2. 15 における脂質の変化を質量分析で解析したところ、HepG2 に対してトリアシルグリセリド (TAG) の領域に明らかな違いが認められた。これらの結果は、抗 HBV 薬開発および HBV 感染におけるマーカー分子の特定に繋がるものと思われる

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染者は世界で三億人を越えるといわれ、半数の肝癌患者が HBV 感染に由来すると報告されている。HBV のコア蛋白質をコードしている領域の上流にはプロモーター領域が存在しており、宿主の転写因子 HNF4、C/EBP、PPAR γ などが認識する配列が認められる。コア蛋白質は、ウイルス粒子を形成するキャプシド蛋白質と考えられ、感染性粒子の構造蛋白質である。細胞内に cccDNA が残されていても、ウイルス蛋白質の発現を制御できれば、感染拡大や病原性発現を抑制・遅延させることができる。核内にある cccDNA は宿主ヒストンと会合し、ミニクロモゾームを形成することから、エピジェネティックな制御をうけると考えられる。

本研究で、cccDNA をコントロールしている宿主エピジェネティック制御機構を解明し、それを B 型肝炎治療薬開発に発展させることを目指す。本年度は、HBV コアプロモーターを制御する化合物探索と感染による脂質変化を解析した。

B. 研究方法

遺伝子型 C (CAT 株) からコアプロモーター領域を PCR で増幅し、pGL2 プラスミドに組み込み、ルシフェラーゼ遺伝子と連結させ、細胞株を樹立した。その細胞株を用いて、45 海洋生物抽出物をスクリーニングした。MTS 法によって細胞増殖を測定した。また、HBV が持続感染している HepG2. 2. 15 細胞および親株の HepG2 細胞の脂質成分を、Probe electrospray ionization 法によって質量分析した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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を必要とする材料は含まれない。

C. 研究結果

以前、我々は、C 型肝炎ウイルスのウイルス複製を指標に、抗 NS3 活性を示す化合物が海洋生物 (海綿やウミシダ) に存在することを報告している (Yamashita et al, Mar Drugs, 10, 744 ; Fujimoto et al, PLoS one, 7, e48685, 2012)。そこで抗 HBV 活性を示す化合物を海洋動物抽出物ライブラリーから探

索した。コアプロモーター活性を抑制する活性を示す化合物スクリーニングを行ったところ、細胞増殖に影響せず、プロモーター活性を抑制する抽出物は45抽出物中一つであった。それは、*Liosina*属（種未同定）の海綿動物であった。

また、感染による脂質成分変化をProbe electrospray ionization法によって質量分析した。この方法は、非常に微量なサンプルでも解析が可能である。細胞数個からの解析が可能であり、今回はHepG2. 2. 15細胞とHepG2細胞を比較した。PC領域に変化が認められなかったが、TAG領域に感染により明らかに低下しているピークがみられた。

D. 考察

本研究により、抗HBVコアプロモーター活性を示す化合物を含む海綿動物の抽出物が存在することが分かった。今回同定された*Liosina*属（種未同定）の解明は日本近海に少ないことから、更なるスクリーニングが必要と思われる。また、TAG領域に変化がみられたが脂肪酸成分の違いをより細かく解析する必要があると思われる。また、他の脂質成分の解析も次年度以降行って行きたい。

E. 結論

本研究によって、海洋動物抽出物ライブラリーを用いて抗HBV化合物を同定できる可能性が示された。また、脂質成分が感染の指標となるマーカー分子になる可能性を示す事ができた。本研究結果は、新規B型肝炎治療法開発および診断法開発に繋がるものと思われる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M,

Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One*, 7: e48635, 2012

2. Tripathi LP, Kambara H, Moriishi K, Morita E, Abe T, Mori Y, Chen YA, Matsuura Y, Mizuguchi K: Proteomic Analysis of Hepatitis C Virus (HCV) Core Protein Transfection and Host Regulator PA28gamma Knockout in HCV Pathogenesis: A Network-Based Study. *J. Proteome Res.*, 11: 3664-3679, 2012

3. Moriishi K, Matsuura Y: Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front. Microbiol.*, 3: 54, 2012

4. Kondo M, Moriishi K, Wada H, Noda T, Marubashi S, Wakasa K, Matsuura Y, Doki Y, Mori M, Nagano H: Upregulation of nuclear PA28gamma expression in cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Exp. Ther. Med.*, 3: 379-385, 2012

2. 学会発表

1. Kasai H., Kawakami, K., Yamashita, A., Ikeda, M., Kato, N., Enomoto, N., Matsuura, Y., Kusunoki, M., Moriishi, K. FKBP6 plays an important role in HCV replication through binding to HCV NS5A. 19th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. 2012. October 5-9.

2. 葛西宏威、河上國洋、平田有佳理、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、岡本徹、松浦善治、楠木正己、森石恆司 新規宿主因子FKBP6によるHCV複製制御機構の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日～15日

3. 藤本雄介、山下篤哉、池田正徳、加藤宣之、森石恆司 海綿動物 *Amphimedon* sp. 抽出画分による HCVNS3 プロテアーゼ・ヘリカーゼ活性阻害の解析 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日～15 日

4. 山下篤哉、沈暉、葛西宏威、藤本雄介、

森石恆司 Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害効果の検討 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 13 日～15 日

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

■平成24年度 厚生労働科学研究費補助金 (B型肝炎創薬実用化等研究事業)

B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究 研究分担報告書

HBV の *in vitro* 感染・増殖系の確立と 抗ウイルス薬スクリーニング系への応用

研究分担者 田川 陽一 東京工業大学 大学院生命理工学研究科 准教授

研究要旨：内皮細胞・星細胞の管腔ネットワークと肝細胞株、ヒト肝細胞またはヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞との共培養による肝組織モデル (*in vitro* Liver model: IVL^{肝細胞株、ヒト肝細胞または hES/iPS})とマイクロ流体デバイスとを応用した実際の肝組織に近いヒト肝様組織チップを構築する。これらのヒト肝様組織チップに HBV-DNA を導入し、遺伝子発現やウイルス粒子の放出、さらには、HBV 感染性粒子の感染を検討し、班内分担者と連携して各段階における薬剤スクリーニング系の確立を目的とした。

A. 研究目的

初代培養肝細胞やヒト肝癌由来細胞株等の一般的な培養法では HBV の感染は成立できないことが知られているが、ヒト肝細胞キメラマウスのみ HBV の感染が可能である。しかし、ヒト肝細胞キメラマウスは高価であり大規模な薬剤スクリーニング等には適さず、*in vivo* を反映した *in vitro* 感染・増殖モデルの開発が望まれる。初代培養肝細胞を単純に培養しただけでは、多くの肝機能を速やかに失ってしまうことも知られているが、研究分担者の田川らは、肝細胞が長期間培養でき、高機能を維持できるためには肝組織の再構築による肝細胞の細胞極性が必要であると考え、内皮細胞ネットワークと肝細胞株、ヒト肝細胞またはヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞とによる肝様組織 *in vitro* モデル (*in vitro* Liver model: IVL^{肝細胞株、ヒト肝細胞または hES/iPS}) を構築した。

内皮ネットワークなしのコントロールに比べてこれらの IVL は高肝機能を示すことが分かった。さらにこれらの IVL をマイクロ流体デバイスで培養することにより、さらに肝機能を向上することに成功している。これら IVL とマイクロ流体デバイスとを応用した実際の肝組織に近いヒト肝様組織チップは、HBV 感染系としても応用できることが期待できる。そこで、これらのヒト肝様組織チップに HBV-DNA を導入し、遺伝子発現やウイルス粒子の放出、さらには、HBV 感染性粒子の感染を検討し、班内分担者と連携して各段階における薬剤スクリーニング系の確立を目的とした。

B. 研究方法

平成 24 年度では、HBV 持続感染株 HuH HB Ae や HBV-DNA をトランスフェクションしたヒト肝癌細胞株 HuH7.5.1 細胞を肝細胞として用いて、EHS ゲル上に構築

した内皮細胞ネットワークとの共培養による、肝組織構築をおこなった。この構築した肝組織モデルを用いて、HBV-DNA 導入や HBV 粒子による感染の検証を試みた。肝組織チップの検証として、IVL^{hiPS} をマイクロ培養装置内で構築し肝機能評価をおこなった。

また、IVL に星細胞株 TWNT4 を加えるとともにネットワーク構造が長期に安定化することもわかった。

(倫理面の配慮)

東工大ではヒト ES 細胞専用実験室を有し、田川のヒト ES 細胞を用いた肝組織分化誘導研究はすでに文部科学大臣より平成 24 年度末まで承認を得ており、東工大のヒト ES 細胞倫理規則および文部科学省のヒト ES 細胞使用指針に遵守し実験をおこなった。また、平成 24 年度におこなったその他の研究では、細胞株や市販されている内皮細胞株等を用いたため、人権擁護、不利益等は発生していない。

C. 研究結果

HBV 持続感染株 HuH HB Ae や HBV-DNA をトランスフェクションしたヒト肝癌細胞株 HuH7.5.1 細胞を内皮細胞ネットワークに播種しても肝組織が構築でき、HBV-DNA 導入や HBV 粒子感染における条件やアッセイ系が確立できた。

また、マクロ培養装置内でヒト iPS 細胞から肝組織を構築できた。ヒト iPS 細胞をアクチビン A で胚体内胚葉に分化誘導した後、内皮細胞ネットワークに播種した。ヒト iPS 細胞由来胚体内胚葉細胞は内皮ネットワークへ遊走し、肝様組織を構築し共

培養により肝細胞への分化が観られ、マイクロ流体デバイス中で培養することにより肝機能の上昇を確認することができた。

D. 考察

IVL^{肝細胞株}を用いて、HBV-DNA 導入や HBV 粒子感染における条件やアッセイ系を確立した。これらの成果により、ヒト ES 細胞や iPS 細胞由来の肝組織モデル IVL^{hES/iPS} において HBV-DNA の導入の条件が定まり、感染粒子や抗原の同定が可能になったと思われる。さらに、TWNT4 を加えることによる IVL の長期培養安定化は、ウイルス感染系における長期観察が可能となり重要な知見と思われる。

E. 結論

IVL^{肝細胞株}の構築に成功し、HBV-DNA 導入や HBV 粒子感染における条件やアッセイ系が確立できたことから、IVL^{hES/iPS} への応用が期待できるようになった。また、IVL^{hiPS} をマイクロ培養装置内で作製、より高機能な肝組織モデルの構築に成功し、IVL^{初代肝細胞}または IVL^{hES/iPS} によるマイクロ流体デバイスを用いた cccDNA の安定形成系および効率よい *in vitro* HBV 感染・増殖系確立のための基礎ができた。実際の肝組織に近い星細胞を導入した IVL はさらに HBV 感染モデルとして期待できるものと結論できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ryu JY, A. Siswanto, K. Harimoto, and Y. Tagawa*, Chimeric analysis of EGFP and DsRed2 transgenic mice demonstrates polyclonal maintenance of pancreatic acini, *Transgenic Res*, *in press*. DOI 10.1007/s11248-01209661-8

部大会、盛岡、(2012).

H.知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

2.学会発表

- 1) 玉井 美保、田川 陽一：“マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織における肝代謝能の再現” 第 85 回日本生化学会大会、福岡、(2012).
- 2) 守矢 恒司、豊田 優、田川 陽一：“アセトアミノフェン誘導肝障害の *in vivo* および *in vitro* モデルによる解析” 第 85 回日本生化学会大会、福岡、(2012).
- 3) 内沢 秀光、白川 和浩、齋藤 ゆかり、Nilubol Chonnipa、玉井 美保、田川 陽一：“シジミ由来オルニチン含有トリペプチド β -Ala-Orn-Orn の肝保護効果” 第 85 回日本生化学会大会、福岡、(2012).
- 4) 相川 博明、田川 陽一：“栄養外胚葉幹細胞株の樹立と 胚盤胞の *in vitro* モデル構築の試み” 細胞を創る研究会 5.0、横浜、(2012).
- 5) 玉井 美保、田川 陽一：“マウス ES/iPS 細胞を用いた *in vitro* 肝モデルにおける細胞極性の構築” 細胞を創る研究会 5.0、横浜、(2012).
- 6) 内沢 秀光、白川 和浩、齋藤 ゆかり、Nilubol Chonnipa、玉井 美保、田川 陽一：“シジミ由来トリペプチド β -Ala-Orn-Orn の肝保護効果及び GABA-Orn-Orn の存在” 日本食品科学工学会東北支

B型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究 研究分担報告書

B型肝炎ウイルスの持続感染に関与する宿主因子の同定

研究分担者 福原 崇介 大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨： B型肝炎に対する現行の治療は、B型肝炎ウイルス（HBV）の逆転写酵素を標的としているため、核内に存在するcccDNAには効果がないことから根治は難しく、本薬剤を終生服用する必要がある。従って、HBV感染を根治するには新たな宿主因子の同定とその分子を標的とした創薬が必要である。本研究では、定量的なプロテオミクス法であるSILAC法を用いてHBV感染時に核内で有意に発現量が変化している蛋白質を探索し、発現が変動している因子を41種類同定した。また膜画分の変動蛋白質も同様に40種類同定した。HBVが持続複製している数種類の細胞株で、それらの因子の転写レベルの定量によって、2次スクリーニングを行い、20種類の候補因子を抽出した。また、レポーター遺伝子を搭載したHBVゲノムをHBV持続感染細胞に導入することにより、経時的なレポーターの発現上昇が確認された。

A. 研究目的

B型肝炎に対する現行の治療は、HBVの逆転写酵素を標的としているため、核内に存在するcccDNAには効果がないことから根治は難しい。従って、HBV感染を根治するには新たな宿主因子の同定とその分子を標的とした創薬が重要である。本研究では定量的なプロテオミクス法であるSILACを用いて、HBV感染によって核内で発現変動する分子を同定する。また、HBVゲノム内にGFPやルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだHBVの感染指示系を確立し、HBVの持続感染や病原性に関与する宿主因子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

1.28倍長のHBV-DNAのEnvelope領域にGFPまたはルシフェラーゼ遺伝子を置換し、HBVの持続感染細胞に発現させることで、レポーター遺伝子を搭載した一回感染型のHBV粒子を作製し、初代肝細胞に感染させて、レポーターの発現を検討する。

また、宿主因子の探索では、核または膜画分を精製した後に、SILAC法を用いてHBV感染によって核内で有意に発現が変

化している蛋白質を網羅的にスクリーニングする。遺伝子発現の確認としては、Taqman-arrayを行い、2次スクリーニングとする。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施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、また提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

遺伝子型A、B、CおよびDの1.28倍長のレポーター遺伝子を搭載したHBV-DNAをHuh7またはHepG2細胞へ導入し、コア蛋白質とGFPおよびルシフェラーゼの発現を確認した。さらにHBVが持続複製しているHepG2.2.15およびT23細胞で、経時的にルシフェラーゼ活性が上昇することを確認した。

また、SILAC法により核内で発現上昇した因子を9種類、減少した因子を32種類同定

した。膜面分でも変動した因子を 40 種類同定した。2 次スクリーニングとして HepG2.2.15、T23 および YE12 細胞を用いて、HBV 感染による遺伝子発現変動を検討し、それぞれの細胞で同じ発現パターンを示す因子として 20 種類の宿主因子を同定した。

D. 考察

HBV 感染によって種々の宿主因子の発現や細胞内局在が変動していることが示唆された。今後、shRNA を用いたノックダウンによって、得られた宿主因子の HBV の持続感染に与える影響を明らかにする必要がある。

E. 結論

網羅的な解析によって、HBV 感染によって核や膜面分における発現変動が見られる宿主因子が同定された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

- 1 Konishi H, Shirabe K, Yoshiya S, Ikeda T, Ikegami T, Yoshizumi T, Ikawa-Yoshida A, Motomura T, Fukuhara T, and Matsuura Y. Hepatic interferon-gamma-induced protein-10 expression is more strongly associated with liver fibrosis than interleukin-28B single nucleotide polymorphisms in hepatocellular carcinoma resected patients with chronic hepatitis C. *Hepatol. Res.*, 2013 (in press).
- 2 Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, and Takehara T. Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*, 2012; (in press).
- 3 Ikegami T, Shirabe K, Fukuhara T, Furusyo N, Kotoh K, Shimoda S, Aishima S, Soejima Y, Yoshizumi T, and Maehara Y. Early extensive viremia, but not rs8099917 genotype, is the only predictor for cholestatic hepatitis C after living-donor liver transplantation. *Hepatol. Res.*, 2012; (in press).
- 4 Motomura T, Shirabe K, Furusyo N, Yoshizumi T, Ikegami T, Soejima Y, Akahoshi T, Tomikawa M, Fukuhara T, Hayashi J, and Maehara Y. Effect of laparoscopic splenectomy in patients with Hepatitis C and cirrhosis carrying IL28B minor genotype. *BMC Gastroenterol.*, 2012; 12, 158.
- 5 Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, and Matsuura Y. Japanese encephalitis virus core protein inhibits stress granule formation through an interaction with Caprin-1 and facilitates viral propagation. *J Virol.*, 2013; 87(1): 489-502.
- 6 Motomura T, Shirabe K, Mano Y, Toshima T, Umemoto Y, Fukuhara T, Uchiyama H, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Maehara Y. Neutrophil-lymphocyte ratio reflects hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation via inflammatory microenvironment. *J Hepatol*, 2013; 58(1): 58-64.
- 7 Fukuhara T, and Matsuura Y. Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. *J Gastroenterol*, 2012; (in press).
- 8 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C, Katoh H, Morita E, Okuzaki D, Maehara Y, Koike K, and Matsuura Y. Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus. *J Virol.*, 2012; 86(15), 7918-7933.
- 9 Abe T, Fukuhara T, Wen X, Ninomiya A, Moriishi K, Maehara Y, Takeuchi O, Kawai T, Akira S, and Matsuura Y. CD44 participates in IP-10 induction in cells in which hepatitis C virus RNA is replicating, through an interaction with Toll-like receptor 2 and hyaluronan. *J Virol.*, 2012; 86(11), 6159-6170.
- 10 Toshima T, Taketomi A, Ikegami T, Fukuhara T, Kayashima H, Yoshizumi T, Soejima Y, Shirabe K, and Maehara Y. V5-drainage-preserved right lobe grafts improve graft congestion for living donor liver transplantation. *Transplantation.*, 2012; 93(9): 929-935.
- 11 Kataoka C, Kaname Y, Taguwa S, Abe T, Fukuhara T, Tani H, Moriishi K, and Matsuura Y. Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. *J Virol.*, 2012; 86(5): 2610-2620.
- 12 Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and Matsuura Y.

Establishment of a novel permissive cell line for the propagation of hepatitis C virus by expression of microRNA miR122. *J. Virol.*, 2012; 86(3): 1382-1393.

2. 学会発表

- 1 福原崇介: 一般講演: C型肝炎ウイルスの肝細胞指向性における miR-122 と脂質代謝の役割: 第11回 Hepatitis Expert Meeting、東京、8月25日、2012.
- 2 福原崇介、本村貴志、松浦善治: パネルディスカッション: HCVの非肝臓系細胞株に対する感染培養システムの確立と肝外病変成立に関わる宿主因子の同定: JDDW、神戸、10月11日、2012.
- 3 福原崇介、塩川舞、小野慎子、山本聡美、寒原裕登、加藤大志、岡本徹、奥崎大介、松浦善治: 一般講演: HCV感染の肝細胞指向性は miR-122 の発現と脂質代謝によって規定される: 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11月13日、2012.
- 4 塩川舞、福原崇介、小野慎子、山本聡美、岡本徹、松浦善治: 一般講演: C型肝炎ウイルスの粒子産生に関与するヒト肝細胞特異因子の解析と新規感受性細胞株の樹立: 同上
- 5 小野慎子、福原崇介、塩川舞、岡本徹、松浦善治: 一般講演: C型肝炎ウイルスに感受性を示すマウス肝臓細胞株の樹立: 同上
- 6 伊藤昌彦、鈴木亮介、福原崇介、松浦善治、脇田隆宇、鈴木哲朗: 一般講演: HuH-7由来オーバル様細胞における HCV 感受性の解析: 同上
- 7 Kouwaki T, Pham DN, Fukuhara T, Okamoto T, and Matsuura Y. Identification of Host Factors Interact with Hepatitis B virus X Protein. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日-14日、2012.
- 8 Fukuhara T, Motomura T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Okamoto T, Shirabe K, Maehara Y, and Matsuura Y. Quasispecies Plays an Important Role in Cell Tropism of Hepatitis C Virus. 同上
- 9 Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Okamoto T, and Matsuura Y. Involvement of Human Liver-specific Factors in a Complete Propagation of Hepatitis C Virus. 同上
- 10 Ono C, Fukuhara T, Shiokawa M, Okamoto T, and Matsuura Y. Establishment of Mouse Liver Cell Lines Susceptible to Hepatitis C Virus Infection. 同上
- 11 Fukuhara T, Kambara H, Shiokawa M, Ono C,

Kato H, Okamoto T, and Matsuura Y. miR-122 expression and lipid metabolism participate in cell tropism of hepatitis C virus infection. The American Society for Virology, 31th Annual Meeting, University of Wisconsin-Madison, July 20-26, 2012.

- 12 Fukuhara T, Shiokawa M, Arimoto M, Ono C, Katoh H, Kambara H, Okamoto T, and Matsuura Y. MiR-122 expression and lipid metabolism participate in the cell tropism of HCV infection. 19th International Meeting on HCV and Related Viruses, Venice, Italy, October, 5-9, 2012.

H. 知的所有権の出願・登録状況 特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Norihiro Kokudo, Masatoshi Makuuchi	Segmentectomies, Sectionectomies and wedge resections	Clavien PA, Sarr MG, Fong Y	Atlas of upper gastrointestinal and hepato-pancreat	Springer	Berlin, Heidelber g	2007	373-390
北川雅敏	ユビキチンシステ ムによる細胞周期 制御と疾患	中山敬一	実験医学増刊 号 ヒトと医 学のステージ	羊土社	東京	2013	33-38
朝比奈 靖浩	肝疾患	日本臨床 検査医学 会ガイド ライン作 成委員会	臨床検査のガ イドライン	株式会社 宇宙堂八 木書店	東京	2012	272-278
朝比奈 靖浩	C型肝炎ウイルス マーカー	細川 直 登	感度と特異度 からひもとく 感染症診療の Decision Making	文光堂	東京	2012	242-247
朝比奈 靖浩	C型肝炎の経過と 予後	熊田 博 光	肝炎ウイルス ーB型・C型	医薬ジャ ーナル	大阪	2012	70-75
朝比奈 靖浩	肝発癌抑制を目指 したインターフェ ロン療法	芥田 憲 夫 斉藤 聡 角田 圭 雄	最新!C型肝炎 の使いかた	診断と治 療社	東京	2012	43-45
朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的検 査 A. A型肝炎ウ イルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハ ンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	34
朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的検 査 B. B型肝炎ウ イルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハ ンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	35-40
朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的 検査 C. C型肝炎ウ イルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハ ンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	40-43
朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的 検査 D. D型肝炎ウ イルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハ ンドブック	南江堂	東京	2012	43-44

			改訂第 2 版				
朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的検査 E.E 型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハ ンドブック 改訂第 2 版	南江堂	東京	2012	44
朝比奈 靖浩	6. C 型慢性肝炎	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハ ンドブック 改訂第 2 版	南江堂	東京	2012	95-101
朝比奈 靖浩	A-2. C 型慢性肝炎	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハ ンドブック 改訂第 2 版	南江堂	東京	2012	189-219

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版 年
Koyano S, Saito R, Nagai R, Tastuno K, Okugawa S, Okamura N, Moriyama K.	Molecular characterization of carbapenemase-producing clinical isolates of Enterobacteriaceae in a teaching hospital, Japan.	<i>J Med Microbiol.</i>	Nov.15	Epub ahead of print	2012
Goto K, Hatakeyama S, Okamoto K, Kitazawa T, Abe K, Moriya K, Koike K, Yotsuyanagi H	Dengue hemorrhagic fever in an adult traveler returning to Japan.	<i>Intern Med.</i>	51(13)	1779-82	2012
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.	<i>J Infect Chemother.</i>	Dec;18(6):	883-90	2012
Araoka H, Baba M, Tateda K, Ishii Y, Oguri T, Okuzumi K, Oishi T, Mori S, Mitsuda T, Moriya K, Nakamori Y, Ohmagari N, Yamaguchi K, Yoneyama A;	In vitro combination effects of aztreonam and aminoglycoside against multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Japan.	<i>Jpn J Infect Dis.</i>	65(1)	84-7	2012

Nukui Y, Hatakeyama S, Kitazawa T, Mahira T, Shintani Y, Moriya K.	Pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus among Japanese healthcare workers: seroprevalence and risk factors.	<i>Infect Control Hosp Epidemiol.</i>	Jan;33(1)	58-62.	2012
Fujinaga H, Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K, Koike K.	Hepatocarcinogenesis in hepatitis C: HCV shrewdly exacerbates oxidative stress by modulating both production and scavenging of reactive oxygen species.	<i>Oncology.</i>	81 Suppl 1	:11-7.	2011
Kurano M, Iso-O N, Hara M, Ishizaka N, Moriya K, Koike K, Tsukamoto K.	LXR agonist increases apoE secretion from HepG2 spheroid, together with an increased production of VLDL and apoE-rich large HDL.	<i>Lipids Health Dis</i>	Aug 5;10:	134	2011
Nagai R, Saito R, Koyano S, Okamura N, Yokota H, Kitazawa T, Moriya K.	Evaluation of multiplex PCR using dual-priming oligonucleotide for the detection of vanA and vanB in vancomycin-resistant enterococci.	<i>Clin Chem Lab Med.</i>	Apr;49(4)	751-2	2011
Koshiyama A, Ichibangase T, Moriya K, Koike K, Yazawa I, Imai K.	Liquid chromatographic separation of proteins derivatized with a fluorogenic reagent at cysteinyl residues on a non-porous column for differential proteomics analysis.	<i>JChromatogr A</i>	Jun 3;1218(22)	3447-52	2011
Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda H, Ono Y, Kondo S, Saito I, Kanegae Y.	Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery.	<i>Scientific Report</i>	3	1136	2013
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.	<i>Virology</i>	432	29-38	2012
Pei Z, Kondo S, Kanegae Y, Saito, I.	Copy number of adenoviral vector genome transduced into target cells can be measured using quantitative PCR: Application to	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>	417	945-950	2012

	vector titration.			
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.	<i>Biochem Biophys Res Commun</i>		[Epub ahead of print] PubMed
Hikita H, Enooku 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	<i>Hepatology Res</i>		[Epub ahead of print] PubMed
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	<i>J Hepatol</i>		[Epub ahead of print] PubMed
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	<i>Hepatology Res</i>		[Epub ahead of print] PubMed
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	<i>Hepatology Res</i>		[Epub ahead of print] PubMed

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	<i>ScientificWorldJournal</i>			[Epub ahead of print] PubMed
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	<i>J Lipid Res</i>			[Epub ahead of print] PubMed
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	<i>Hepatology</i>	57	162-170	2013
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	<i>J Gastroenterol</i>			[Epub ahead of print] PubMed
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	<i>J Gastroenterol</i>			[Epub ahead of print] PubMed
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	<i>Case Rep Gastroenterol</i>	6(3)	784-789	2012

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	<i>J Infect Chemother</i>	18(6)	883-890	2012
Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, Koike K, Yatomi Y	Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma	<i>Hepatology</i>	57	417-418	2013
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	<i>Liver Int</i>	32(9)	1434-1442	2012
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	<i>J Gastroenterol</i>	47(10)	1152-1159	2012
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	<i>J Gastroenterol</i>	47(10)	1125-1133	2012
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	<i>Sci Rep</i>	2	637	2012
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	<i>J Gastroenterol</i>	47(2)	187-194	2012