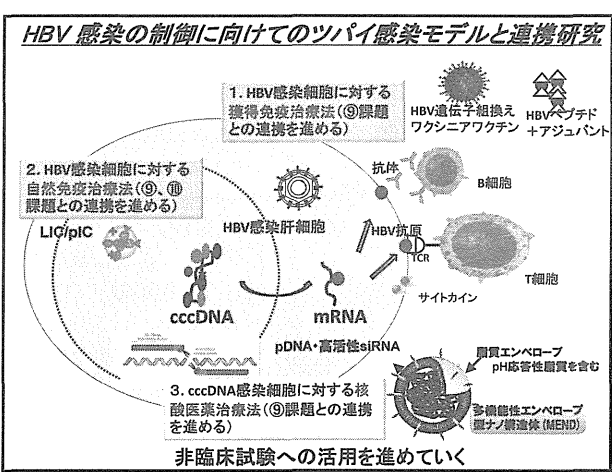
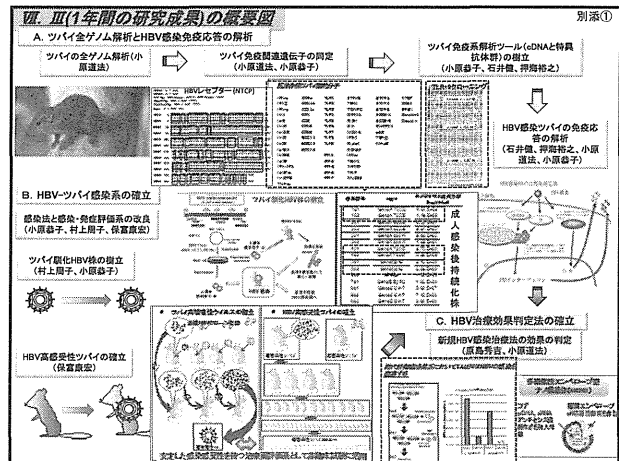


NTCP Sodium taurocholate cotransporting polypeptide
B型肝炎ウイルスレセプター

ヒトとツパイとの分子相同性: 299 / 349 (85%)
ヒトとマウスとの分子相同性: 266/343 (77%)
Gaps: 0 / 349 (0%)

Tupai	1	MEAHNLSAFPTLPPNFKRPTPLSLSVTLVRLILRLSLGCTMEFSKIKAHKPKPK	60
Human	1	MEAHNLSAFPTLPPNFKRPTPLSLSVTLVRLILRLSLGCTMEFSKIKAHKPKPK	60
Tupai	61	LAIALALFOYIMPLTAFVIGKVPFTEALAILVCGSPGGNLSNVFSLAMKGDNLSL	120
Human	61	LAIALALFOYIMPLTAFVIGKVPFTEALAILVCGSPGGNLSNVFSLAMKGDNLSL	120
Tupai	121	VMTTCSTRSLGNMPLLLYISRIGYDGLKDKVPYGLIVISLVLPLCTIGTLEEK	180
Human	121	VMTTCSTRSLGNMPLLLYISRIGYDGLKDKVPYGLIVISLVLPLCTIGTLEEK	180
Tupai	181	PSVYVYKIDMILILLSEVALVAVLVGVGKSLMVTIRLLATSSLMFPFGPLLVG	240
Human	181	PSVYVYKIDMILILLSEVALVAVLVGVGKSLMVTIRLLATSSLMFPFGPLLVG	240
Tupai	241	RLLRLLGKRTVSMETGCGVQLCSTLNVFPEVIGPLFFPFLYMIPLQEGELLL	300
Human	241	RLLRLLGKRTVSMETGCGVQLCSTLNVFPEVIGPLFFPFLYMIPLQEGELLL	300
Tupai	301	IAIYVYKIDMILILLSEVALVAVLVGVGKSLMVTIRLLATSSLMFPFGPLLVG	349
Human	301	IAIYVYKIDMILILLSEVALVAVLVGVGKSLMVTIRLLATSSLMFPFGPLLVG	349



利益相反について

利益相反の有無等(平成24年度)

ア 利益相反の有無 有(無)いずれかを記載)

イ 利益相反がある場合には具体的内容(以下に記載)

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況(平成24年度)

ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。

イ 他の研究班と合同で研究会議を開催している。

(開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください)

平成24年11月19日 7班合同班会議

- 1.免疫系を保持した次世代B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用(研究代表者: 竹原徹郎)
- 2.革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じたHBV排除への創薬研究(研究代表者: 茶山一彰)
- 3.ツパイ全ゲノム解析に基づくB型肝炎ウイルス感染感受性小動物モデルの開発に関する研究(研究代表者: 小原道法)
- 4.ヒトチンパンジー・マウスハイブリッド技術を用いたB型肝炎ウイルス感染モデルマウスの開発(研究代表者: 山村研一)
- 5.HBV cccDNAの制御と排除を目指す新規免疫治療薬の開発(研究代表者: 金子周一)
- 6.B型肝炎の新規治療薬を開発するための宿主の自然免疫系の解析に関する研究(研究代表者: 藤田尚志)
- 7.B型肝炎ウイルスの持続感染を再現する効率的な培養細胞評価系の開発に関する研究(研究代表者: 田中靖人)

他の研究班への参加状況

研究代表者が「肝炎研究戦略推進研究班」または「肝臓病から肝の統合分野の医療の高度化研究班(肝炎関係研究分野)」研究班の研究代表者として参加しているか(ア又はイに記載)

ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。

イ 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。

(以下①, ②を記載)

- ①(研究班名)「〇〇〇〇研究班」(研究代表者名: 〇〇〇〇)
- ② 他の研究班で担当している研究と、今回申請している研究の違い(研究内容が重複していないことを具体的に説明)

①①①

平成 24 年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：免疫系を保持した次世代型B型肝炎ウイルス感染小動物モデルの開発とその応用
課題番号：H24-B創-肝炎-一般-015
予定期間：H24年度からH28年度まで
研究代表者：竹原 徹郎
所属研究機関：大阪大学
所属部局：医学系研究科
職名：教授
年次別研究費(交付決定額)：1年目 100,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) B型肝炎の病態の解明や画期的な治療法の開発にはモデル動物を用いた研究が必要である。
- (2) マウスの肝臓をヒト肝細胞で置換する uPA-SCID モデルが開発され、マウスの体内で HBV の感染と増殖を再現することが可能になった。しかし、ウイルスに対する免疫応答を解析できない、系統維持が困難であり高価である、短命であり長期の病態解析ができないなどの欠点がある。
- (3) 取り扱いが容易で、長期に生存できる新規の肝細胞キメラマウスの樹立、さらに免疫応答が解析できる B型肝炎モデルの開発が期待されている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 免疫能を保持した安定した新規 B型肝炎小動物モデルの開発を目的として、新規レシピエントマウスの確立、ドナー細胞の開発、イノキュラムの調整について研究を推進する。
- (2) ハイドロダイナミック法に使用する種々の HBV コンストラクトを作成し、B型肝炎に対するマウス免疫応答を解析できるシステムを樹立する。
- (3) マウスの免疫系をヒト細胞で再構成する方法を確立し、B型肝炎に対するヒト免疫応答を解析できるシステムを樹立する。
- (4) TK-NOG マウスを用いた成人型 B型肝炎モデルを樹立する。
- (5) Bcl-2 関連分子欠損マウスを用いた新規の肝細胞キメラマウスを作成し、B型肝炎モデルの開発を行う。
- (6) Bcl-2 関連分子欠損マウスを用いて胎児期からの肝細胞キメラマウスを作成し、これにより HBV キャリアマウスを樹立し B型肝炎治療への応用を目指す。
- (7) ES/iPS 細胞からの肝細胞・血液細胞の誘導法を確立し、同じ遺伝的背景をもつヒト細胞がマウス個体内で相互作用する新規のキメラマウスを作成し、B型肝炎モデルへの応用を目指す。

III. 1年間の研究成果

・研究代表者

- (1) ゲノタイプ A およびゲノタイプ C の HBV 遺伝子それぞれ 1.2-mer をタンデムに繋いだ発現プラ

スミドを作成した。Balb/cA マウスにこれらの遺伝子をハイドロダイナミック法にて投与したところ、約 5%の肝細胞において HBV 関連抗原が陽性となり、HBs 抗原血症およびウイルス血症が成立した。ゲノタイプ A 投与群はゲノタイプ C 投与群に比し、有意に肝障害が軽微で、HBs 抗原血症が長期に持続し、また、肝細胞における HBc 抗原陽性が長く遷延した。ハイドロダイナミック法でマウスに成立するウイルス増殖システムがヒトの B 型急性感染でみられる応答と酷似していることが示された。

- (2) ヒト肝細胞への置換率が 50~80%の TK-NOG マウスにゲノタイプ A、ゲノタイプ C の患者血清を投与し、感染実験を開始した。

・研究分担者

- (1) NOG-MHC class I/class II KO マウスにヒト末梢血単核球を静注すると、肝臓より分離される単核球は経時的に増加し、移植後 28 日で約 90%がヒト細胞に置換した（移植後当初は NK 細胞、B 細胞、DC の増加を認め、その後徐々に T 細胞の増加を認めた）。NOG マウスへの移植で認められる GVH 応答は著明に抑制され、肝障害も極めて軽微であり、マウス免疫系ヒト化の有望なツールになることが示された。（巽 智秀）
- (2) Bcl-xL/Mcl-1 KO マウスおよび野生型マウスの ED16.5 の胎児の卵黄嚢静脈より GFP トランスジェニックマウス由来の初代培養肝細胞を投与し、生下時において GFP 陽性肝細胞がマウス肝臓内に生着していることを確認した。（疋田隼人）
- (3) EGFP を遺伝子として組込んだ非増殖性組換え HBV (EGFP-HBV) を作成し、その産生を確認した。（上田啓次）
- (4) ヒト iPS 細胞由来分化誘導肝細胞から細胞シートを作成し、肝障害免疫不全マウスへ移植した。血中アルブミン濃度が 100~2000 ng/ml に達し、生着することを確認した。（水口裕之）
- (5) ヒト iPS 細胞から血液細胞への試験管内分化誘導を行い、CD34 陽性細胞への分化誘導法を確立した。（仲野 徹）
- (6) Mcl-1 KO マウスの免疫不全化にむけて戻し交配を開始し、マイクロサテライトマーカーを用いてスピードコンジェニックを推進している。TK-NOG マウスにヒト肝細胞を移植し、50~80%の置換率をもつキメラマウスを作成した。（末水洋志）
- (7) HLA-DR4 を発現する NOG マウスを作成し、ヒト液性免疫反応が惹起することを確認した。ヒト IL-2 発現 NOG マウスにおいてヒト NK 細胞が分化誘導され、細胞傷害活性を有することを確認した。NOG-MHC class I/class II KO マウスを作成した。（高橋武司）
- (8) TK-NOG マウスの病理学的な解析を行い、ヒト化肝炎モデル作出の基礎的データを収集した。（中村雅登）

IV. 平成 25~28 年度の課題

- (1) ハイドロダイナミック法で導入した HBV に対するマウス免疫応答を解析し、ゲノタイプによる感染病態の違いについて解析する。
- (2) ヒト末梢血単核球を用いたマウス免疫系のヒト化についてさらに解析をすすめる。
- (3) ヒト HLA を発現する NOG マウスを用いた免疫系のヒト化について検討する。

- (4) TK-NOG マウスを用いた B 型肝炎モデルについて基礎的なデータを収集する。
- (5) TK-NOG マウスの MHC class I/II をノックアウトし免疫系のヒト化を進める。
- (6) Mcl-1 KO マウスの NOG 化を推進する。
- (7) 胎児期細胞移植法を確立し、Mcl-1 KO マウスを用いた新生児キメラマウスを樹立する。
- (8) iPS 細胞から樹立した肝細胞のマウスへの移植成績についてさらに検討し、生着しやすい iPS 細胞を選別する。
- (9) iPS 細胞から血液細胞への分化誘導に必要な転写因子を明らかにする。
- (10) HBV の感染動態を追跡できる組換え HBV コンストラクトを作成する。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) 安価で安定した B 型肝炎モデルが作成されることにより、B 型肝炎に対する創薬研究が推進される。
- (2) 免疫系を保持した B 型肝炎モデルが作出されることにより、免疫系を標的とした新たな機序の抗 HBV 薬の開発に繋がる。
- (3) CCC DNA の排除を目的とした治療法の開発において有用な in vivo モデルを提供できる。

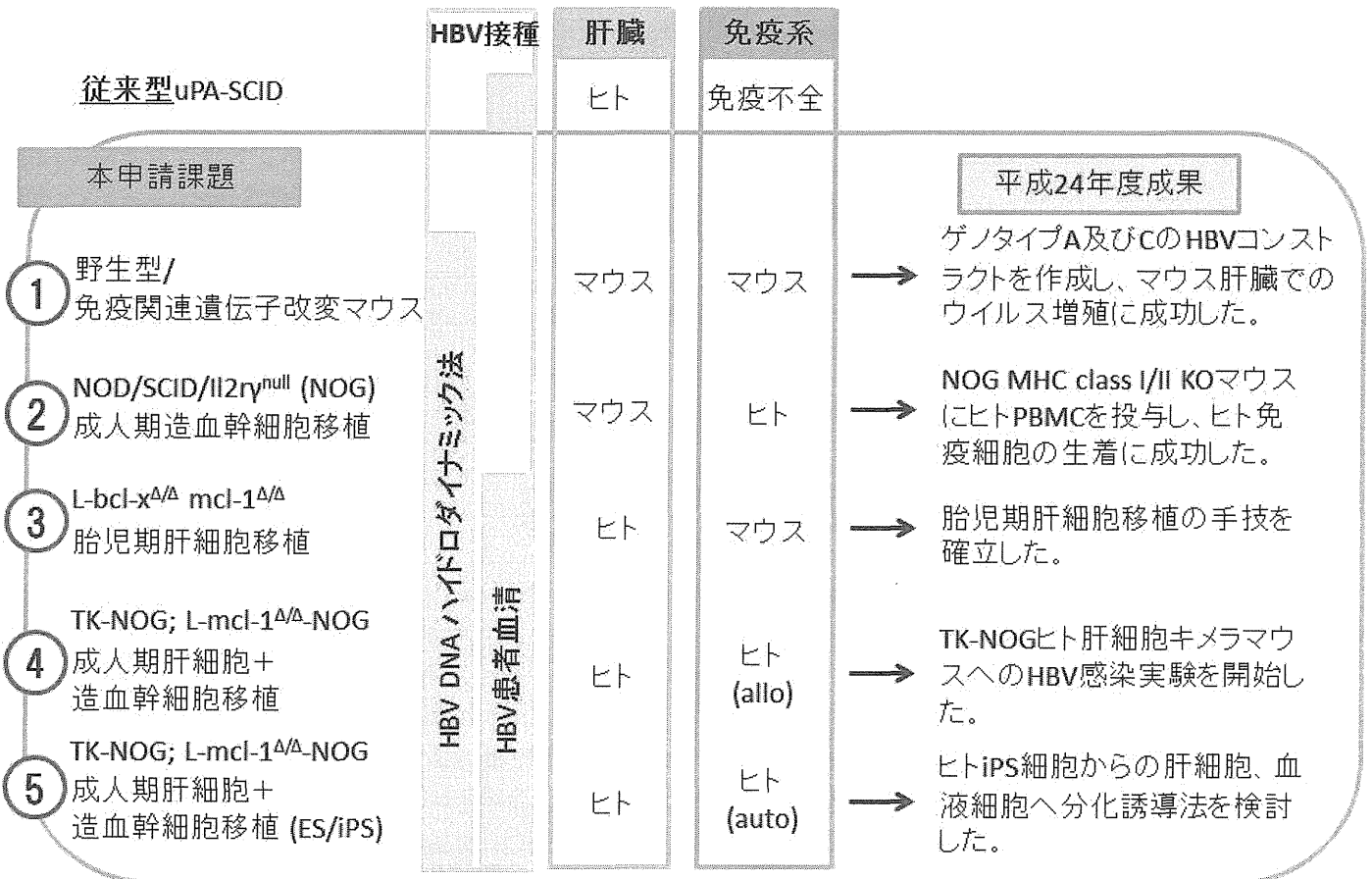
VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

(1) Nawa T, Ishida H, Tatsumi T, Li W, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Hosui A, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N, Takehara T. Interferon- α suppresses hepatitis B virus enhancer II activity via the protein kinase C pathway. *Virology* **432**: 452-459, 2012. (2) Kurokawa M, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Miyazaki M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Ishida H, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Iio S, Doi Y, Yamada A, Oshita M, Kaneko A, Mochizuki K, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Katayama K, Yoshihara H, Imai Y, Hayashi E, Hayashi N, Takehara T. Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol* **47**: 577-585, 2012. (3) Nishida T, Hiramatsu N, Mizuki M, Nagatomo I, Kida H, Tazumi K, Shinzaki S, Miyazaki M, Yakushijin T, Tatsumi T, Iijima H, Kiso S, Kanto T, Tsujii M, Takehara T. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. *Hepatol Res (in press)*. (4) Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials (in press)*. (5) Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1 α transduction. *J Hepatol* **57**: 628-636, 2012. (6) Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Promotion of hepatic maturation of human pluripotent stem cells in 3D co-culture using type I collagen and Swiss 3T3 cell sheets. *Biomaterials* **33**: 4526-4534, 2012. (7) Moriya K, Suzuki M, Watanabe Y, Takahashi T, Aoki Y, Uchiyama T, Kumaki S, Sasahara Y, Minegishi M, Kure S, Tsuchiya S, Sugamura K, Ishii N. Development of a multi-step leukemogenesis model of MLL-rearranged leukemia using humanized mice. *PLoS One* **7**:e37892, 2012. (8) Ito R, Takahashi T, Katano I, Ito M. Current advances in humanized mouse models. *Cell Mol Immunol* **9**: 208-214, 2012. (9) Suzuki M, Takahashi T, Katano I, Ito R, Ito M, Harigae H, Ishii N, Sugamura K. Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR-expressing transgenic NOD/Shi-scid/ γ cnull mouse. *Int Immunol* **24**: 243-252, 2012.

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等

※ポンチ絵等でわかりやすく簡潔に説明してください。

目的: HBVと肝細胞、免疫細胞の複雑な相互作用をマウス個体内で再現できる次世代型のHBV感染・増殖小動物モデルを開発する



●研究代表者の研究歴等

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

・ 過去に所属した研究機関の履歴

昭和63年7月～平成10年4月 大阪大学医学部第一内科

平成10年5月～12年9月 マサチューセッツ総合病院 (MGH) 消化器内科/ハーバード大学医学部

平成12年10月～17年7月 大阪大学大学院医学系研究科分子制御治療学

平成17年8月～現在 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学

・ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

鎌田武信、林 紀夫

・ 主な研究課題

ウイルス肝炎、肝臓、細胞死、自然免疫

・ これまでの研究実績

1. Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. **Hepatology (in press).**
2. TIE2-expressing monocytes as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma correlated with angiogenesis. **Hepatology (in press).**
3. Mcl-1 and Bcl-xL regulate Bak/Bax-dependent apoptosis of the megakaryocytic lineage at multistages. **Cell Death Diff 11: 1856-1869, 2012.**
4. Altered oligosaccharide structures reduce colitis induction in mice defective in β -1,4-galactosyltransferase. **Gastroenterology 142: 1172-1182, 2012.**
5. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: A causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol 57: 92-100, 2012.**
6. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. **J Clin Invest 121: 3343-3356, 2011.**
7. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. **Hepatology 54: 240-251, 2011.**
8. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. **Hepatology 52: 1310-1321, 2010.**
9. Thrombocytopenia exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice. **Gastroenterology 138: 2487-2498, 2010.**
10. Sorafenib inhibited the shedding of MICA on hepatocellular carcinoma cells by downregulating ADAM9. **Hepatology 51: 1264-1273, 2010.**
11. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol 52: 698-704, 2010.**

12. BH3-only protein Bid participates in the Bcl-2 network in healthy liver cells. *Hepatology* 50: 1972-1980, 2009.
13. Anti-cancer therapy inhibits MICA ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 69: 8050-8057, 2009.
14. Mcl-1 and Bcl-xL cooperatively maintain integrity of hepatocytes in developing and adult murine liver. *Hepatology* 50: 1217-1226, 2009.
15. Declining incidence of hepatocellular carcinoma in Osaka, Japan, from 1990 to 2003. *Ann Intern Med* 148: 820-826, 2008.
16. Signal transducer and activator of transcription 3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46: 1564-1573, 2007.
17. Intrahepatic delivery of α -galactosylceramide-pulsed dendritic cells suppresses liver tumor. *Hepatology* 45: 22-30, 2007.
18. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 173: 6072-6081, 2004.
19. Concanavarin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an anti-tumor effect in murine liver. *Hepatology* 40: 1190-1196, 2004.
20. Hepatocyte-specific disruption of Bcl-xL leads to continuous hepatocyte apoptosis and liver fibrotic responses. *Gastroenterology* 127: 1189-1197, 2004.
21. Hepatitis C virus core functions as a suppressor of cyclin-dependent kinase-activating kinase and impairs cell cycle progression. *J Biol Chem* 279: 11719-11726, 2004.
22. Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 190: 1919-1926, 2004.
23. Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J Immunol* 171: 5423-5429, 2003.
24. Hepatitis C virus core protein differentially regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli. *J Biol Chem* 278: 28562-28571, 2003.
25. Suppression of Bcl-xL deamidation in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 63: 3054-3057, 2003.
26. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on interferon α -stimulated dendritic cells in NK cell activation: Impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 170:1249-1256, 2003.
27. Administration of interleukin-12 enhances the therapeutic efficacy of dendritic cell-based tumor vaccines in mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 61:7563-7567, 2001.
28. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 34:55-61, 2001.

研究課題の実施を通じた政策提言（寄与した指針又はガイドライン等）

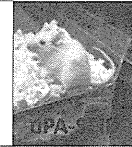
- 「2005年度版 B型およびC型肝炎ウイルス感染者に対する治療の標準化に関するガイドライン」（平成17年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画）
- 「2006年度版 B型およびC型肝炎ウイルス感染者に対する治療の標準化に関するガイドライン」（平成18年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画）
- 「2007年度版 B型およびC型肝炎ウイルス感染者に対する治療の標準化に関するガイドライン」（平成19年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画）
- 「2008年度版 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関するガイドライン」（平成20年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画）
- 「2009年度版 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関するガイドライン」（平成21年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画）
- 「2010年度版 肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関するガイドライン」（平成22年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画）
- 「2011年度版 B型C型慢性肝炎・肝硬変治療のガイドライン」（平成23年3月、主任 熊田博光、申請者は班員として参画）
- 「2012年度版 B型C型慢性肝炎・肝硬変治療のガイドライン」（平成24年3月 主任 熊田博光、申請者は班員として参画）

免疫系を保持した次世代型 B型肝炎ウイルス感染小動物モデル の開発とその応用

研究代表者: 竹原 徹郎
 大阪大学大学院医学系研究科
 消化器内科学

B型肝炎の病態を解明し、画期的な創薬研究を 推進するには、動物モデルの開発が必要である

倫理的な問題



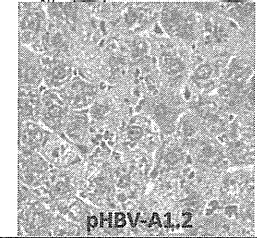
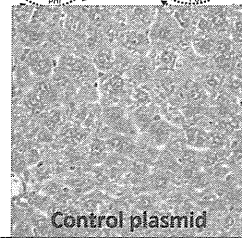
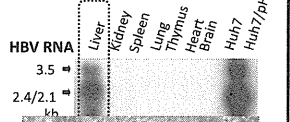
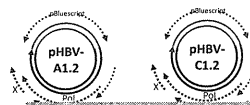
- 管理・作成に労力がかかり高コストである
- 短命であり長期の解析ができない
- 免疫応答の解析ができない

本研究班の目的

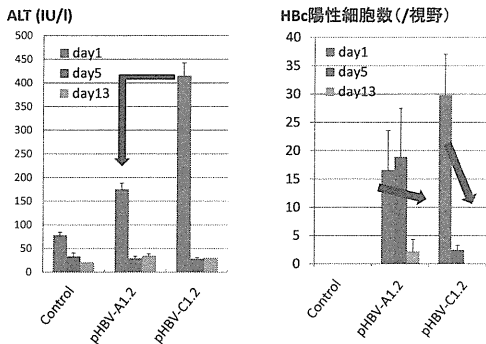
- 免疫系を保持したB型肝炎モデルの作成
- 長期生存可能な安定した肝細胞キメラマウスの作成
- ヒト肝細胞、ヒト免疫細胞(同系)、B型肝炎ウイルス(種々の変異)がマウス個体内で相互作用し病態形成をする新規B型肝炎小動物モデルの作出

	HBV	肝臓	免疫系
従来型uPA-SCID		ヒト	免疫不全 → 免疫病態が解析できない
本申請課題			
免疫解析と免疫系のヒト化			
① 野生型/免疫関連遺伝子改変マウス	マウス	マウス	HBV増殖に対する免疫応答解析 変異ウイルス/KOマウスを用いた ウイルス因子/宿主因子の解析
② NOD/SCID/Il2ry ^{null} (NOG) 成人期末精血・造血幹細胞移植	マウス	ヒト	HBV増殖に対する ヒト免疫応答の解析
③ L-bcl-x ^{ΔΔ} mcl-1 ^{ΔΔ} 胎児期肝細胞移植	ヒト	マウス	HBV感染に対する 免疫応答の解析
④ TK-NOG; L-mcl-1 ^{ΔΔ} -NOG 成人期肝細胞+ 末梢血・造血幹細胞移植	ヒト	ヒト (allo)	HBVの感染・免疫病態の解析 (移植後肝炎)
⑤ TK-NOG; L-mcl-1 ^{ΔΔ} -NOG 成人期肝細胞+ 末梢血・造血幹細胞移植 (ES/iPS)	ヒト	ヒト (auto)	HBVの感染・免疫病態の解析

HBV増殖に対する免疫応答



Genotype A ではGenotype C に比し肝障害が軽微で 肝臓におけるHBV発現が遷延化する



マウス免疫系のヒト化

作製の容易さ 作製の容易さ 作製の容易さ 作製の容易さ
 ヒト免疫系の再構築度 希 希 希 希
 ヒト免疫系の維持 維持 維持 維持
 ヒト免疫反応の惹起力 弱 弱 弱 弱

Hu-PBMC



X

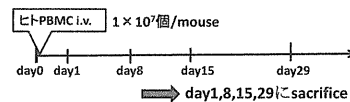
X



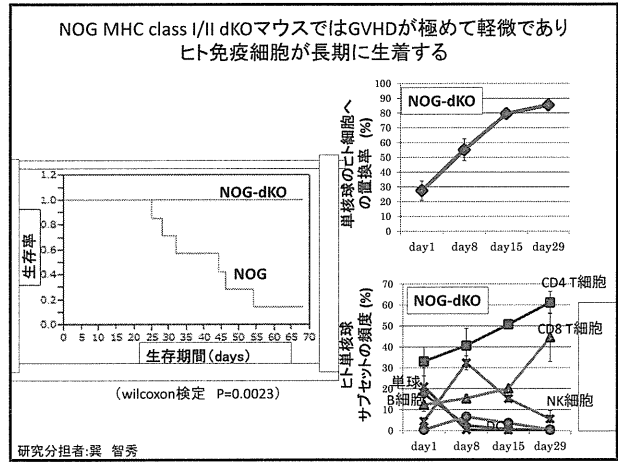
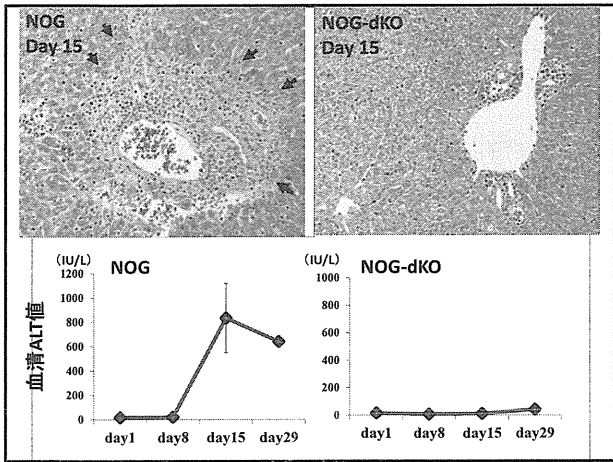
ヒトT細胞以外は早期に脱落
 T細胞もGVHDにより活性化



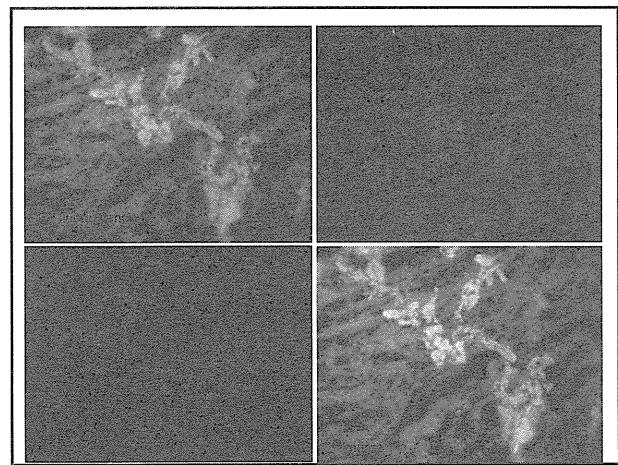
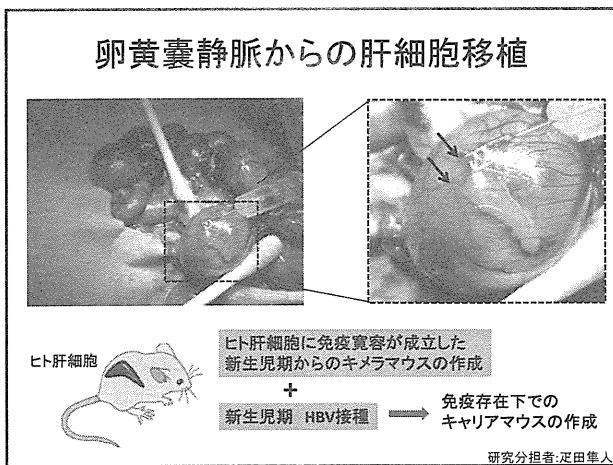
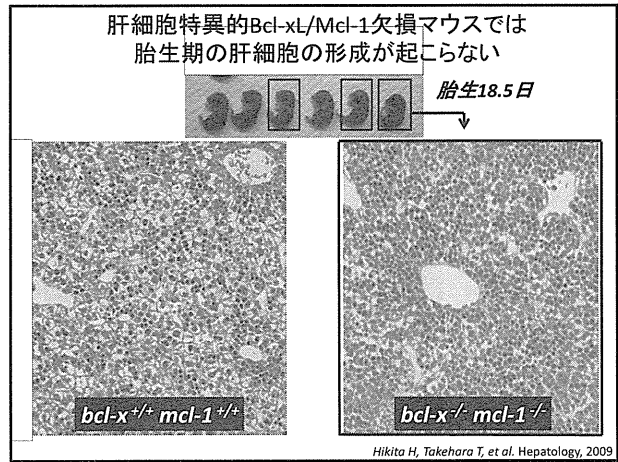
NOG or NOG- lab/b2m dKO (6~8週齢)

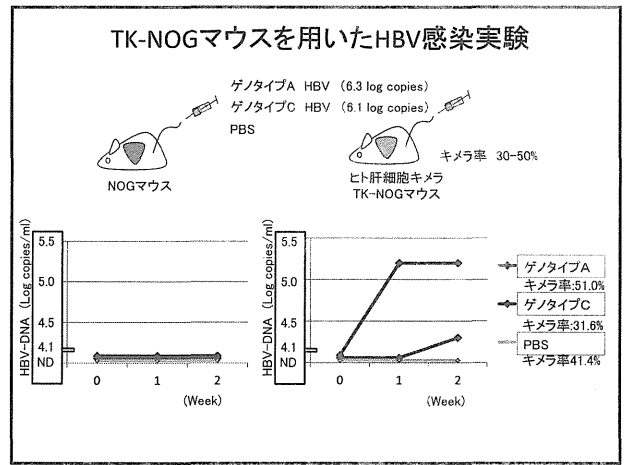
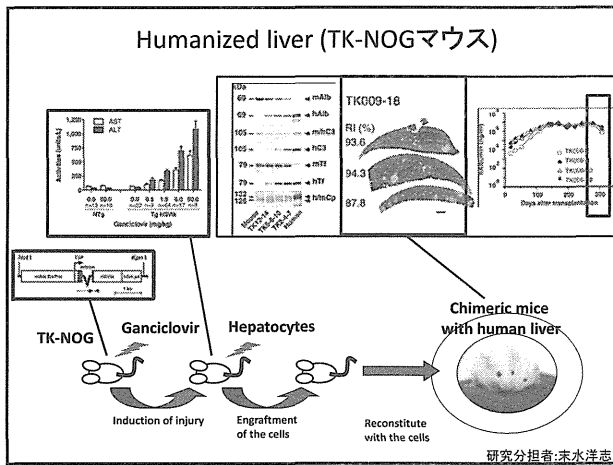


研究分担者: 高橋武司



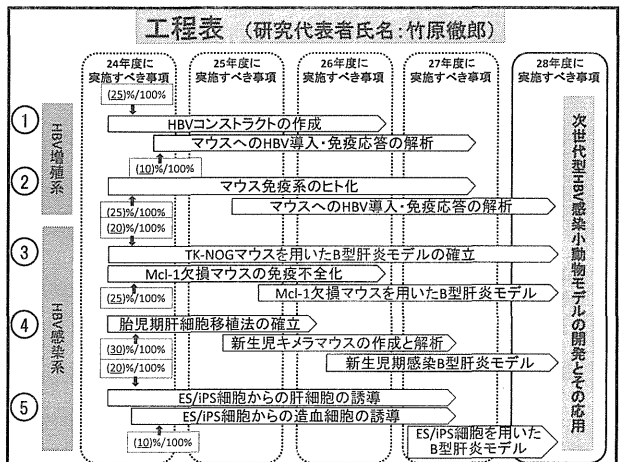
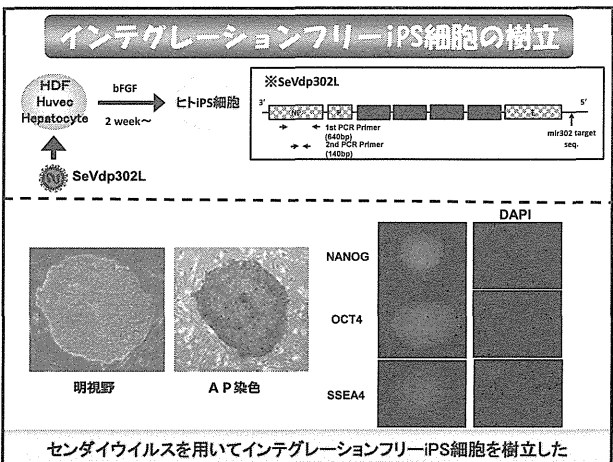
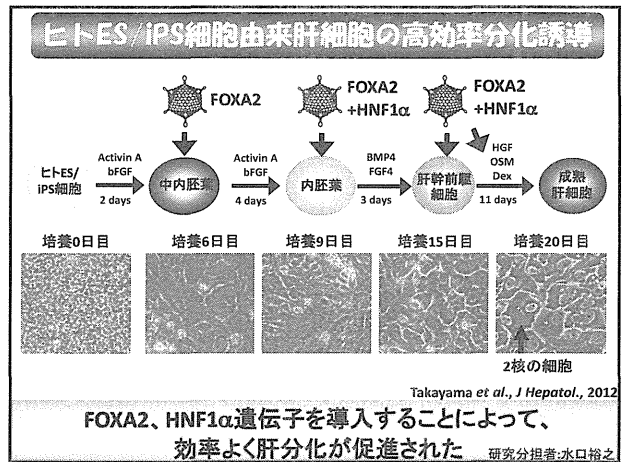
	HBV	肝臓	免疫系
従来型uPA-SCID		ヒト	免疫不全 → 免疫病態が解析できない
本申請課題			
① 野生型/免疫関連遺伝子改変マウス	マウス	マウス	マウス → HBV増殖に対する免疫応答解析 変異ウイルス/KOマウスを用いたウイルス因子/宿主因子の解析
② NOD/SCID/IL2γ ^{null} (NOG) 成人期末梢血・造血幹細胞移植	マウス	ヒト	ヒト → HBV増殖に対するヒト免疫応答の解析
③ L-bcl-x ^{0/0} mcl-1 ^{0/0} 胎児期肝細胞移植	マウス	ヒト	マウス → HBV感染に対する免疫応答の解析
④ TK-NOG; L-mcl-1 ^{0/0} -NOG 成人期肝細胞 + 末梢血・造血幹細胞移植	マウス	ヒト (allo)	ヒト (allo) → HBVの感染・免疫病態の解析 (移植後肝炎)
⑤ TK-NOG; L-mcl-1 ^{0/0} -NOG 成人期肝細胞 + 末梢血・造血幹細胞移植 (ES/iPS)	マウス	ヒト (auto)	ヒト (auto) → HBVの感染・免疫病態の解析





	HBV	肝臓	免疫系
従来型uPA-SCID		ヒト	免疫不全 → 免疫病態が解析できない
本申請課題			
① 野生型/免疫関連遺伝子改変マウス		マウス	マウス → HBV増殖に対する免疫応答解析 変異ウイルス/KOマウスを用いた ウイルス因子/宿主因子の解析
② NOD/SCID/IL2 γ^{null} (NOG) 成人期末梢血・造血幹細胞移植		マウス	ヒト → HBV増殖に対する ヒト免疫応答の解析
③ L-bcl-x $^{\text{fla}}$ mcl-1 $^{\text{fla}}$ 胎児期肝細胞移植		ヒト	マウス → HBV感染に対する 免疫応答の解析
④ TK-NOG; L-mcl-1 $^{\text{fla}}$ -NOG 成人期肝細胞 + 末梢血・造血幹細胞移植		ヒト	ヒト → HBVの感染・免疫病態の解析 (移植後肝炎)
⑤ TK-NOG; L-mcl-1 $^{\text{fla}}$ -NOG 成人期肝細胞 + 末梢血・造血幹細胞移植 (ES/iPS)		ヒト	ヒト (auto) → HBVの感染・免疫病態の解析

研究分担者: 水口裕之



利益相反について

利益相反の有無等(平成24年度)

- ア 利益相反の有無 有・無いずれかを記載
イ 利益相反がある場合には具体的内容(以下に記載)

他の研究班への参加状況

研究代表者が、「肝炎等克服緊急対策研究事業」または「難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(肝炎関係研究分野)」研究班の研究代表者として参加しているか(ア又はイに記載)

- ア 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加していない。
イ 上記研究事業の研究班の研究代表者として参加している。

(以下①、②を記載)

- ①(研究班名)「○○○○研究班」(研究代表者名:○○○○)
② 他の研究班で担当している研究と、今回申請している研究の違い(研究内容が重複していないことを具体的に説明)

合同研究会議開催状況

他の研究班と合同での研究会議開催状況(平成24年度)

- ア 他の研究班と合同で研究会議を開催していない。
① ① 他の研究班と合同で研究会議を開催している。
(開催している場合は、①開催日、②他の研究班の名称、③他の研究班の研究代表者名を記載してください)

平成24年11月19日 大阪大学中之島センター
7班班長会議

次世代動物モデル(竹原)動物・培養技術(茶山)
ツバイ(小原)、ハイブリッド動物モデル(山村)
培養細胞(田中)、自然免疫(藤田)、CCC DNA(金子)

平成24年度 B型肝炎創薬実用化等研究事業『成果概要』

研究課題：革新的な動物モデルや培養技術の開発を通じた HBV 排除への創薬研究

課題番号：H24-B 創-肝炎-一般-016

予定期間：H24 年度から H28 年度まで

研究代表者：茶山 一彰

所属研究機関：広島大学

所属部局：大学院医歯薬保健学研究院

職名：教授

年次別研究費(交付決定額)：1年目 100,000,000 円

I. 研究の意義

- (1) B型慢性肝炎には根治的な治療がない。
- (2) B型肝炎ウイルスの感染、増殖機構を究明し、ターゲットとなる分子を同定するには継代可能な培養細胞系が必要である。
- (3) 基礎化合物をスクリーニングし企業との共同研究により候補化合物を同定する必要がある。
- (4) 肝炎の病態解明と薬物の効果確認、安全性確認にはヒトの免疫細胞による肝炎を発症する小動物モデルが必要である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) B型肝炎ウイルスの継代可能な培養細胞系を作製、改良する。
- (2) HBV の感染増殖を指示する因子を明らかにし、創薬のターゲットとなる分子を同定する。
- (3) B型肝炎ウイルスの長期安定感染マウスモデルを作製し、効果と安全性の確認を可能とする。
- (4) ヒトの免疫細胞により B型肝炎を発症するマウスモデルを作製し、発症に関する免疫学的メカニズムを明らかにする。
- (5) (4)のモデルを利用し、炎症による細胞障害、免疫学的な HBV 排除のメカニズムを明らかにし、創薬のターゲットとなる分子を明らかにする。

III. 1年間の研究成果

- 研究代表者：茶山一彰
- (1) ヒト培養肝細胞への感染効率を向上させ、80%以上の細胞への感染が可能となり、細胞、ヒト肝細胞キメラマウスを使用した継代が可能となった。抗体による感染阻止も確認した(投稿中)。
- (2) 劇症肝炎型の B 型急性肝炎を引き起こす肝炎モデルの作製に成功、浸潤細胞の解析を行った(Hepatology 2012)。
- (3) 臨床材料とヒト肝細胞キメラマウスを用いて HBV 感染に伴う mRNA、miRNA の変化を明らかにし、HBV の粒子形成に特定の miRNA と Ago2 が関与していることを明らかにした(PLoS One 2012)。
- (4) B型肝炎では C 型と異なる遺伝子変化の pressure が存在していること、テロメア領域近傍に HBV DNA の integration が高頻度に行われていることを明らかにした(Nature Genetics 2012)。
- 研究分担者：瀬谷 司 (1) STING, pTBK1 系を介した double strand DNA の細胞内検知による HBV の増殖抑制を確認した。
- 研究分担者：加藤博己 (1)cccDNA の存在を確認出来る培養細胞増殖系を整備した。
- 研究分担者：立野知世 (1)u-PA 遺伝子が deletion されず、安定に発現し、置換率が低下しにくいマウスを開発した(特許出願中)。
- 研究分担者：山本 卓 (1)HBV DNA に特異的に結合する TALE の作製に成功、TALE と HBV の結合性を検討している。
- 研究分担者：田原榮俊 (1)次世代シーケンサーを使用して HBV 感染により変動する血中の新

規 miRNA を同定した。

- ・ 研究分担者：丸澤宏之 (1)Alb-CreERT2 マウスの作製に成功、さらに Cre 存在下で HBs 抗原を発現するマウスを作製中。
- ・ 研究分担者：Hussein H Aly (1)異なる HBV 感染感受性の細胞を作製し、レセプタークロニングの基礎を構築した。
- ・ 研究分担者：阿部弘美 (1)B 型劇症肝炎モデルを使用し肝内浸潤ヒトリンパ球の解析を実施、NK-cell を介した FAS-FASL 系による細胞障害を確認した。さらに樹状細胞の存在が NK-cell の活性化に必須であることを明らかにした。

IV. 平成 25～28 年度の課題

- (1) 作製したパッセージ可能な培養細胞系を用いて HBV の感染増殖支持因子を探索する。
- (2) (1)の増殖因子を阻害する薬物のスクリーニングを企業との共同研究として行う。
- (3) 同定した基礎化合物を元に治療薬を開発し、長期安定 HBV 感染マウスを用いて効果、安全性を確認、治験を行う。
- (4) B 型慢性肝炎のマウスモデルを作製する。免疫学的な細胞障害、HBV 排除に重要な役割を果たす宿主因子を同定する。
- (5) (5)で発見した因子に対する活性化、抑制因子を企業との共同研究で探索する。
- (6) 同定された化合物をもとに薬剤を開発し、効果、安全性を確認、治験を実施する。
- (7) 作製した B 型劇症肝炎型の急性肝炎モデルを用いて劇症肝炎の治療薬を開発、治験を行う。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) HBV の継代増殖が可能な細胞株はすでに研究者に供給されつつあり、HBV に対する研究の発展に寄与し、B 型肝炎の研究がいつそう促進される見込みが出来た。
- (2) 長期に安定な HBV 感染モデルの構築の成功は新たな薬剤の効果、安全性の確認に有用であり、チンパンジーに変わるモデルとして薬物の開発に画期的に寄与する。
- (3) これらの達成は厚生労働行政の肝炎総合対策の成果として肝炎患者に治癒を目指した治療の開発という希望を与える。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

【研究代表者：茶山 一彰】

1. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Nelson Hayes C, 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.
2. Ohishi W and Chayama K. Treatment of chronic hepatitis B with nucleos(t)ide analogues. *Hepatol Res*. 2012; 42: 219-225.
3. Miki D, Ochi H, Hayes CN, Aikata H and Chayama K. Hepatocellular carcinoma: towards personalized medicine. *Cancer Sci*. 2012; 103: 846-850.
4. 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.
5. Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hosono N, Kubo M, Miya F, Arai Y, Takahashi H, Shirakihara T, Nagasaki M, Shibuya T, Nakano K, Watanabe-Makino K, Tanaka H, Nakamura H, Kusuda J, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Ueno M, Shigekawa Y, Kawakami Y, Arihiro K, Ohdan H, Gotoh K, Ishikawa O, Ariizumi S,

Yamamoto M, Yamada T, Chayama K, Kosuge T, 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.

6. 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.

【研究分担者：瀬谷 司】

1. Oshiumi H, Aly HH, Azuma M, Matsumoto M and Seya T. Multi-step regulation of interferon induction by hepatitis C virus. *Arch Immunol Ther Exp.* 2012. (In press).
2. Tatematsu M, Nishikawa F, Seya T and Matsumoto M. TLR3 recognizes single-stranded RNA with incomplete stem structures. *Nat Commun.* 2012. (submitted).

【研究分担者：加藤 博己】

1. Chen Seng N, Kato H and Fujita T. Recognition of viruses in the cytoplasm by RLRs and other helicases--how conformational changes, mitochondrial dynamics and ubiquitination control innate immune responses. *Int Immunol.* 2012; 24: 739-49.

【研究分担者：立野 知世】

1. Hata T, Uemoto S, Fujimoto Y, Murakami T, Tateno C, Yoshizato K and Kobayashi E. Transplantation of Engineered Chimeric Liver With Autologous Hepatocytes and Xenobiotic Scaffold. *Annals of Surgery.* 2012. (In press).
2. Mashimo T, Takizawa A, Kobayashi J, Kunihiro Y, Yoshimi K, Ishida S, Tanabe K, Yanagi A, Tachibana A, Hirose J, Yomoda J, Morimoto S, Kuramoto T, Voigt B, Watanabe T, Hiai H, Tateno C, Komatsu K and Serikawa T. Generation and Characterization of Severe Combined Immunodeficiency Rats. *Cell Reports.* 2012;2:685-694.

【研究分担者：山本 卓】

1. Ochiai H, Sakamoto N, Fujita K, Nishikawa M, Suzuki KI, Matsuura S, Miyamoto T, Sakuma T, Shibata T and Yamamoto T. Zinc-finger nuclease-mediated targeted insertion of reporter genes for quantitative imaging of gene expression in sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109: 10915-10920.
2. Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horch H, Hamaguchi N, Nakamura T, Bando T, Ohuchi H, Yamamoto T, Noji S and Mito T. Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nat Commun.* 2012; 3: 1017.

【研究分担者：田原 栄俊】

1. Zhang X, Horibata K, Saijo M, Ishigami C, Ukai A, Kanno S, Tahara H, Neilan EG, Honma M, Nohmi T, Yasui A and Tanaka K. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat Genet.* 2012; 44: 593-597.
2. Xu D and Tahara H. The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012.

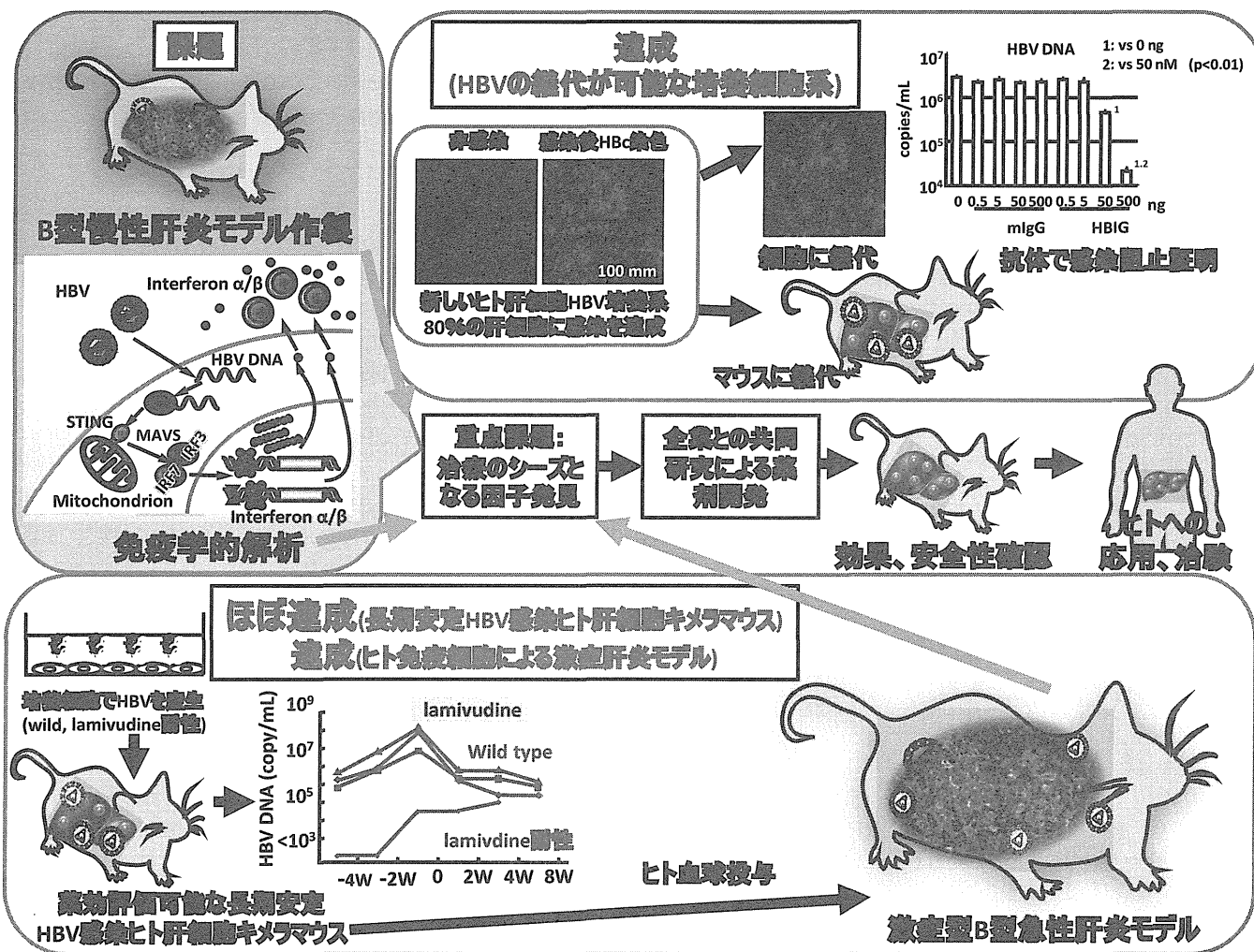
【研究分担者：丸澤 宏之】

1. Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S and Chiba T. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PLoS ONE.* 2012; 7: e35052.
2. Takahashi K, Marusawa H and Chiba T. Large-scale identification of effector genes that mediate the type I interferon antiviral response. *Gastroenterology.* 2012; 142: 178-180.

【研究分担者：阿部 弘美】

1. 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, 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.

Ⅶ. Ⅲ (1年間の研究成果)の概要図等



B型肝炎に対する創薬研究の成果として

(1)図右上に示すように、ヒト培養肝細胞への感染効率を向上させ、80%以上の細胞への感染が可能となった。この細胞はヒト肝細胞キメラマウスから新鮮分離培養したものであり、効率の良い接着が可能である。この細胞を用いて培養上清中に分泌されたB型肝炎ウイルスは、次の細胞、ヒト肝細胞キメラマウスに継代が可能であった。さらにB型肝炎ウイルスに対する中和抗体抗体による感染阻止も確認した(図右上部)。

(2)図左下に示すようにヒト肝細胞キメラマウスを改善し、生着したヒト肝細胞がが長期間高率に維持されるマウスの作製に成功した。このマウスを使用すると、6ヶ月以上の長期間の高ウイルス量維持が期待される。

(3)図下右に示すようにB型肝炎ウイルスを感染させたキメラマウスにヒトリンパ球を投与することにより劇症肝炎型のB型急性肝炎を引き起こす肝炎モデルの作製に成功した。FAS ligandに対する抗体によりこの肝炎は阻止出来ることから劇症肝炎の治療薬の開発に有用なツールが構築出来た。また、劇症肝炎、急性肝炎の免疫学的な研究への利用も可能になった。

●研究代表者の研究歴等

▪ 過去に所属した研究機関の履歴

- ・ 昭和 61 年～平成 2 年 国家公務員共済組合連合会虎の門病院内科
消化器内科学（肝臓病学）に関する臨床研究を行った。
- ・ 平成 2 年～平成 12 年 国家公務員共済組合連合会虎の門病院内科 医長
消化器内科学（肝臓病学）に関する臨床研究を行いつつ、肝炎ウイルスに関する分子生物学的研究を行った。
- ・ 平成 12 年 9 月～ 文部科学教官教授（広島大学内科学第一講座）
消化器内科、循環器内科に関する診療、臨床研究を行いつつ、肝炎ウイルスに関する分子生物学的研究、ヒトの遺伝素因と疾患に関する研究、動物を用いた肝炎ウイルス肝炎モデルに関する研究を開始した。
- ・ 平成 14 年 4 月～ 広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・創生医科学専攻・先進医療開発科学講座・分子病態制御内科学（旧内科学第一講座）教授
消化器内科、循環器内科に関する診療、臨床研究を行いつつ、肝炎ウイルスに関する分子生物学的研究、ヒトの遺伝素因と疾患に関する研究、動物を用いた肝炎ウイルス肝炎モデルに関する研究をさらに展開している。

▪ 主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

- ・ 指導を受けた研究者:熊田博光
- ・ 共同研究者:中村祐輔、松浦善治、脇田隆宇、溝上雅史、吉澤浩司、金子周一、高倉喜信、Jia-Horng Kao[National Taiwan University]、Jake Liang[NIH]

▪ 主な研究課題

1. B 型肝炎ウイルスの増殖に関する研究
2. B 型慢性肝炎の治療に関する研究
3. C 型肝炎ウイルスの増殖とインターフェロン治療効果との関連の研究
4. C 型肝炎ウイルスの genotype に関する研究
5. 肝細胞癌の治療と再発防止に関する研究
6. 消化器癌の形態学的、分子病理学的研究
7. 内科学(消化器内科学)に関する研究

▪ これまでの研究実績

- 特許:
1. 特許公開 2011-041553 インターフェロン療法の効果予測用マーカー
 2. 特許公開 2010-124801 IFN 療法の効果予測用マーカー,IFN 作用増強剤のスクリーニング方法
 3. 特許公開 2009-038994 HCV 核酸配列
 4. 特許公開 2007-332103 特許公開平 11-127860 HCV の治療剤または予防剤

5. ラミブジン耐性B型肝炎ウイルスの高感度検出法
6. 特許公開平 10-066597 G型肝炎ウイルスの定量法
7. 特許公開平 09-313188 G型肝炎ウイルス遺伝子
8. 特許公開平 08-056672 C型肝炎ウイルス遺伝子
9. 特許公開平 05-337000 C型肝炎ウイルスの検査方法およびそれに用いるプライマーセット

論文：

1. *Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hosono N, Kubo M, Miya F, Arai Y, Takahashi H, Shirakihara T, Nagasaki M, Shibuya T, Nakano K, Watanabe-Makino K, Tanaka H, Nakamura H, Kusuda J, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Ueno M, Shigekawa Y, Kawakami Y, Arihiro K, Ohdan H, Gotoh K, Ishikawa O, Ariizumi S, Yamamoto M, Yamada T, Chayama K, Kosuge T, 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.*
2. 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.
3. Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, Idei N, Mikami S, Iwamoto Y, Kajikawa M, Matsumoto T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A, Tomiyama H, Takase B, Yamashina A and Higashi Y. Hyperbilirubinemia, augmentation of endothelial function, and decrease in oxidative stress in Gilbert syndrome. *Circulation.* 2012; 126: 598-603.
4. *Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Nelson Hayes C, 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.*
5. 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.
6. 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.
7. Urabe Y, Tanikawa C, Takahashi A, Okada Y, Morizono T, Tsunoda T, Kamatani N, Kohri K, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y and Matsuda K. A genome-wide association study of nephrolithiasis in the Japanese population identifies novel susceptible Loci at 5q35.3, 7p14.3, and 13q14.1. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002541.
8. 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.
9. Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S and Chayama K. Change in malpractice claims in Japanese gastroenterological practice. *Am J Gastroenterol.* 2012; 107: 143-144.
10. 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.
11. Iwamoto Y, Maruhashi T, Fujii Y, Idei N, Fujimura N, Mikami S, Kajikawa M, Matsumoto T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A and Higashi Y. Intima-media thickness of brachial artery, vascular function, and cardiovascular risk factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 2295-2303.
12. Fujimura N, Jitsuiki D, Maruhashi T, Mikami S, Iwamoto Y, Kajikawa M, Chayama K, Kihara Y, Noma K, Goto C and Higashi Y. Geranylgeranylacetone, heat shock protein 90/AMP-activated protein kinase/endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide pathway, and endothelial function in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 153-160.

13. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Onoyama M, Ohnishi M, Ohara E, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W and Chayama K. Stroma-directed imatinib therapy impairs the tumor-promoting effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an orthotopic transplantation model of colon cancer. *Int J Cancer*. 2012.
14. Takemura Y, Yoshida S, Tanaka S, Kawase R, Onji K, Oka S, Tamaki T, Raytchev B, Kaneda K, Yoshihara M and Chayama K. Computer-aided system for predicting the histology of colorectal tumors by using narrow-band imaging magnifying colonoscopy (with video). *Gastrointest Endosc*. 2012; 75: 179-185.
15. Nakadoi K, Tanaka S, Hayashi N, Ozawa S, Terasaki M, Takata S, Kanao H, Oka S and Chayama K. Clinical outcomes of endoscopic submucosal dissection for rectal tumor close to the dentate line. *Gastrointest Endosc*. 2012; 76: 444-450.
16. Kuwabara T, Hiyama T, Oka S, Urabe Y, Tanaka S, Yoshihara M, Arihiro K, Shimamoto F and Chayama K. Clinical features of pharyngeal intraepithelial neoplasias and outcomes of treatment by endoscopic submucosal dissection. *Gastrointest Endosc*. 2012.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, Chayama K, Saibara T and Jsg N. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol*. 2012; 47: 586-595.
23. Tatsugami M, Ito M, Tanaka S, Yoshihara M, Matsui H, Haruma K and Chayama K. Bile acid promotes intestinal metaplasia and gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012.
24. *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.*
25. 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.
26. 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.
27. Oshita A, Tashiro H, Amano H, Kobayashi T, Onoe T, Ide K, Takaki S, Takahashi S, Arihiro K, Chayama K and Ohdan H. Safety and feasibility of diet-treated donors with steatotic

- livers at the initial consultation for living-donor liver transplantation. *Transplantation*. 2012; 93: 1024-1030.
28. Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Yoshima T, Aikata H, Ikeda K, Kumada H, Toyota J, Morizono T, Tsunoda T, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N and Chayama K. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet*. 2011; 43: 797-800.
 29. Wakita T, Suzuki T, Evans MJ, Shimotohno K, Chayama K, Matsuura Y, Hijikata M, Moriishi K, Seya T, Enomoto N, Koike K, Kato N, Kanto T and Hotta H. Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17th international meeting on hepatitis C virus and related viruses. *Gastroenterology*. 2011; 141: e1-5.
 30. Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Chayama K, Kamatani N, Nakamura Y, Miyakawa Y and Kumada H. Influence of ITPA polymorphisms on decreases of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir. *Hepatology*. 2011; 53: 415-421.
 31. Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T and Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*. 2011; 54: 425-433.
 32. Ohishi W, Fujiwara S, Cologne JB, Suzuki G, Akahoshi M, Nishi N, Tsuge M and Chayama K. Impact of radiation and hepatitis virus infection on risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011; 53: 1237-1245.
 33. Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S and Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology*. 2011; 54: 781-788.
 34. Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N and Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology*. 2011; 54: 764-771.
 35. Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y and Chayama K. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut*. 2011; 60: 261-267.
 36. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S and Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol*. 2011; 54: 872-878.
 37. Kawaoka T, Hayes CN, Ohishi W, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Tsuge M, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Tsunoda T, Nakamura Y, Kumada H and Chayama K. Predictive value of the IL28B polymorphism on the effect of interferon therapy in chronic hepatitis C patients with genotypes 2a and 2b. *J Hepatol*. 2011; 54: 408-414.
 38. Fujimoto Y, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayes CN, Kumada H, Nakamura Y and Chayama K. A single nucleotide polymorphism in activated Cdc42 associated tyrosine kinase 1 influences the interferon therapy in hepatitis C patients. *J Hepatol*. 2011; 54: 629-639.
 39. Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K and Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol*. 2011; 55: 11-18.
 40. Abe H, Hayes CN, Ochi H, Maekawa T, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Nakamura Y and Chayama K. IL28 variation affects expression of interferon stimulated genes and peg-interferon and ribavirin therapy. *J Hepatol*. 2011; 54: 1094-1101.
 41. Mbarek H, Ochi H, Urabe Y, Kumar V, Kubo M, Hosono N, Takahashi A, Kamatani Y, Miki D, Abe H, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Nakamura Y and Matsuda K. A