

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 25 年度）

B 型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、
網羅的な遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：本多 政夫 金沢大学医薬保健研究域 教授

分担研究課題：B 型肝炎ウイルス感染の病態別におけるトランスクリプトーム解析

研究要旨：これまでにB型慢性肝炎（CH-B）、B型肝炎癌（HCC-B）およびC型慢性肝炎（CH-C）、C型肝炎癌（HCC-C）の肝組織を用い、各群における発現上昇・低下する遺伝子を選定し、各群での階層クラスター解析、ネットワーク解析を行った。Graphical Gaussian modeling (GGM)により、非癌部での遺伝子変化と癌部での遺伝子変化の関連性が明らかとなり、CH-B ではDNA修復・機能未知遺伝子がHCC-B のAPIシグナルと関連し、CH-C ではケモカイン・インターフェロンシグナルとHCC-CのEGR1シグナルと関連していることを明らかにした。

本年度は、HCC-B及びHCC-C各10症例の癌部のエクソーム解析を次世代シーケンサーにて行った。HCC-B及びHCC-C共通してWntシグナルの変異が認められ、HCC-BではP53/Notchシグナル、HCC-CではJNK/PI3Kの経路に遺伝子変異が多い傾向が見られた。今後、トランスクリプトーム解析と併せた詳細な解析が必要と考えられた。

A. 研究目的

B 型肝炎の病態の進展や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、B 型肝炎ウイルス感染の病態や療法に対する反応性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

慢性肝炎から肝癌発症に関わる遺伝子群のネットワーク解析ならびに検証を試みた。B 型慢性肝炎（CH-B）37 例、CH-B 関連肝癌 17 例（HCC-B）および C 型慢性肝炎（CH-C）35 例、CH-C 関連肝癌（HCC-C）17 例の肝組織を用いた。またレーザーキャプチャー・マイクロダイセクション（LCM）

法により門脈領域の浸潤リンパ球（cells in the portal area (CPA)）と肝小葉領域細胞（cells in liver lobules (CLL)）を別々に採取し、領域特異的遺伝子発現のプロファイリングを検討した。各群における発現上昇・低下する遺伝子を選定し、各群での階層クラスターを行った。VIF (variance inflation factor) を stopping rule として用い、各群での至適階層クラスター数を決定した。各クラスターにおける発現プロファイルの平均を算出し、偏相関係数を用いて各クラスター間の関係を検討した。高い偏相関係数を示すクラスター間には真の因果関係を有することより、クラスター間を結びグラフ化することでネットワーク構築を試みた。また、CH-B と HCC-B 間および CH-C と HCC-C 間における高い偏相関を示す遺伝子クラスター間で、MetaCore ツールにより既存の遺伝子間の相互関係を検証した。さらに、HCC-B 及び HCC-C 各 10 症例の癌部のエクソーム解析を次世代シーケンサーにて行った。

(倫理面への配慮)

本研究において試料提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて十分な配慮を行った。本解析は遺伝子発現及び蛋白の発現についての解析であるが、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)に準じた十分な対応を行い、患者よりの試料採取については、金沢大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」で承認された説明文書を用いてインフォームドコンセントを得て行っており、十分な対応を行った。

C. 研究結果

CH-B、CH-C、HCC-B、HCC-Cそれぞれにおいて、順に11、7、10、12クラスターを用いた各群でのネットワーク構築が可能であった。HCC-Cでは発現上昇を4つの遺伝子クラスターで認め、これらはそれぞれ細胞増殖群、間質系細胞群、免疫応答群、腫瘍マーカー群であり、LCM解析からCPAで発現する遺伝子を多く含んでいた。一方、発現低下のクラスター群の多くは代謝関連遺伝子にて形成されており、これらの遺伝子は主にCLLで発現する遺伝子であった。これらの遺伝子発現と密接に関連するCH-Cの遺伝子クラスターは、ケモカインを中心とした炎症に関わるクラスターであった。遺伝子クラスター間の関連をMetaCoreにて既報の遺伝子間関連と照合すると、非癌部でのこれらの遺伝子発現と癌部でのEGR1遺伝子の関連性が示唆された。癌部ではEGR1シグナルが細胞増殖・代謝シグナルを制御していた。一方、HCC-Bの遺伝子発現はHCC-Cとは異なり、細胞増殖群が多く、免疫応答群が少ない傾向が認められた。またこれら遺伝子発現と密接に関連するCH-Bの遺伝子クラスターはCH-Bの炎症に関わる遺伝子群のほか、主に肝細胞にて発現するDNA修飾に関わる遺伝子や機能未知の遺伝子群であった。これらの遺伝子群は癌部でのAPI遺伝子の発現と関連しており、癌部に於ける多くの遺伝子がAPIシグナルの制御を受けていた。さらに興味

深いことにAPIを含む遺伝子クラスター内にHBVの転写産物が含まれており、APIの活性化にHBVが関与している可能性が示唆された。慢性肝炎から肝癌へと経過を追えた症例に於いて、非癌部でのこれら癌化誘導遺伝子の発現は、その後の肝癌の発症と密接に関連していることが明らかとなった。HCC-B及びHCC-C各10症例の癌部のエクソーム解析を次世代シーケンサーにて行った結果、HCC-B及びHCC-C共通してWntシグナルの変異が認められ、HCC-BではP53/Noctchシグナル、HCC-CではJNK/PI3Kの経路に遺伝子変異が多い傾向が見られた。今後、トランスクリプトーム解析と併せた詳細な解析が必要と考えられた。

D. 考察

これまでにBioinformaticsの手法を用いたCH-B関連肝癌ならびにCH-C関連肝癌での遺伝子発現ならびに遺伝子群のネットワークの違いが明らかにした。今回の次世代シーケンサーを用いた肝癌のエクソーム解析ではCH-B関連肝癌とCH-C関連肝癌のゲノム異常の違いが示唆された。遺伝子発現解析とゲノムワイド関連解析や次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を組み合わせることにより、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。

E. 結論

B型慢性肝炎、肝癌ならびにC型慢性肝炎、肝癌での遺伝子発現は異なっており、GWASや次世代シーケンサーを用いたゲノム異常と関連する遺伝子発現変化を同定する上で、重要な知見と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Zeng SS, Yamashita T, Kondo M, Nio K, Hayashi T, Hara Y, Nomura Y, Yoshida M, Hayashi T, Oishi N, Ikeda H, **Honda M**, Kaneko S. The transcription factor SALL4 regulates stemness of EpCAM-positive hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 60(1):127-134. 2014.

- (2) Nishida N, Sawai H; Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, **Honda M**, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New susceptibility and resistance HLA-DPA1/DPB1 alleles to hepatitis B virus-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia', submitted to PLOS Genetics, on which you are listed as an author. PLoS One. 2014. in press.
- (3) Takeshita Y, Takamura T, **Honda M**, Kita Y, Zen Y, Kato KI, Misu H, Ota T, Nakamura M, Yamada K, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: a randomised controlled trial. Diabetologia. DOI; 10.1007/s00125-013-3149-9. 2014. in press.
- (4) **Honda M**, Shirasaki T, Shimakami T, Sakai A, Horii R, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Okada H, Murai K, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. Hepatology. DOI; 10.1002/hep.26788. 2013. in press.
- (5) Terashima T, Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Kitahara M, Nakagawa H, Kagaya T, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. Feasibility and efficacy of hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma after sorafenib. Hepatol Res. DOI; 10.1111/hepr.12266. 2013. in press.
- (6) Spaniel C, **Honda M**, Selitsky SR, Yamane D, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM. MicroRNA-122 abundance in hepatocellular carcinoma and non-tumor liver tissue from Japanese patients with persistent HCV versus HBV infection. PLoS One. DOI; 10.1371/journal.pone.0076867. 2013. in press.
- (7) **Honda M**, Yamashita T, Yamashita T, Arai K, Sakai Y, Sakai A, Nakamura M, Mizukoshi E, Kaneko S. Peretinoin, an acyclic retinoid, improves the hepatic gene signature of chronic hepatitis C following curative therapy of hepatocellular carcinoma. BMC Cancer. DOI; 10.1186/1471-2407-13-191. 2013. in press.
- (8) Miyahara K, Nouse K, Morimoto Y, Takeuchi Y, Hagihara H, Kuwaki K, Onishi H, Ikeda F, Miyake Y, Nakamura S, Shiraha H, Takaki A, **Honda M**, Kaneko S, Sato T, Sato S, Obi S, Iwadou S, Kobayashi Y, Takaguchi K, Kariyama K, Takuma Y, Takabatake H, Yamamoto K; Okayama Liver Cancer Group. Pro-angiogenic cytokines for prediction of outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Br J Cancer. 109(8):2072-2078. 2013.
- (9) Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, **Honda M**, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. Eur J Immunol. 43(11):2956-2968. 2013.
- (10) Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, **Honda M**, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology. 58(3):1133-1142. 2013.
- (11) Komura T, Sakai Y, **Honda M**, Takamura T, Wada T, Kaneko S. ER stress induced impaired TLR signaling and macrophage differentiation of human monocytes. Cell Immunol. 282(1):44-52. 2013.
- (12) Shirasaki T, **Honda M**, Shimakami T, Horii R, Yamashita T, Sakai Y, Sakai A, Okada H, Watanabe R, Murakami S, Yi M,

Lemon SM, Kaneko S. MicroRNA-27a regulates lipid metabolism and inhibits hepatitis C virus replication in human hepatoma cells. *J Virol.* 87(9):5270-5286. 2013.

- (13) 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. Association of interleukin-28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. *Clin Cancer Res.* 19(7):1827-1837. 2013.
- (14) Yamashita T, **Honda M**, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 57(4):1484-1497. 2013.

2. 学会発表

- (1) **Masao Honda**, Takayoshi Shirasaki, Tetsuro Shimakami, Akito Sakai, Rika Horii, Kuniaki Arai, Tatsuya Yamashita, Yoshio Sakai, Taro Yamashita, Hikari Okada, Mikiko Nakamura, Eishiro Mizukoshi and Shuichi Kaneko. Hepatic interferon-stimulated genes are

differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes. (口演 32242) 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses (HCV2013).

メルボルン 2013.

- (2) **Masao Honda**, Takayoshi Shirasaki, Tetsuro Shimakami, Akito Sakai, Rika Horii, Kuniaki Arai, Tatsuya Yamashita, Yoshio Sakai, Taro Yamashita, Hikari Okada, Mikiko Nakamura, Eishiro Mizukoshi and Shuichi Kaneko. Hepatic interferon-stimulated genes are differentially regulated in the liver of chronic hepatitis C patients with different interleukin 28B genotypes (口演 Parallel 35: HCV Pathogenesis) The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD 2013).
ワシントンD.C. 2013.

G. 知的所得権の出願・登録状況

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 25 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、
網羅的な遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：間野 修平 統計数理研究所 准教授
研究協力者：西野 穰 国立遺伝学研究所 特任研究員

分担研究課題：多型情報と臨床情報を統合した統計解析手法の開発

研究要旨：GWASでは非常に多数のSNPを調べるため、標準的な統計解析を適用することが難しい。標準的解析を行うためには、まず考慮すべきSNPを絞らざるをえない。本年度は、特に、全ゲノムのSNPと臨床情報の交互作用の検出を目的とした研究を実施した。考案した手続きにより提供されたデータを解析したところ、多重比較の調整を行ってもなお有意な効果として、年齢とSNPの交互作用が女性における治療奏功に關与することを示した。さらに、このSNPを用いることにより、従来のIL28のSNPのみによる奏功予測を有意に改善できることを示した。

A. 研究目的

GWASでは非常に多数のSNPを調べるため、標準的な統計解析を適用することが難しい。臨床的変量を組み合わせ、予測モデルの作成、交互作用の検定、グラフィカルモデルの推定など標準的解析を行うためには、まず考慮すべきSNPを絞らざるをえない。回帰モデルによる変量選択については、情報量基準によるステップワイズ法が標準的であるが、変量が非常に多く、いくつかの寄与を持つ変量があり、個々の寄与は強くない、というGWASにおいて想定される状況では、ステップワイズ法による変量選択は困難であることが指摘されており、L1正則化回帰を用いることが標準的である。

一昨年度は、既存のデータについて、L1正則化回帰による変量選択とガウシアン・グラフィカルモデルの推定を実施し、それらの有効性を確認した。しかし、L1正則化回帰により選択される変量は、リサンプリング標本、層別化標本などにおいて再現性が低いことが観察された。そこで、昨年度は、変量選択に関する一層の検討、全ゲノムを対象とする検定における偽陽性の評価の二点を目的とした。前者については、

Elastic net+stability selectionによる変量選択について、GWASのデータサイズに耐える仕様で実装したソフトウェアを開発した。後者については、不完全浸透や表型模写があったとしても、症例対照研究は偽陽性を著しく減らすことを示した。

残った問題は、交互作用の網羅的検出であった。既存のアプローチは周辺効果に着目して選んだ因子に対して網羅的に交互作用を検定することであるが、主効果がなければ上手くいかないことは明らかである。一方、SNPだけでなく、臨床情報も網羅的に取得されるようになっている。臨床情報との交互作用は、医学的に非常に興味がある上に、遺伝子間の交互作用に比較すれば検定の数が少ないので、その検出は比較的容易であるにも拘わらず、それを認識した解析が行われていない。そこで、本年度は、臨床情報とSNPの交互作用の網羅的解析の手続きを考察し、提供されたデータに適用することで、その評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

まず、研究代表者らの過去の研究に使用

されたデータについて、臨床情報と全ての SNP の間の交互作用を探索した。具体的には、肝炎治療の奏功について、共変量として各々の SNP のアレルの数と臨床情報を取り、交互作用項のないロジスティックモデルと交互作用項のあるロジスティックモデルの尤度比を検定した。

検出された交互作用の治療奏功における予測力の評価として、ROC 曲線の下面積の増加の意味で、交互作用の有るモデルが有意に奏功予測を改善するかどうかを検討した。さらに、代表者らの過去の研究により強力な治療奏功の予測因子になっている IL28 に対して、検出された交互作用が上記の意味で有意に奏功予測を改善するかどうかについて検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮として、解析に供するデータを使用することについて、データを取得する各参加機関、分担者が所属する統計数理研究所の研究倫理審査委員会より承認を得た。

C. 研究結果

女性において、共変量として年齢と各 SNP の型を取り、それらの交互作用を探索したところ、SNP rs1287948 において、 $P=7 \times 10^{-8}$ と Bonferroni の多重比較の補正の下でもなお有意な交互作用が検出された。さらに、ROC 曲線の下面積を計算したところ、交互作用のないモデルでは 0.704、交互作用のあるモデルでは 0.867 であり、交互作用のあるモデルは交互作用のないモデルを DeLong の検定の意味で有意に優越した。したがって、rs1287948 と年齢の交互作用は女性における治療奏功の予測因子であると考えられた。

次に、共変量として、研究代表者らにより発見された IL28 の近傍の SNP の型と年齢を用いる場合と、さらに rs1287948 と、その年齢との交互作用を追加して用いる場合の予測力の比較を検討した。前者の ROC 曲線の下面積が 0.839 であるのに対して、後者では 0.934 であり、本研究で発見された

rs1287948 を用いたモデルは、用いない既存のモデルを有意に優越した。

D. 考察

Rs1287948 は PARP1 という single strand brake の修復に働く遺伝子の下流にあるが、この遺伝子の阻害薬はトリプルネガティブの乳がんのための分子標的薬として期待されている。本研究の結果は、閉経後の女性において奏功確率が下がるという臨床的によく知られた事実を分子レベルでサポートするものであるが、さらに、この予後の悪化に PARP1 という遺伝子が関わることを示唆していると考えられる。

E. 結論

最近の GWAS においては、SNP だけでなく、臨床情報も網羅的に取得されるようになってきている。臨床情報との交互作用は、医学的に非常に興味がある問題でもある。本年度は、交互作用の網羅的検出を目的としつつも、周辺効果の存在を仮定しない手続きを考案し、実際のデータにおいてそれが機能することを実証した。今後は、提案した手続きが GWAS において必須のものとしてとらえられるべきであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Nishino, J. and **Mano, S.** (2013) “Expected number of selected SNVs in filtering approaches”, special issue of Statistical Analysis of Biomarkers for Personalized Medicine in *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2013: 179761. 13pp
- (2) **間野修平**(2013)「ポストゲノム時代に遺伝疫学を考える」生物の科学「遺伝」67 巻 3 号, 368-381.
- (3) Nishino, J., Sugiyama, M., Nishida, N., Tokunaga, K., Mizokami, M. and **Mano S.** “The SNP \times age interaction on response to interferon- α and ribavirin therapy in hepatitis C woman patients”, submitted to Journal of Medical Virology.

2. 学会発表
なし

G. 知的所得権の出願・登録状況

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 25 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、
網羅的な遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授
研究協力者：伊藤 昌彦 浜松医科大学感染症学講座 助教

分担研究課題：HBV 陽性患者における HBV 遺伝子の解析及び宿主細胞分化度が HBV 複製に及ぼす影響の解析

研究要旨：ウイルス因子解析グループとして、本研究班で収集されたHBV陽性肝疾患患者血清中のHBV遺伝子解析、特に肝癌の発症リスクに関与するHBV変異を解析した。肝細胞がん癌症例群と慢性肝炎+無症候性キャリア群で比較解析を行った結果、HBx/Enhancer II領域に含まれるC1653Tの変異頻度が肝癌症例群で有意に高いことが見出された。

ウイルス側の遺伝要因解析の一環として、宿主肝臓細胞の分化度の違いがHBV複製許容性に影響するかを、独自に樹立したHdo細胞と親細胞HuH-7を用いて解析した。遺伝子型A-Dの混合DNAを導入してHBV複製を調べた結果、Hdo細胞では4 HBV株とも同程度に複製するのに対し、HuH-7では遺伝子型Bが特に高複製を示した。HBV DNA複製において、ウイルス遺伝子型に特徴的な分化度依存性が存在するのかもしれない。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）キャリアの数は、世界的には3億5000万人にのぼると推定される。HBVの持続感染、病態進展、治療薬応答性などに関与する宿主側及びウイルス側の両遺伝要因が明らかとなることにより新たな診断技術、治療法の開発へ繋がることが期待される。

本研究では、ウイルス因子解析グループとして、本研究班で収集された HBV 陽性肝疾患患者血清中の HBV 遺伝子解析、特に肝癌の発症リスクに関与する HBV 変異等を解析した。また、ウイルス側の遺伝要因解析の一環として、宿主肝臓細胞の分化度の違いが HBV 複製許容性に影響するかの解析を行った。

B. 研究方法

QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて血清より total DNA を抽出し、PCR にて HBV DNA 断片を得、ダイレクトシーケンシングにて遺伝子配列を決定した。

HBV ゲノムの 1.24 倍長を含むプラスミド（遺伝子型 A, B, C, D）は国立国際医療研究センター溝上先生より分与された。両プラスミドをリプログラミング化細胞株 Hdo#17, Hdo#23 及び parental の Huh7 細胞へトランスフェクションし、経時的に培養上清また細胞を回収し、ELISA 法により HBe 抗原 IHBs 抗原を測定また HBV 塩基配列を決定した。

（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た。提供試料、個人情報厳格に管理、保存した。

C. 研究結果

1) 患者検体の HBV 遺伝子解析

本研究班の 15 施設で収集され匿名化の上提供された HBV 陽性肝疾患患者血清について HBV 遺伝子解析を行った。これまでに患者 67 検体について、HBx, Enhancer II, Basal Core promoter, PreC/C 領域を含む nt1360 から nt2062 領域の HBV DNA 配列を決定した。ウイルス因子解析グループ（国立感染研、名古屋市立大、浜松医大）の全成績をまとめ、肝細胞がん癌症例群と慢性肝炎+無症候性キャリア群で比較解析を行った結果、HBx また Enhancer II に含まれる C1653T の変異頻度が肝癌症例群で有意に高いことが見出された。

2) 宿主細胞分化度が HBV 複製に及ぼす影響

ウイルス側の遺伝要因解析の一環として、宿主肝臓細胞の分化度の違いが HBV 複製許容性に影響するかを解析している。昨年度、肝がん細胞 Huh7 のリプログラミング化によって肝臓実質細胞及び胆管上皮細胞に分化しうるオーバル様細胞(Hdo#17, Hdo#23)を樹立した。HBV 遺伝子型 A と C をそれぞれ導入したところ、この細胞株は HBV 複製許容性を維持していることを見出した。本年度、細胞の分化度の違いが複製しやすい HBV 株が異なるかを明らかにするため、HBV 遺伝子型 A, B, C, D の各ゲノムを同量混和し、HuH-7, Hdo#17, Hdo#23 にそれぞれ導入して経時的に各細胞内の HBV DNA を解析した。遺伝子導入後 6 日目まで、各細胞内の HBV DNA は 4 種類の HBV 株ともほぼ同じ割合で検出された。しかしながら、9 日目では、Hdo#17, Hdo#23 では 4 HBV 株ともほぼ同等に検出されたのに対し、HuH-7 では遺伝子型 B (Bj)株が全 population の半数以上を占めた。

D. 考察

本研究班で収集された HBV 陽性患者検体について、肝がん発症と関連しうる HBV 変異をウイルス因子解析グループで共同解析した。文献的には、T1464G, C1485T, 1613A, C1653T, T1753V, A1762T, G1764A, G1896A などの点変異と肝癌発症との関連

が報告されている。今回の解析からそのうち C1653T 変異が肝癌発症と有意に関連することが示された。この変異は Enhancer II 配列また HBx の変異であり、HBV 遺伝子発現制御に影響が生じる可能性は考えられるもののこれまでその機序は明らかにされていない。同変異が間接的に細胞増殖等影響する可能性も含め詳細な分子機構解析が必要である。

昨年度、肝癌細胞のリプログラミング化操作によって樹立した Hdo 細胞は、肝実質細胞、胆管上皮細胞へ誘導可能な bipotential な性質を有するオーバル細胞（成体肝幹細胞とも呼ばれる）に近似していた。本年度は、この低分化細胞株と親細胞 HuH-7 を駆使して、細胞の分化度の違いが HBV 増殖性に及ぼす影響を調べた。その結果、一部の HBV 株（遺伝子型 B）は、Hdo 細胞よりも HuH-7 細胞で明らかに高増殖性を示すことが見出された。HBV の遺伝子型に特徴的な分化度依存性が存在する可能性が考えられる。キーとなる宿主側及びウイルス側要因を解明したい。

E. 結論

1) HBx/Enhancer II 領域に存在する C1653T の HBV DNA 変異頻度が肝癌症例群で有意に高いことが見出された。

2) HBV 複製において、遺伝子型に特徴的な分化度依存性が存在する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, **Suzuki T**, Tagawa Y. An in vitro liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. J Biosci. Bioeng (in press).

2. 学会発表

(1) 中島謙治、伊藤昌彦、李媛、孫鎖鋒、**鈴木哲朗**. B 型肝炎ウイルス (HBV) プレゲノム RNA 核外移行機序の解析。

第 61 回日本ウイルス学会学術集会.
神戸. 2013 年 11 月.

G. 知的所得権の出願・登録状況

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 25 年度）

B型肝炎ウイルス感染の病態別における宿主因子等について、
網羅的な遺伝子解析を用い、新規診断法及び治療法の開発を行う研究

分担研究者：田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授
研究協力者：村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任助教

分担研究課題：ウイルスマーカーの臨床的有効性評価

研究要旨：全国多施設共同研究により収集された症例の中で、HBs抗原陽性の肝がん患者 238例検体と、年齢を一致させた非肝がん患者(無症候性キャリア、慢性肝炎) 171例をコントロールとして、ウイルス遺伝子解析を行った。結果：男性の割合($p<0.0001$)、genotype Cの割合($p<0.0001$)、A1762T/G1764A変異($p<0.05$) が肝がん患者で有意に高かった。これらは、従来から肝がんとの関連性が報告されているウイルス変異である。今後は宿主因子と組み合わせることで、より精度の高い診断が期待される。

A. 研究目的

本研究班の目的は、B型肝炎ウイルス感染に起因する各種の病態形成に関わる宿主(ヒト)因子を網羅的ゲノム解析により同定し、新たな診断法や治療法の開発に寄与することにある。分担研究として、同一個体内でのウイルスゲノムの解析や遺伝子機能解析も実施することにより、各種病態形成に関わる宿主遺伝要因間や宿主遺伝要因とウイルス因子間の相互作用も明らかにすることである。

B. 研究方法

全国多施設共同研究により、検体および対応する臨床データと患者情報(付帯情報)の収集を行った。各施設において検体とデータは、連結可能な匿名化を行った上で提出頂いた。HBs抗原陽性の肝がん患者 238 例検体と、年齢を一致させた非肝がん患者(無症候性キャリア、慢性肝炎) 171 例をコントロールとして、検体を採取、DNA 抽出、ウイルス遺伝子配列を決定し、肝がん特異的変異の有無を検索した。

(倫理面への配慮)

ヒト由来試料の解析にあたり、新規試料については必ずインフォームドコンセントを

取得し、既存試料についてはインフォームドコンセントの取得されたもののみを取り扱い、解析データの公表に際しては個人情報保護を徹底する。

C. 研究結果

肝がん患者 238 例検体と、非肝がん患者 171 例について付帯情報を比較した結果、男性の割合と genotype C の割合が肝がん患者で有意に高かった($p<0.0001$)。これらの内、ウイルス遺伝子データが得られた肝がん患者 156 例検体と、非肝がん患者 138 例について解析を行った結果、A1762T/G1764A 変異が肝がん患者で有意に高かった($p<0.05$)。

D. 考察

従来から報告されている、コアプロモーター領域の A1762T/G1764A 変異が発がんに関連していること、肝がん患者に genotype C の割合が高いことが示された。今後は宿主因子と組み合わせることで、より精度の高い診断が期待される。

E. 結論

本研究で検体を収集した日本人集団において、肝がんに関連するウイルス因子が同定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Iijima S, Matsuura K, Shinkai N, Watanabe T, Poovorawan Y, **Tanaka Y**. Genetic association of human leukocyte antigens with chronicity or resolution of hepatitis B infection in Thai population. PLoS One. 2014;9(1):e86007.
- (2) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, **Tanaka Y**, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. PLoS One. 2014;9(2):e86449.
- (3) Elkady A, Aboufotuh S, Ali EM, Sayed D, Abdel-Aziz NM, Ali AM, Murakami S, Iijima S, **Tanaka Y**. Incidence and characteristics of HBV reactivation in hematological malignant patients in south Egypt. World J Gastroenterol. 2013;19(37):6214-20.

2. 学会発表

- (1) Posuwan N, Payungporn S, Tangkijvanich P, Ogawa S, Murakami S, Matsuura K, **Tanaka Y**, Poovorawan Y. The variation of human leukocyte antigens (HLA) associated with chronicity and viral clearance in HBV infected Thai patients. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2013. June 6-10, 2013. Singapore.
- (2) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, **Tanaka Y**, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K,

Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Mawatari Y, Kawashima M, Tokunaga K, Mizokami M. Trans-ethnic analyses of HLA-DPA1, DPB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 1-5, 2013. Washington, DC.

- (3) 西田奈央, **田中靖人**, 杉山真也, 馬渡頼子, 石井真由美, 徳永勝士, 溝上雅史. C型慢性肝炎の治療効果に関連する第二遺伝要因の探索. 第49回日本肝臓学会総会. 平成25年6月6日~7日. 東京.
- (4) 澤井裕美, 西田奈央, 松田浩一, 馬渡頼子, **田中靖人**, 溝上雅史, 徳永勝士. 中国集団におけるHBV陽性肝癌感受性候補SNPの東アジア集団での検証. 第49回日本肝臓学会総会. 平成25年6月6日~7日. 東京.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行一覧

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
徳永勝士	多因子疾患に関する大規模ゲノム解析研究の最前線		MEDICAL TECHNOLOGY 3	医歯薬出版株式会社		2014	42(3): 272-276
長岡進矢, 八橋 弘	インターフェロン治療, -III. 治療編, 2. 抗ウイルス薬による治療-	田中榮司 他	HEPATOLOGY PRACTICE 1 B型肝炎の診療を極める-基本から最前線まで	文光堂	東京	2013	97-103
八橋 弘	I. HBV とその感染症の基礎, 4. HBV 感染の診断法	持田智	de novo B型肝炎-HBV再活性化予防のための基礎知識-	医薬ジャーナル社	大阪	2013	55-67
八橋 弘	PegIFN と HBs 抗原量	溝上雅史	別冊・医学のあゆみ B型肝炎-最新治療コンセンサス	医歯薬出版株式会社	東京	2013	63-68

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
Nishida N, Tokunaga K , and Mizokami M:	Genome-wide association study reveals host genetic factors for liver diseases.	J. Clin. Translat. Hepatol.	in press		2014
* Tokunaga K	Lessons from genome-wide search for disease-related genes with special reference to HLA-disease associations.	Genes	5	e84-96	2014
* Nishida N , Sawai H; Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y , Kurosaki M , Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M , Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K , Tanaka E, Mochida S ,	New susceptibility and resistance HLA-DPA1/DPB1 alleles to hepatitis B virus-related diseases identified by a trans-ethnic association study in Asia', submitted to PLOS Genetics, on which you are listed as an author.	PLoS One	in press		2014

Watanabe M, Eguchi Y, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, <u>Tokunaga K, Mizokami M.</u>					
* <u>Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M,</u> Ueda R.	Strategy for preventing hepatitis B reactivation in patients with resolved HBV infection following rituximab-containing chemotherapy	Hepatology			2013
<u>Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M,</u> Ueda R	Is Antiviral Prophylaxis Necessary to Prevent Hepatitis B Virus (HBV) Reactivation in Patients With HBV-Resolved Infection Receiving Rituximab-Containing Chemotherapy?	J Clin Oncol.	31(35)	4480	2013
Trinks J, Sugiyama M, <u>Tanaka Y,</u> Kurbanov F, Benetucci J, Giménez E, Weissenbacher MC, <u>Mizokami M,</u> Oubiña JR	In vitro replication competence of a hepatitis B genotype D/A recombinant virus: dissimilar biological behaviour regarding its parental genotypes	J Gen Virol	94	2724-8	2013
*Ito K, Yotsuyanagi H, <u>Yatsushashi H,</u> Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, <u>Tanaka Y,</u> Sugiyama M, Murata K, Masaki N, <u>Mizokami M</u>	Risk Factors for Long-Term Persistence of Serum Hepatitis B Surface Antigen Following Acute Hepatitis B Virus Infection in Japanese Adults	Hepatology	59(1)	89-97	2014
*Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, <u>Mizokami M,</u> Miyakawa Y, <u>Koike K</u>	High Levels of Hepatitis B Virus After the Onset of Disease Lead to Chronic Infection in Patients With Acute Hepatitis B	Clin Infect Dis	57(7)	935-42	2013
Nakano N, <u>Kusumoto S, Tanaka Y,</u> Ishida T, Takeuchi S, Takatsuka Y, Akinaga S, <u>Mizokami M,</u> Ueda R, Utsunomiya A	Reactivation of hepatitis B virus in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma receiving the anti-CC chemokine receptor 4 antibody mogamulizumab	Hepatology Res			2013

*Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y , Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M , Wakita T .	Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP.	Hepatology.	doi: 10.1002/hep.26982.	[Epub ahead of print]	2013
Nakagawa, S., Bai, H., Sakurai, T., Nakaya, Y., Konno, T., Miyazawa, T., Gojobori, T. , Imakawa, K.	Dynamic Evolution of Endogenous Retrovirus-Derived Genes Expressed in Bovine Conceptuses during the Period of Placentation.	Genome Biol Evol	5(2)	296-306	2013
Takeda, J., Yamasaki, C., Murakami, K., Nagai, Y., Sera, M., Hara, Y., Obi, N., Habara, T., Gojobori, T. , Imanishi, T.	H-InvDB in 2013: an omics study platform for human functional gene and transcript discovery.	NAR	41(D1)	D915-9	2013
Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly HH, Fukasawa M, Fujimoto A, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T .	Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP.	Biochem Biophys Res Commun.	443(3)	808-13	2014
Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y , Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T , Zhu J, Issa JP, Kondo Y.	Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers.	Gastroenterology.	146(2)	562-72.	2014
*Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y , Murata K, Aizaki H, Wakita T .	Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID.	J Biol Chem.	288(44)	31715-27	2013
八橋 弘	ウイルス肝炎と肝癌の撲滅を目指した実地診療のすすめかた, B型肝炎の自然経過と治療の進歩—実地医家はどのように対処すればよいのか—	Medical Practice	30(2)	186-193	2013

*Morita S, <u>Matsumoto A</u> , Umemura T, Shibata S, Kamiyo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E.	Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B.	Hepatol Res	in press		2013
Kanda T, Jiang X, Nakamoto S, Nakamura M, Miyamura T, Wu S, <u>Yokosuka O</u> .	Different effects of three interferons L on Toll-like receptor-related gene expression in HepG2 cells.	Cytokine	64(2)	577-83	2013
Jiang X, Kanda T, Tanaka T, Wu S, Nakamoto S, Imazeki F, <u>Yokosuka O</u> .	Lipopolysaccharide blocks induction of unfolded protein response in human hepatoma cell lines.	Immunol Lett	152(1)	8-15	2013
Wu S, Kanda T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Nakatani SM, Ono SK, Takahashi-Nakaguchi A, Gonoi T, <u>Yokosuka O</u> .	Prevalence of hepatitis C virus subgenotypes 1a and 1b in Japanese patients: ultra-deep sequencing analysis of HCV NS5B genotype-specific region.	PLoS One	8(9)	e73615	2013
*Miyachi T, Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Kato K, Arai M, Mikami S, Sugiura N, Kimura M, Goto N, Imazeki F, <u>Yokosuka O</u> .	Efficacy of lamivudine or entecavir against virological rebound after achieving HBV DNA negativity in chronic hepatitis B patients.	Int J Med Sci	10(6)	647-52	2013
*Kamezaki H, Kanda T, Arai M, Wu S, Nakamoto S, Chiba T, Maruyama H, Fujiwara K, Kanai F, Imazeki F, Nomura F, <u>Yokosuka O</u> .	Adherence to medication is a more important contributor to viral breakthrough in chronic hepatitis B patients treated with entecavir than in those with Lamivudine.	Int J Med Sci	10(5)	567-74	2013
Harigai M, <u>Mochida S</u> , Mimura T, <u>Koike T</u> , Miyasaka N.	The proposal for management of rheumatic disease patients with hepatitis B virus infection receiving immunosuppressive therapy.	Mod Rheumatol	24	1-7	2014
Ge X, Leung TM, Arriazu E, Lu Y, Urtasun R, Christensen B, Fiel MI, <u>Mochida S</u> , Sørensen ES, Nieto N.	Osteopontin binding to lipopolysaccharide lower tumor necrosis factor- α and prevents early alcohol-induced liver injury in mice.	Hepatology		doi: 10.1002/hep.26931..	2013 Nov 9 [Epub ahead of print].

*Uchida Y, Kouyama J, Naiki K, Sugawara K, Inao M, Nakayama N, <u>Mochida S.</u>	Novel hepatitis B virus strain developing due to recombination between genotypes H and B strains isolated from a Japanese patient	Hepatol Res		Doi: 10.1111/hepr.12238	2013 Sep 10.
Hamaoka K, Nagoshi S, Sugawara K, Naiki K, Uchida Y, Inao M, Nakayama N, Fujiwara K, <u>Mochida S.</u>	SNPs in the promoter region of osteopontin gene as a possible host factor for sex difference in hepatocellular carcinoma development in patients with HCV.	Hepatol Int	7	683-692	2013
*Oketani M, Ide A, Nakayama N, Takikawa Y, Naiki T, Yamagishi Y, Ichida T, <u>Mochida S,</u> Ohnishi S, Tsubouchi H	Etiology and prognosis of fulminant hepatitis and late-onset hepatic failure in Japan: Summary of the annual nationwide survey between 2004 and 2009.	Hepatol Res	43	97-105	2013
<u>Mochida S,</u> Takikawa Y, Nakatama N, Oektani M, Maiki T, Yamagishi Y, Fujiwara K, Ichida K, Tsubouchi H.	Classification of the etiologies of acute liver failure in Japan: A report by the Intractable Hepato-Biliary Diseases Study Group of Japan.	Hepatol Res	in press		2014
Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, <u>Koike K,</u> Karin M, Maeda S.	Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis.	Proc Natl Acad Sci U S A			[Epub ahead of print]
Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, <u>Koike K.</u>	The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects.	J Gastroenterol			[Epub ahead of print]
Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, <u>Koike K,</u> Yatomi Y, Ikeda H.	High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential.	Int J Cancer			[Epub ahead of print]

Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, Koike K.	Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression.	Biochem Biophys Res Commun				[Epub ahead of print]
Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Fushimi K, Koike K.	Acute liver disease in Japan: a nationwide analysis of the Japanese Diagnosis Procedure Combination database.	J Gastroenterol				[Epub ahead of print]
Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M , Miyakawa Y, Koike K.	High levels of HBV after the onset lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B.	Clin Infect Dis	57(7)	935-942	2013	
Mikoshiba N, Miyashita M, Sakai T, Tateishi R, Koike K.	Depressive symptoms after treatment in hepatocellular carcinoma survivors: prevalence, determinants, and impact on health-related quality of life.	Psychooncology				[Epub ahead of print]
Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Mikami S, Sato M, Uchino K, Arano T, Enooku K, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Matsuyama Y, Omata M, Ohtomo K, Koike K.	CT with hepatic arteriography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial.	Am J Gastroenterol	108	1305-1313	2013	
Inoue Y, Tomiya T, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ikeda H, Koike K.	Induction of p53-Dependent p21 Limits Proliferative Activity of Rat Hepatocytes in the Presence of Hepatocyte Growth Factor.	PLoS One	8(11)	e78346	2013	
*He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K , Karin M.	Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling.	Cell	155(2)	384-396	2013	
*Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Kondo Y, Akanuma M, Yoshida H, Koike K.	Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs.	Sci Rep	3	2739	2013	

Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K , Hirota K, Fukumoto M, Fujita J.	Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1.	Biochem Biophys Res Commun	432(1)	22-27	2013
Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, Akanuma M, Kang YJ, Yoshida H, Otsuka M, Koike K .	The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice.	Sci Rep	3	2553	2013
*Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K , Hayashi N, Kumada H.	Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B.	Hepatol Res	43(6)	596-604	2013
Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Otomo K, Omata M, Yoshida H, Koike K .	Frequency, risk factors and survival associated with an intrasubsegmental recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma.	PLoS One	8(4)	e59040	2013
Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, Koike K , Yatomi Y.	Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma.	Hepatology	57	417-418	2013
Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K .	MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression.	Hepatology	57	162-170	2013
*Fukuma M, Tanese K, Effendi K, Yamazaki K, Masugi Y, Suda M, Sakamoto M .	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells.	Exp Cell Res.	319	113-121	2013
Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Masugi Y, Makino S, Sakamoto M .	Involvement of hepatocellular carcinoma biomarker, cyclase-associated protein 2 in zebrafish body development and cancer progression.	Exp Cell Res.	319	35-44	2013