

- 5) 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, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. *Int J Cancer* 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24174293.
- 6) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. The impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus Infection. *Hepatol Res* 2013 Oct 11. doi: 10.1111/hepr.12258. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24125181.
- 7) Uchino R, Isayama H, Tsujino T, Sasahira N, Ito Y, Matsubara S, Takahara N, Arizumi T, Toda N, Mohri D, Togawa O, Yagioka H, Yanagihara Y, Nakajima K, Akiyama D, Hamada T, Miyabayashi K, Mizuno S, Kawakubo K, Kogure H, Sasaki T, Yamamoto N, Nakai Y, Hirano K, Tada M, Koike K. Results of the Tokyo Trial of Prevention of Post-ERCP Pancreatitis with Risperidone-2: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Gastrointest Endosc* 2013 Jul 30. doi:pil: S0016-5107(13)02093-2. 10.1016/j.gie.2013.06.028. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23910063.
- 8) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H. Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis C using multiple fibrosis markers. *Hepatol Res* 2013 Aug 14. doi: 10.1111/hepr.12221. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23941604.
- 9) 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* 2013 Jul 23. doi:pil: S0006-291X(13)01224-2. 10.1016/j.bbrc.2013.07.064. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23891753.
- 10) Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K. Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2013 Jul 11. doi:10.1111/hepr.12203. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23841664.
- 11) 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* 2013 Jun 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23783841.

- 12) 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* 2013 May 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23704123.
- 13) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2013 May 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23689989.
- 14) 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* 2013 May 19. doi:10.1002/pon.3300. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23686523.
- 15) 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* 2013 Apr 30. doi: 10.1038/ajg.2013.109. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23629602.
- 16) 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* 2013;8(11):e78346. PubMed PMID: 24223793
- 17) 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. *Hepatol Res* 2013;43(10):1005-1012. PubMed PMID: 23356977.
- 18) 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 livercancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell* 2013;155(2):384-396. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.031. PubMed PMID: 24120137.
- 19) 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* 2013 Sep 24;3:2739. doi:10.1038/srep02739. PubMed PMID: 24061441.
- 20) Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;432(1):22-27. PMID: 23376718.
- 21) Koike K. The oncogenic role of hepatitis C virus. *Recent Results Cancer Res* 2014;193:97-111. PMID: 24008295.
- 22) Uchino K, Tateishi R, Nakagawa H, Shindoh J, Sugawara Y, Akahane M, Shibahara J, Yoshida H, Koike K. Uninodular combined hepatocellular and cholangiocarcinoma with multiple non-neoplastic hypervascular lesions appearing in the liver of a patient with HIV and HCV coinfection. *J Clin Virol* 2013;57(2):173-177. PMID: 23434197.
- 23) 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* 2013 Aug 30;3:2553. doi: 10.1038/srep02553. PubMed PMID: 23989853.
- 24) 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* 2013;43(6):596-604. PubMed PMID: 23131000.
- 25) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. *J Hepatol* 2013;58(5):875-882. PubMed PMID: 23321320.
- 26) Hikita H, Nakagawa H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Yoshida H, Omata M, Soroida Y, Sato M, Gotoh H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2013;48(3):366-373. PMID: 22790352
- 27) 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* 2013 Apr 12;8(4):e59040. doi: 10.1371/journal.pone.0059040. Print 2013. PubMed PMID: 23593129; PubMed Central PMCID: PMC3625228.
- 28) Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the mica promoter which regulates mica expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. *PLoS One* 2013 Apr 11;8(4):e61279. doi: 10.1371/journal.pone.0061279. Print 2013. PubMed PMID: 23593449; PubMed Central PMCID: PMC3623965.
- 29) Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013;48(2):254-268. PMID: 22790350.
- 30) Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, Koike K, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:417-418. PubMed PMID: 22707340.
- 31) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. *Hepatology* 2013;57:162-170. PMID: 22898998.
- 32) Nishimura T, Yamaguchi K, Fujii H, Okada Y, Yokomizo C, Niimi T, Sumida Y, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Umemura A, Shima T, Okanoue T, Itoh Y. Prediction of a favorable clinical course in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum alanine aminotransferase levels: A long-term follow-up study. *Hepato Res* 2013; 43: 557-562
- 33) Okada Y, Yamaguchi K, Nakajima T, Nishikawa T, Jo M, Mitsumoto Y, Kimura H, Nishimura T, Tochiki N, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y. Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Liv Int* 2013; 33: 301-311
- 34) Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H, Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T. Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2013;48: 515-525
- 35) Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, Saibara T, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anzai K, Fujimoto K, Okanoue T, Nakajima A. Japan Study Group

- interferon alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatol Res.* 2013 Apr 19. doi: 10.1111/hepr.12139.
- 45) Ono M, Ogasawara M, Hirose A, Mogami S, Ootake N, Aritake K, Higuchi T, Okamoto N, Sakamoto S, Yamamoto M, Urade Y, Saibara T, Oben JA. Bofutsushosan, a Japanese herbal (Kampo) medicine, attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *J Gastroenterol* doi 10.1007/s00535-013-0852-8
- 46) Hasegawa T, Yamao K, Hijioka S, Bhatia V, Mizuno N, Hara K, Imaoka H, Niwa Y, Tajika M, Kondo S, Tanaka T, Shimizu Y, Kinoshita T, Kohsaki T, Nishimori I, Iwasaki S, Saibara T, Hosoda W, Yatabe Y. Evaluation of Ki-67 index in EUS-FNA specimens for the assessment of malignancy risk in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endoscopy* 2014; 46: 32-38
- 47) Taketani H, Sumida Y, Tanaka S, Imajo K, Yoneda M, Hyogo H, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Kanemasa K, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Saibara T, Fujimoto K, Nakajima A; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2013 Aug 22.
- 48) Hashiba M, Ono M, Hyogo H, Ikeda Y, Masuda K, Yoshioka R, Ishikawa Y, Nagata Y, Munekage K, Ochi T, Hirose A, Nozaki-Fujimura Y, Noguchi S, Okamoto N, Chayama K, Suganuma N, Saibara T. Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease. *PLoS One.* 2013;8:e76161.
- 49) Toda K, Hayashi Y, Yamashita A, Okabe M, Ono M, Saibara T. Aromatase-null mice expressing enhanced green fluorescent protein in germ cells provide a model system to assess estrogen-dependent ovulatory responses. *Transgenic Res.* 2013 Nov 22.
- 50) Nakahara T, Hyogo H, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Imajo K, Aikata H, Tanaka S, Kanemasa K, Fujimoto K, Anzai K, Saibara T, Sata M, Nakajima A, Itoh Y, Chayama K, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Type 2 diabetes mellitus is associated with the fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease in a large retrospective cohort of Japanese patients. *J Gastroenterol.* 2013 Nov 26.
- 51) Hashimoto E, Taniai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28 Suppl 4:64-70
- 52) Tokushige K, Hashimoto E, Kodama K. Hepatocarcinogenesis in non-alcoholic fatty liver disease in Japan. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28 Suppl 4:88-92
- 53) Sato K, Tanaka S, Mitsunori Y, Mogushi K, Yasen M, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S. Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography for vascular imaging of

- hepatocellular carcinoma; clinical and biological significance. *Hepatology*, 2013;57(4):1436-1447
- 54) Muramatsu S, Tanaka S, Mogushi K, Adikrisna R, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Nakayama K, Tanaka H, Yamaoka S, Aii S. Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma enlightened in vivo significance of tumor-host interaction and clinical implication. *Hepatology*, 2013;58(1):218-228.
- 55) Furuta M, Kozaki KI, Tanimoto K, Tanaka S, Aii S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, Inazawa J. The Tumor-suppressive mir-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(3):e60155.
- 56) Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Tanabe M, Aii S. Age-related clinicopathological and molecular features of patients received curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *American Journal of Surgery*, in press
- 57) Kudo A, Tanaka S, Ban D, Matsumura S, Irie T, Ochiai T, Nakamura N, Aii S, Tanabe M. Alcohol consumption and recurrence of non-B or non-C hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a propensity score analysis. *Journal of Gastroenterology*, in press
- 58) Ogawa K, Tanaka S, Matsumura S, Murakata A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanabe M, Aii S. EpCAM-Targeted therapy for human hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, in press
- 59) Kudo A, Mogushi K, Takayama T, Matsumura S, Ban D, Irie T, Ochiai T, Tanaka H, Anzai N, Sakamoto M, Tanaka S, Aii S. Mitochondrial metabolism in the Noncancerous Liver Determine the Occurrence of Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study. *Journal of Gastroenterology*, in press
- 60) Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, *Ueki K*, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S, Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 2013;503:493-499
- 61) Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lyng J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, *Ueki K*, Ingwersen SH, Pedersen BK, Kadowaki T. Body Composition is Main Determinant for the Difference in Type 2 Diabetes Pathophysiology between Japanese and Caucasians. *Diabetes Care* 2013; Oct 15 (Epub ahead of print)
- 62) Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, *Ueki K*, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S and Kadowaki T. A small-molecule AdipoR

- agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503:493-499, 2013
- 63) Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lyng J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, Ueki K, Ingwersen SH, Pedersen BK and Kadowaki T. Body Composition is Main Determinant for the Difference in Type 2 Diabetes Pathophysiology between Japanese and Caucasians. *Diabetes Care* 2013
- 64) Nakaya K, Kubota N, Takamoto I, Kubota T, Katsuyama H, Sato H, Tokuyama K, Hashimoto S, Goto M, Jomori T, Ueki K, Kadowaki T. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet. *Metabolism* 2013;62:939-951
- 65) Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Med Virol* 2013;85:1028-1036.
- 66) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Prediction of treatment efficacy and telaprevir-resistant variants after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Clin Microbiol* 2013;51:2862-2868.
- 67) Seko Y, Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C Virus core region and lipid metabolism are associated with hepatocarcinogenesis in nonresponders to interferon plus ribavirin combination therapy. *Intervirology* 2013;56:13-21.
- 68) Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kawamura Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013;57:964-973.
- 69) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Utility of telaprevir-resistant variant detection for prediction of treatment efficacy in HCV genotype 1. *J Clin Microbiol* 2014;52:193-200.
- 70) Yamada S, Kawaguchi A, Kawaguchi T, Fukushima N, Kuromatsu R, Sumie S, Takata A, Nakano M, Satani M, Tonan T, Fujimoto K, Shima H, Kakuma T, Torimura T, Charlton MR, Sata M. Serum albumin level is a notable profiling factor for non-B, non-C hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma: A data-mining analysis. *Hepatology Res.* 2014; in press.
- 71) Kawaguchi T, Nagao Y, Sata M. Independent factors associated with altered plasma active ghrelin levels in HCV-infected

- patients. *Liver Int.* 2013;33:1510-6.
- 72) Taniguchi E, Kawaguchi T, Sakata M, Itou M, Oriishi T, Sata M. Lipid profile is associated with the incidence of cognitive dysfunction in viral cirrhotic patients: A data-mining analysis. *Hepatol Res.* 2013;43:418-24.
- 73) Sakata M, Kawahara A, Kawaguchi T, Akiba J, Taira T, Taniguchi E, Abe M, Koga H, Kage M, Sata M. Decreased expression of insulin and increased expression of pancreatic transcription factor PDX-1 in islets in patients with liver cirrhosis: a comparative investigation using human autopsy specimens. *J Gastroenterol.* 2013;48:277-85.
- 74) Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol* 2013;87:489-502
- 75) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog* 2013;(doi: 10.1371/journal.ppat.1003589)
- 76) Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, Akira S. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:12379-12384
- 77) 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, Takehara T. Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013;57:1705-1715
- 78) Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, Takeda K. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol* 2013;87:9997-10003
- 79) Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, Mizuguchi K. Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach. *J Proteome Res* 2013;12:2537-2551
- 80) Ratnoglik SL., Aoki C., Sudarmono P., Komoto M., Deng L., Shoji I., Fuchino H., Kawahara N., and Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, doi: 10.1111/1348-0421.12133.
- 81) Adianti M., Aoki C., Komoto M., Deng L., Shoji I., Wahyuni T., Lusida M., Soetjipto S., Fuchino H., Kawahara N., and Hotta H.

- Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiology and Immunology*, doi: 10.1111/1348-0421.12127.
- 82) Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I, Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling*, DOI: 10.1089/ars.2013.5381.
- 83) Mawatari S., Uto H., Ido A., Nakashima K., Suzuki T., Kanmura S., Kumagai K., Oda K., Tabu K., Tamai T., Moriuchi A., Oketani M., Shimada Y., Sudoh M., Shoji I., and Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4., *PLoS One*, 2013; 8 (12): e82094.
- 84) Wahyuni TS., Tumewu L., Permanasari AA., Apriani E., Adianti M., Rahman A., Widyawaruyanti A., Lusida MI., Fuad A., Soetjpto, Nasronudin, Fuchino H., Kawahara N., Shoji I., Deng L., Aoki C., and Hotta H. Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virology Journal*, 2013, 10 (1): 259, 1-9.
- 85) Ichimura, T., Taoka, M., Shoji I., Kato, H., Hatakeyama, S., Isobe, T., and Hachiya, N. 14-3-3 Proteins sequester a pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation., *Journal of Cell Science*, 2013, 126 (Pt9): 2014-26.
- 86) El-Shamy, A., Shindo, M., Shoji I., Deng, L., Okuno, T., and Hotta, H. Polymorphisms of the Core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 2013, 58 (2): 555-63.
- 87) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T,Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. *Hepato Res.* 2013 Nov 14. doi: 10.1111/hepr.12275. PMID:24224477
- 88) 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, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. *Int J Cancer.* 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547 PMID:24174293
- 89) 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 hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. *Clin Infect Dis.* 2013 Oct;57(7):935-42. PMID:23704123

90) 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, Hatzia Apostolou 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 2013;155(2): 384-96.

91) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. The Impact of Pnpla3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. Hepatol Res 2013. [Epub ahead of print]

I. 知的所有権の出願・取得状況
なし

J. その他
なし

分担研究報告書

C型肝炎の病態・進展に及ぼす PNPLA3 遺伝子多型

研究分担者 岡上 武 大阪府済生会吹田病院 院長
共同研究者 伊藤義人 京都府立医科大学 消化器内科 教授
川口喬久 京都大学ゲノム疫学解析センター 助教
松田文彦 京都大学ゲノム疫学解析センター 教授

研究要旨：C型肝炎ではインスリン抵抗性を呈し、組織学的には炎症と共に高率に脂肪肝が認められ、これらの病態は非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に類似している。我々は以前、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)を対象に網羅的遺伝子関連解析(GWAS)を行い、中性脂肪の代謝に関与し22番染色体近傍に存在する patatin-like phospholipase containing 3(PNPLA3)がNASHの発症・進展の感受性遺伝子であることを報告したが、今回C型肝炎の脂肪蓄積や線維化進展にPNPLA3が関与しているか否か検討した。対象は肝生検を施行したC型肝炎414例でTaqMan PCRでPNPLA3のrs738409のSNPを解析し、403例(97.3%)でSNPを解析しえた。解析対象はC型肝炎で、肝機能持続正常(PNALT) 36例、慢性肝炎 273例、肝硬変27例、肝癌67例である。脂肪蓄積の程度を1%以下、1~10%,11~33%,34%以上の4群に分け、線維化の程度はF0,F1,F2,F3, F4に分類した。PNPLA3のrs738409は、C型肝炎患者群において、線維化・脂肪蓄積に関連した。すなわち線形な解析では、線維化ステージで $p=0.02$ 、脂肪蓄積で $p=0.002$ であった。線維化ステージF0,F1,F2とF3,F4の比較では、リスクアレルGについて、調整後オッズ比 $=1.6$ 、 $p=0.05$ であった。脂肪蓄積0と1-3の比較では、リスクアレルGについて、調整後オッズ比 $=2.7$ 、 $p=0.0009$ であった。

A. 研究目的

C型肝炎例では高率にインスリン抵抗性を呈し、組織学的には炎症と共に高率に脂肪肝が認められ、インスリン抵抗性や脂肪蓄積は病期の進展や発癌に関与していることが明らかになっており、これらの病態は非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に類似している。我々は以前、網羅的遺伝子関連解析

(GWAS)の結果、中性脂肪の代謝に関与し22番染色体近傍に存在する patatin-like phospholipase containing 3(PNPLA3)がNASHの発症・進展の感受性遺伝子であることを報告したが、NASHと類似の病態を示すC型肝炎において、脂肪蓄積や線維化進展にPNPLA3が関与しているか否かを明らかにすることとした。

B. 研究方法

対象は済生会吹田病院と京都府立医科大学 消化器内科で肝生検を施行した C 型肝炎 414 例で、TaqMan PCR で PNPLA3 の rs738409 の SNP を解析し、403 例(97.3%) で rs738409 の遺伝子型(SNP)を解析しえた。解析対象の内訳は肝機能持続正常 HCVcarrier (PNALT) 36 例、慢性肝炎 273 例、肝硬変 27 例、肝癌 67 例である。肝細胞への脂肪蓄積の程度は 1%以下、1~10%,11~33%,34%以上の 4 群に分け、線維化の程度は F0(線維化なし),F1(線維化軽度), F2(線維化中等度),F3(小葉改築傾向あり), F4(肝硬変)に分類した。患者背景は表 1 に示す如くである。

(倫理面の配慮)

遺伝子解析を含む本臨床研究に関しては済生会吹田病院と京都府立医科大学の倫理委員会の承認を受けた。患者の同意を得たうえで、採血を行った。

C. 研究結果

済生会吹田病院と京都府立医科大学の症例の比較と各病型間における PNPLA3 の rs738409 の遺伝子型(CC, CG, GG)の分布に有意な差はなかった(表 2)。rs738409 の遺伝子型 CC, CG, GG の 3 群間で血液生化学所見、肝組織所見で有意差を検討したが、血液生化学所見には有意差は無く、脂肪肝の有無(1%未満 vs 1%以上)と肝線維化の程度(F0,F1,F2vsF3,F4)に有意な差を認めた(表 3)。慢性肝炎のみを対象として同様の検討を行ったが、結果は全症例を対象とした解析結果とほぼ同様であった(表 4)。すなわち、rs738409

がリスクアレル G を有する CG,GG の症例では脂肪蓄積が起きやすく、肝線維化も進展しやすいことを示す結果が得られた。

D. 考察

我々は以前肝生検で非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) と診断した 529 例を Matteoni 分類に従い組織分類し、GWAS を行い、PNPLA3 の rs738409 の遺伝多型が NASH 発症・進展の感受性遺伝子であることを報告したが(PLoS One 7(6): e38322, 2012)、今回 NASH と病態が類似する C 型肝炎でも類似する結果が得られた。すなわち C 型肝炎においては脂肪蓄積と線維化進展に PNPLA3 の遺伝子多型が関与していることが明らかになった。PNPLA3 は中性脂肪の代謝に関与しているがその役割は十分に明らかにされておらず、今後さらなる検討が必要であるが、今回の結果は C 型肝炎の予後、特に PNALT 症例の予後の検討に重要な意味を持つ可能性がある。

E. 結論

中性脂肪の代謝に関与する patatin-like phospholipase containing 3(PNPLA3)の SNP が C 型肝炎における脂肪蓄積と肝線維化の進展に関与している。

F. 健康危険情報

C 型肝炎で肝硬変・肝癌に進展する例は 30%前後と考えられており、今回の結果は C 型肝炎患者の予後推定に役立つ可能性がある。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Nishimura T, Yamaguchi K, Fujii H, Okada Y, Yokomizo C, Niimi T, Sumida Y, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Umemura A, Shima T, Okanoue T, Itoh Y. Prediction of a favorable clinical course in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum alanine aminotransferase levels: A long-term follow-up study. *Hepatol Res* 2013; 43: 557-562
- 2) Okada Y, Yamaguchi K, Nakajima T, Nishikawa T, Jo M, Mitsumoto Y, Kimura H, Nishimura T, Tochiki N, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y. Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *LivInt*2013; 33:301-311
- 3) Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H, Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T. Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2013;48: 515-525
- 4) Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, Saibara T, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anzai K, Fujimoto K, Okanoue T, Nakajima A. Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease(JSG-NAFLD). Noninvasive scoring systems in patients with nonalcoholic fatty liver disease with normal alanine aminotransferase. *J Gastroenterol*2013;48: 1051-1060
- 5) Mitsuyoshi H, Yasui K, Yamaguchi K, Minami M, Okanoue T, Itoh Y. Pathogenic role of iron deposition in reticuloendothelial cells during the development of chronic hepatitis C. *Int J Hepatol*2013;;3013;686420. doi: 10
- 6) Kondo Y, Hasegawa G, Okada H, Senmaru T, Fukui M, Nakamura N, Sawada M, Kitawaki J, Okanoue T, Kishimoto Y, Amano A, Maruyama N, Obayashi H, Ishigami A. Leprdb/db mice with senescence marker protein-30 knockout (Leprdb/dbSmp30Y/2) exhibit increases in small dense-LDL and severe fatty liver despite being fed a standard diet. *PLoS One* 2013;8(6):e65698
- 7) Sumida Y, Naito Y, Tanaka S, Inada Y, Taketani H, Kanemasa K, Yasui K, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Long-term (>2 yr) efficacy of vitamin E for non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology*2013; 60: 1445-1450
- 8) Nakahara T, Hyogo H, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Imajo K, Akita H, Tanaka S, Kanemasa K, Fijimoto K, Anzai K, sainbara T,

Nakajima A, Itoh Y, Chayama K, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease(JSG-NAFLD). Type 2 J Gastroenterol 2013 Nov 26 [Epub ahead print]

2.学会発表

- 1) Yamaguchi K, Nishimura T, Seko Y, Ishiba H, Okajima A, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Yasui K, Minami M, Okanoue T, Itoh Y. Mouse non-alcoholic steatohepatitis livers up-regulate expression of T-cell regulatory gene PD-1 and LAG3. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2013 Nov 2; Washington DC, USA
- 2) Tateishi R, Okanoue T, Fujiwara N,

OkitaK,Kiyosawa K, Omata M, Kumada H, Hayashi N, Koike K. Categorization of non-B non-C hepatocellular carcinoma patients using hierarchical clustering. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2013 Nov 2; Washington DC, USA

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
特記事項なし

表 1. 対象患者の背景

Trait	PNALT	chronic hepatitis	cirrhosis	HCC	P-value
n	36	273	27	67	
Source (Suit/Kyoto Pref Univ)	36/0	165/108	27/0	67/0	
age	54.8±15.6	57.9±12.3	69.2±10.7	73.5±7.4	2.4x10 ⁻²²
sex (M/F)	8/28	123/144	9/18	30/37	0.04
BMI	21.5±2.7	23.7±3.6	22.4±3.4	23.1±3.9	5.3x10 ⁻⁴
Drinking (<1/1-3/3-5/5合)	34/1/1/0	146/8/5/6	22/2/2/1	56/6/4/1	0.32
AST	24.9±9.3	60.9±43.9	69.3±51.3	62.6±39.0	2.0x10 ⁻¹³
ALT	24.0±10.8	73.5±58.7	53.2±45.8	48.0±27.4	5.6x10 ⁻¹³
γ-GTP	21.9±12.3	66.5±84.0	66.0±92.5	56.9±42.3	6.0x10 ⁻⁸
Total Cholesterol	189.1±12.1	176.7±33.4	140.5±34.3	157.0±32.6	2.6x10 ⁻¹⁰
FPG	21.5±2.7	23.7±3.6	22.4±3.4	23.1±3.9	5.3x10 ⁻⁴
TG	81.1±30.2	113.2±66.1	85.0±39.7	99.6±38.6	0.01
Albumin	4.2±0.8	4.0±0.5	3.3±0.6	3.3±0.5	5.2x10 ⁻²³
Platelet	20.0±6.4	16.6±6.1	8.1±3.2	11.1±4.9	4.1x10 ⁻²³
Ferritin	78.5±73.7	201.9±187.0	123.0±124.3	218.1±623.5	3.7x10 ⁻⁵
Fibrosis stage (0/1/2/3/4)	7/23/2/1/0	3/90/82/44/11	0/0/1/2/7	0/2/2/3/4	3.6x10 ⁻¹³
Adiposity (<1/≤10/≤33/>33%)	11/13/0/2	45/104/21/5	3/1/0/0	0/1/0/0	0.08
Hepatitis Activity (0/1/2/3)	6/23/3/1	1/100/100/26	0/1/4/4	0/0/6/1	1.6x10 ⁻⁸
Core 70aa (W,W<M,W=M,W<M,M)	14/0/0/1/3	22/5/1/6/17	2/3/1/0/2	3/0/0/2/3	0.12
HCV genotype(1a/1b/2a/2b)	0/20/6/7	2/126/36/19	0/11/2/1	0/21/3/3	0.76
HCV RNA	6.3±0.9	6.1±1.0	5.6±1.3	6.0±0.9	0.15

n=403

表 2. rs738409遺伝子型解析結果

済生会吹田病院と京都府立医大消化器内科の症例解析結果

施設名	CC	CG	GG	Total	Allele Frequency (C)
済生会吹田病院	87	142	66	295	0.53
京都府立医科大学	33	57	18	108	0.57

P=0.42

対象症例別遺伝子型の分布

病期分類	CC	CG	GG	Total	Allele Frequency (C)
PNALT	10	14	12	36	0.46
慢性肝炎	87	135	51	273	0.54
肝硬変	8	13	6	27	0.53
肝癌	15	37	15	67	0.50

P=0.32

表 3. rs738409の遺伝子型と病態との関連性

Trait	CC	CG	GG	P-value
n	120	199	84	
Source (Suita/Kyoto Pref Univ)	87/33	142/57	66/18	0.40
age	61.6±12.3	61.0±13.9	60.2±14.0	0.73
Sex (M/F)	50/67	81/116	39/44	0.60
BMI	23.0±3.5	23.7±3.8	22.7±3.3	0.91
Drinking (<1/1-3/3-5/5合)	75/8/3/1	125/7/5/5	58/2/4/2	0.90
AST	57.9±48.4	59.7±42.5	56.6±35.7	0.45
ALT	64.3±56.7	64.1±54.1	60.1±46.7	0.70
γ-GTP	62.7±85.7	59.4±67.9	62.3±81.2	0.56
Total Cholesterol	175.1±33.9	169.3±33.5	174.0±40.1	0.23
FPG	106.2±27.5	105.2±21.5	106.5±21.1	0.60
TG	100.4±47.2	102.4±54.9	121.0±76.2	0.22
Albumin	3.9±0.6	3.8±0.6	3.9±0.5	0.90
Platelet	15.7±7.1	15.5±6.5	14.8±6.1	0.45
Ferritin	194.0±205.7	201.5±346.8	144.3±151.0	0.18
Fibrosis stage (0/1/2/3/4)	3/43/27/11/5	4/56/45/25/9	3/16/15/14/8	0.01
Adiposity (<1/≤10/≤33/>33%)	29/26/8/1	23/67/7/3	7/26/6/3	0.006
Hepatitis Activity (0/1/2/3)	3/42/31/10	2/65/57/13	2/17/24/9	0.15
Core 70aa (W,W<M,W=M,W<M,M)	10/2/0/1/4	20/5/1/4/12	10/2/1/3/9	0.12
HCV genotype(1a/1b/2a/2b)	0/43/19/11	1/90/20/10	1/45/8/9	0.19
HCV RNA	5.9±1.1	6.1±0.93	6.1±1.1	0.10

n=403

表 4. rs738409の遺伝子型とC型慢性肝炎の背景因子病態との関連性

Trait	CC	CG	GG	P-value
n	78	129	47	
Source (Suita/Kyoto Pref Univ)	45/33	72/57	29/18	0.73
age	59.1±11.0	57.5±12.8	58.9±12.3	0.85
Sex (M/F)	33/42	54/73	25/21	0.34
BMI	23.4±3.4	23.9±3.7	23.3±3.0	0.93
Drinking (<1/1-3/3-5/5合)				
AST	60.0±45.2	58.8±37.7	56.0±34.6	0.86
ALT	73.8±60.6	58.9±37.7	67.8±52.0	0.95
γ-GTP	68.5±101.5	58.1±62.5	64.0±80.6	0.63
Total Cholesterol	179.6±29.5	174.8±32.1	175.7±41.0	0.27
FPG	105.0±28.4	101.6±15.8	109.7±25.2	0.44
TG	105.6±51.1	106.2±54.4	130.5±81.8	0.29
Albumin	4.1±0.6	4.0±0.5	4.0±0.3	0.99
Platelet	17.2±7.5	16.5±5.6	16.2±5.1	0.59
Ferritin	203.8±213.2	192.0±160.4	191.2±177.0	0.85
Fibrosis stage (0/1/2/3/4)	1/27/28/8/2	1/45/41/21/5	0/8/11/12/4	0.0009
Adiposity (<1/≤10/≤33/>33%)	18/23/8/1	22/56/7/2	2/20/6/1	0.05
Hepatitis Activity (0/1/2/3)	0/31/28/6	1/53/49/10	0/8/18/7	0.09
Core 70aa (W,W<M,W=M,W<M,M)	5/1/0/1/2	10/4/0/2/10	4/1/1/2/5	0.31
HCV genotype(1a/1b/2a/2b)	0/28/13/9	1/61/13/6	1/28/4/3	0.14
HCV RNA	6.1±1.0	6.1±0.93	6.2±1.3	0.24

n=254

分担研究報告書

肝発癌における PPAR- α の役割に関する研究

研究分担者 西原 利治 高知大学 教授

研究要旨：

MC4R 遺伝子に異常を有する症例は幼児期より食欲の抑制が困難なために高度肥満を呈し、10代でNASHを発症し、30代で肝硬変、ないし肝細胞癌を発症する。MC4R KO マウスも同様に高度肥満からNASHを発症し、全例で肝細胞癌を合併するので、NASHにおける自然発癌の解析には最も適したモデル動物である。他方、実験肝発癌で最も有名なものは PPAR- α の ligand の投与によるもので、肝発癌の promotion の過程に作用すると考えられている。そこで、今回、MC4R KO マウスの PPAR- α を KO した double knockout マウスを作成し、肝発癌の抑制が可能か検討した結果、MC4R KO マウスでは 100% の肝発癌が観察されたのに対して、MC4R と PPAR- α の double knockout マウスでは肝発癌は認められなかった。このことから、NASH における肝発癌には PPAR- α の活性化が必須の過程であることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年の肥満人口の増加を背景に脂肪肝の有病率は3割を超えている。このような脂肪肝は脂質異常症や高血圧の誘因であるばかりでなく、糖尿病や非アルコール性脂肪肝肝炎(NASH)の誘因としても知られている。これは、脂肪肝では肝細胞に過剰な中性脂肪が貯まるため、インスリンに対する感受性が低下し、高インスリン血症を伴い易いからである。高インスリン血症は肝細胞における脂肪酸の合成を促進し、腎ではNaの再吸収を促進し、上記の合併症の基盤となる代謝異常を惹起する。さらに、蓄積した脂肪酸は転写因子である PPAR- α の内因性 ligand であることから、PPAR- α の慢性

的活性化をもたらし、肝細胞は常時高濃度のフリーラジカルに曝されることになる。実際、PPAR- α の ligand を長期間投与すると、マウスのみならずヒトでも肝細胞の癌化が促進(promotion)されることが知られている。

そこで、今回、我々は PPAR- α の慢性的活性化が脂肪肝に伴う肝障害、ことに NASH の発症に重要な働きをし、肝線維化の進行、さらには肝発癌の促進に繋がるのではないかと想定し、ヒト遺伝性 NASH のモデル動物(4型メラノコルチン受容体遺伝子 KO マウス: MC4RK0) と MC4R/PPAR- α double KO マウスを用いて、我々の仮説を検証したので報告する。

B. 研究方法

雄性 MC4RKO と MC4R/PPAR- α double KO マウス各群 10 匹を高脂肪食で 12 ヶ月間飼育し、肝臓への炎症性細胞浸潤や線維化、肝発癌の有無を比較検討した。

(倫理面の配慮)

本検討は高知大学医学部倫理委員会の指導と承認のもとに、実験動物の苦痛が最少となるように配慮して行われた。

C. 研究結果

MC4R はレプチンの下流にあってインスリンの分泌抑制に加えて、食欲抑制を担う。従って、MC4RKO と MC4R/PPAR- α double KO マウスは高インスリン血症とともに過食を生じ、高度肥満を呈する。

MC4RKO マウスでは脂肪肝の進展と共に、炎症性細胞浸潤に加えて肝線維化が生じ、やがて全例で肝細胞癌の合併が観察された。他方、MC4R/PPAR- α double KO マウスでは MC4RKO マウスと同様に高度の脂肪肝を生じるものの、炎症性細胞浸潤や肝線維化は観察されず、肝発癌を生じることもなかった。

D. 考察

MC4R 遺伝子に異常を有する症例は幼児期より高度肥満を呈する。日本人では劣性遺伝形式を取ることが知られている。他方、フランス人では優性遺伝形式を示し、高度肥満者の 1% に MC4R 遺伝子異常を認める。MC4R 遺伝子変異を持つこれらの症例は遺伝性 NASH を発症し、しばしば肝硬変で死亡することが知られている。従って、この

遺伝性疾患を研究すれば非遺伝性 NASH で観察される代謝異常に近い病態を知ることができるのではないかと考えられる。

MC4RKO マウスでも高度肥満に伴う脂肪肝を背景に典型的な NASH の発症が観察されたことから予想に違わずヒト NASH の病態を反映する優れた NASH モデルと考えられた。

MC4RKO マウスでは炎症細胞浸潤と著明な肝線維化の進展、肝細胞癌の合併が全例で観察され、MC4R/PPAR- α double KO マウスでは炎症細胞浸潤は軽微で、肝線維化や肝細胞癌の合併を認めなかったとの成績がヒトに外挿可能であれば、NASH 治療に新たな breakthrough をもたらす可能性がある。

E. 結論

MC4RKO マウスはヒト遺伝性 NASH の病態を忠実に再現できるモデル動物である。MC4R/PPAR- α double KO マウスでは NASH に特徴的な病理学的所見は認められなかったことから、PPAR- α agonist による NASH の治療という新たなストラテジーに期待を抱かせるに十分な成績と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Osawa Y, Suetsugu A, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Seishima M, Kozawa O. Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of

- metastatic colon cancer. *J Clin Invest* 2013; 123: 834-843
- 2) Ue M, Ikebe N, Munekage K, Ochi T, Ono M, Saibara T. Hepatocyte destruction with enhanced collagen synthesis in the liver of chronic hepatitis C patients on hemodialysis. *J Viral Hepat* 2013; 20:350-357.
- 3) Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Kozawa O. Tumor necrosis factor- α promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells. *PLoS ONE* 2013;8: e65251.
- 4) Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, Saibara T, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anzai K, Fujimoto K, Okanoue T, Nakajima A; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Noninvasive scoring systems in patients with nonalcoholic fatty liver disease with normal alanine aminotransferase levels. *J Gastroenterol* 2013;48:1051-60.
- 5) Saibara T, Enomoto N, Kaneko S, Chayama K, Sata M, Imawari M, Onishi S, Okita K. Clinical efficacy of combination therapy with ME3738 and pegylated interferon alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatol Res.* 2013 Apr 19. doi: 10.1111/hepr.12139.
- 6) Ono M, Ogasawara M, Hirose A, Mogami S, Ootake N, Aritake K, Higuchi T, Okamoto N, Sakamoto S, Yamamoto M, Urade Y, Saibara T, Oben JA. Bofutsushosan, a Japanese herbal (Kampo) medicine, attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *J Gastroenterol* doi 10.1007/s00535-013-0852-8
- 7) Hasegawa T, Yamao K, Hijioka S, Bhatia V, Mizuno N, Hara K, Imaoka H, Niwa Y, Tajika M, Kondo S, Tanaka T, Shimizu Y, Kinoshita T, Kohsaki T, Nishimori I, Iwasaki S, Saibara T, Hosoda W, Yatabe Y. Evaluation of Ki-67 index in EUS-FNA specimens for the assessment of malignancy risk in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endoscopy* 2014; 46: 32-38
- 8) Taketani H, Sumida Y, Tanaka S, Imajo K, Yoneda M, Hyogo H, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Kanemasa K, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Saibara T, Fujimoto K, Nakajima A; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2013 Aug 22.
- 9) Hashiba M, Ono M, Hyogo H, Ikeda Y, Masuda K, Yoshioka R, Ishikawa Y, Nagata Y, Munekage K, Ochi T, Hirose A, Nozaki-Fujimura Y, Noguchi S, Okamoto N, Chayama K, Suganuma N, Saibara T. Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease. *PLoS One.* 2013;8:e76161.
- 10) Toda K, Hayashi Y, Yamashita A, Okabe M, Ono M, Saibara T. Aromatase-null mice expressing enhanced green fluorescent

- protein in germ cells provide a model system to assess estrogen-dependent ovulatory responses. Transgenic Res. 2013 Nov 22.
- 11) Nakahara T, Hyogo H, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Imajo K, Aikata H, Tanaka S, Kanemasa K, Fujimoto K, Anzai K, Saibara T, Sata M, Nakajima A, Itoh Y, Chayama K, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Type 2 diabetes mellitus is associated with the fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease in a large retrospective cohort of Japanese patients. J Gastroenterol. 2013 Nov 26.
- 12) 越智経浩、宗景玄祐、小野正文、西原利治：非アルコール性脂肪肝(NASH)の診療 臨床と研究 90:183-187, 2013
- 13) 西原利治 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NASH/NAFLD) 日本臨床内科医会会誌 28:11-17, 2013
- 14) 西原利治、羽柴基、小野正文：特集 糖尿病と脂質代謝異常の病態リンク 糖尿病と脂肪肝. Diabetes Frontier 24: 408-411, 2013
- 15) 徳光敬太、小野正文、西原利治 NAFLD/NASH の疫学 28:403-407, 2013
- 16) 宮本敬子、小野正文、西原利治：非アルコール性脂肪性肝疾患の疾患関連遺伝子 日本消化器病学会雑誌 110:1597-1601, 2013
- 17) 西原利治：肥満症と脂肪肝、NASH 内分泌代謝学 中尾一和編 449-450 頁、診断と治療社、東京、2013
- 18) 腰山裕一、湯川晋弘、西原利治：メタボ肝臓の高危険群① メタボ肝臓 小俣政男編 97-101 頁、アークメディア、東京、2013
2. 学会発表
- 1) 小野正文、羽柴基、西原利治：NASH 肝線維化に影響を及ぼす耐糖能異常の病態解析、第 99 回日本消化器病学会総会 シンポジウム 3 「NAFLD/NASH の病態解明と治療への展開」 東京 2013
- 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