

めなかった (表 1)。

図2

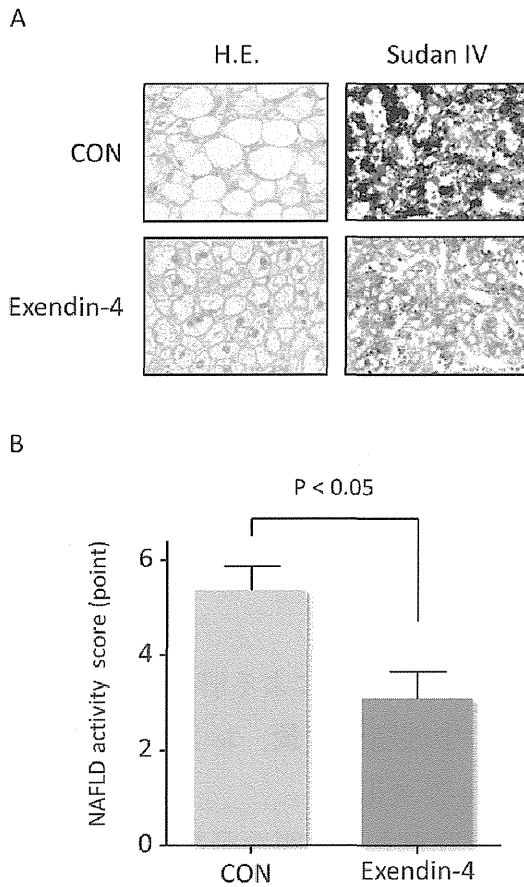
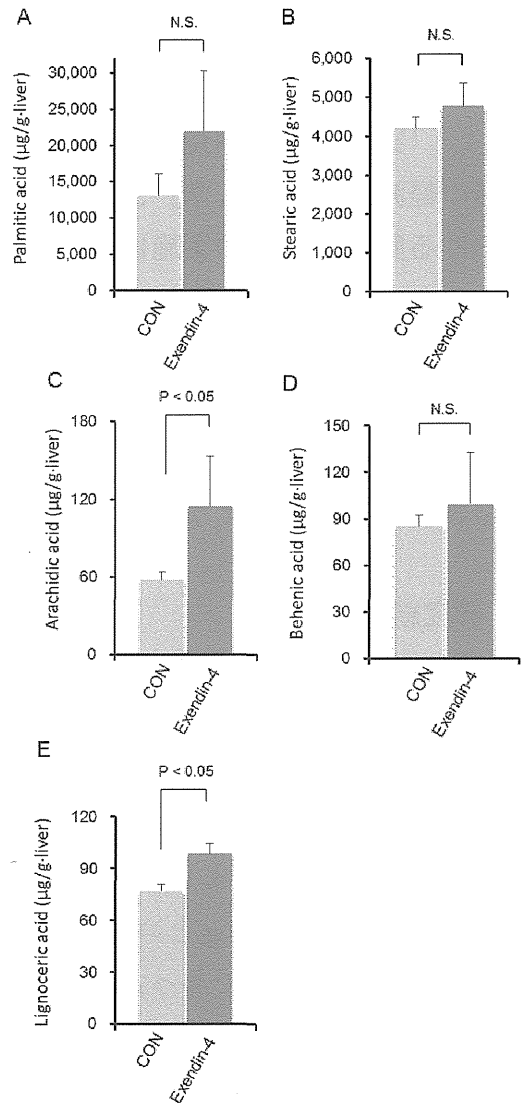


表1. Exendin-4が肝内飽和脂肪酸におよぼす影響

	Control ( $\mu\text{g/g liver}$ )	Exendin-4 ( $\mu\text{g/g liver}$ )	P
飽和脂肪酸	17838 $\pm$ 3248	27541 $\pm$ 9273	N.S.
アテローム性飽和脂肪酸	13414 $\pm$ 2981	22457 $\pm$ 8670	N.S.
血栓形成性飽和脂肪酸	17605 $\pm$ 3244	27210 $\pm$ 9260	N.S.
中鎖飽和脂肪酸	15233 $\pm$ 3554	25186 $\pm$ 9799	N.S.
長鎖飽和脂肪酸	23240 $\pm$ 955	31710 $\pm$ 8436	<.05

肝組織中の長鎖飽和脂肪酸の分画を検討したところ、パルミチン酸値、ステアリン酸値、ベヘン酸値、およびリグノセリン酸値は両群間において有意差を認めなかったが、Exendin-4 群におけるアラキジン酸値とリグノセリン酸値はコントロール群と比較して、有意に高値であった (図 3A-E)。

図3



④ Exendin-4 が肝組織中不飽和脂肪酸におよぼす影響

Exendin-4 群における肝組織中の一価不飽和脂肪酸値はコントロール群と比較し

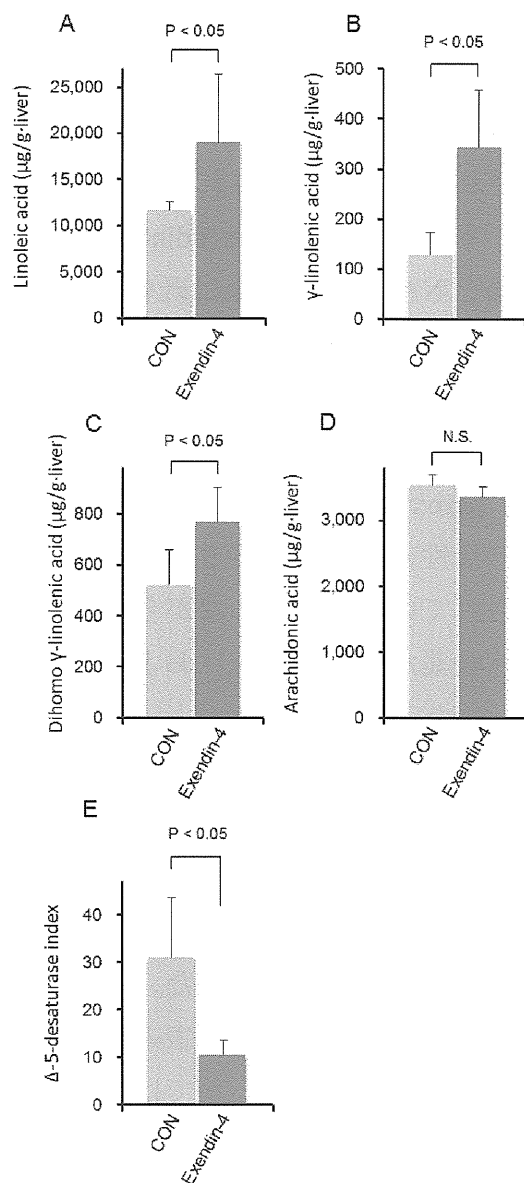
て有意な変化は認めなかった（表2）。一方、Exendin-4 群の肝組織中多価不飽和脂肪酸値はコントロール群と比較して有意に高値であった（表2）。また、Exendin-4 群の肝組織中 n-6 系多価不飽和脂肪酸値および n-3/n-6 系多価不飽和脂肪酸比もコントロール群と比較して有意に高値であった（表2）。

表2. Exendin-4が肝内不飽和脂肪酸におよぼす影響

	Control ( $\mu\text{g/g}\cdot\text{liver}$ )	Exendin-4 ( $\mu\text{g/g}\cdot\text{liver}$ )	P
一価不飽和脂肪酸	20355 $\pm$ 6701	34965 $\pm$ 14485	N.S.
多価不飽和脂肪酸	18410 $\pm$ 791	25986 $\pm$ 8050	< .05
n-3系多価不飽和脂肪酸	2218.5 $\pm$ 415.8	1992.4 $\pm$ 288.7	N.S.
n-6系多価不飽和脂肪酸	16166 $\pm$ 943	23937 $\pm$ 7845	< .05
n-3/n-6 多価不飽和脂肪酸	13.83 $\pm$ 3.15	8.73 $\pm$ 1.95	< .05

肝組織中 n-6 系多価不飽和脂肪酸の分画を検討したところ、アラキドン酸値は両群間において有意差を認めなかったが、Exendin-4 群におけるリノール酸値、 $\gamma$  リノレン酸値、およびジホモ- $\gamma$ -リノレン酸値は、コントロール群と比較して有意に高値であった（図4A-D）。一方、Exendin-4 群における肝組織中の  $\Delta^5$  デサチュラーゼ index はコントロール群と比較して有意に低値であった（図4E）。

図4



#### D. 考察

本研究により、GLP-1 受容体刺激剤である exendin-4 は、NASH モデルマウスの肝障害を抑制することが明らかとなった。また、exendin-4 による脂肪酸代謝酵素の活性調節と脂肪酸組成の変化が NASH 改善の一機序である可能性が示唆された。

本研究において、exendin-4 は NASH モデルマウスの体重増加と NAFLD activity score の上昇を抑制した。これまでに、

GLP-1 受容体の発現は NASH モデルマウスや NASH 患者において抑制されていることが報告されている。また、GLP-1 受容体作動薬投与により、高脂肪食飼育ラットや ApoE ノックアウトマウスの肝障害が抑制されることも報告されている。このように、本研究における exendin-4 の体重減少効果と NASH 改善効果は既報の結果と類似していた。

GLP-1 受容体作動薬による NASH 改善効果の機序として、インスリン感受性の亢進、peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  の活性亢進、および  $\beta$  酸化の亢進が報告されている。しかしながら、GLP-1 受容体作動薬が脂肪酸組成におよぼす影響について未だ不明である。

長鎖飽和脂肪酸は炎症促進性の脂肪酸であり、NASH の発症に促進的に作用することが報告されている。しかしながら、本研究において Exendin-4 群の肝組織中長鎖飽和脂肪酸値は上昇していた。本研究における長鎖飽和脂肪酸と肝障害の関連が既報と一致しない理由は明らかではないが、長鎖飽和脂肪酸のなかでもアラキジン酸は apoB の分泌を促進して、リグノセリン酸はセラミド代謝を調節して肝細胞への脂肪蓄積を抑制することが報告されている。本研究において、長鎖飽和脂肪酸値の増加に寄与する脂肪酸分画はアラキジン酸とリグノセリン酸であることから、exendin-4 は長鎖飽和脂肪酸の組成を変化させることで、NASH に対する抑制作用を発揮している可能性が示唆された。

Exendin-4 群では、肝内の n-6 系多価不

飽和脂肪酸、特にリノール酸値、 $\gamma$  リノレン酸値、およびジホモ- $\gamma$ -リノレン酸値が高値であった。これらの脂肪酸は炎症促進性エイコサノイドの前駆体であり、NASH の発症に関与することが報告されている。本研究における n-6 系多価不飽和脂肪酸の変化は既報と一致しないが、脂肪酸代謝経路の律速酵素である  $\Delta^5$  デサチュラーゼの変化がその一因と考えられる。 $\Delta^5$  デサチュラーゼはジホモ- $\gamma$ -リノレン酸より炎症促進性エイコサノイドの産生を促進する酵素で、NASH 患者においてその活性は亢進していることが報告されている。また、 $\Delta^5$  デサチュラーゼ活性阻害剤 (CP-24879) により、炎症が抑制され、肝細胞内脂肪含量が低下することが報告されている。本研究結果と、これら既報の研究結果は、exendin-4 が肝組織中  $\Delta^5$  デサチュラーゼの活性を阻害し、炎症促進性エイコサノイドの産生を抑制することで NASH を軽減している可能性が示唆される。

## E. 結論

本研究により、GLP-1 受容体刺激剤である exendin-4 は、NASH モデルマウスの肝障害を抑制することが明らかとなった。また、exendin-4 による脂肪酸代謝酵素の活性調節と脂肪酸組成の変化が NASH 改善の一機序と考えられた。これらの研究結果より、GLP-1/GLP-1 受容体の制御は NASH の治療ストラテジーとなる可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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. *Hepatol Res.* 2014; in press.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

### 2. 学会発表

- 1) 谷口英太郎、川口巧、佐田通夫. 肝硬変患者における潜在性肝性脳症関連因子の

包括的検討：データマイニング解析、第40回日本肝臓学会西部会、岐阜、2013.

- 2) 川口巧、長尾由実子、佐田通夫. C型慢性肝疾患患者における活性化グレリンの変化および代謝異常との関連、第50回日本臨床分子医学会学術集会、東京、2013.
- 3) 大津山樹理、伊藤実、末継拓郎、今永美波、石井久美子、緒方奨、谷口英太郎、川口巧、居石哲治、大塚百香、後藤恵美子、佐田通夫、三浦比呂子. 持続血糖モニタリングシステムと遊離脂肪酸によるC型肝硬変患者の就寝中栄養評価の有用性、第28回日本静脈経腸栄養学会学術集会、金沢、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

分担研究報告書

アポリポ蛋白質の両親媒性 $\alpha$ ヘリックスは  
HCVの感染性粒子産生に關与する

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：これまでに、アポリポ蛋白質 A (ApoB)や ApoE 等の VLDL 産生に關与する肝臓特異的因子が HCV の粒子産生に重要であることが示唆されてきた。粒子産生におけるアポリポ蛋白質の役割を明らかにするために、ApoB と ApoE 遺伝子を欠損させたダブルノックアウト Huh7 細胞を作製したところ、HCV の感染性粒子産生が顕著に抑制された。肝組織と Huh7 細胞でアポリポ蛋白質の発現を比較すると、Huh7 細胞では ApoB と ApoE 以外のアポリポ蛋白質の発現が肝組織よりも低いことが明らかになった。さらに、ダブルノックアウト細胞に ApoA や ApoC を発現させると HCV 粒子の産生を回復できることから、ApoA や ApoC も粒子産生に關与することが示唆された。アポリポ蛋白質の 2 次構造解析から、HCV の粒子産生を可能にするアポリポ蛋白質には共通して、両親媒性の  $\alpha$ ヘリックスが繰り返し存在しており、これだけを発現させても HCV 粒子の産生が回復することから、アポリポ蛋白質の両親媒性の  $\alpha$ ヘリックスが HCV の粒子産生に關与することが示された。

A. 研究目的

HCV に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には 2 百万人もの HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。HCV の感染環は様々な研究ツールの開発とともに徐々に解明されつつあるが、粒子産生機構については未だ不明な点が多い。過去の報告で VLDL 産生に關わる ApoB や ApoE が HCV の粒子産生に重要な役割を果たしていることが示唆されており、かつ非肝臓系の細胞株では、これらの因子がほとんど発現していないことから、VLDL 産生系が HCV の粒子産生に關与しているにおいて感染指向性を規定していることが予想された。本研究は HCV 粒子の産生におけるアポリポ蛋白質の意義を検討し、新しい C 型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とした。

B. 研究方法

人工ヌクレアーゼをコードする mRNA を導入した細胞をクローニングし、ApoB あるいは ApoE のノックアウト Huh7 細胞株を樹立

した。また、ApoB と ApoE のダブルノックアウト (DKO) 細胞株も樹立した。それらの細胞に対する HCV の感染性を qRT-PCR および Focus forming assay によって検討した。レンチウイルスベクターによって、種々のアポリポ蛋白質を発現させ、HCV の粒子産生に及ぼす影響を検討した。アポリポ蛋白質の 2 次構造は CLC Genomics Workbench により予測した。ApoC1 あるいは ApoE の欠損変異体を発現する DKO 細胞株を作製し、HCV の感染性粒子産生における両親媒性の  $\alpha$ ヘリックスの意義を検討した。HCV 粒子を超速心法で精製し、アポリポ蛋白質とウイルス粒子の結合を検討した。

(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「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報情報を厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

これまでの本研究班の研究で、HCV の完全な増殖を許容する新規細胞株、JHH4 と FU97 細胞を同定した。また、ApoE の欠損細胞を樹立することによって、HCV の粒子産生には、ApoE の機能を ApoB が代償することが明らかとなった。

ApoE と ApoB 遺伝子の両方を欠損させた DKO 細胞株では粒子産生能が顕著に抑制されていたことから、ApoB と ApoE が相補的に HCV の粒子産生に関与していることが示唆された。一方、cDNA マイクロアレイによる解析で、ヒト肝組織では全ての肝臓特異的なアポリポ蛋白質が高く発現しているのに対し、Huh7 細胞では ApoB と ApoE の発現は高いものの、ApoA や ApoC の発現が低かった。そこで、DKO 細胞に、ApoA1、ApoA2、ApoC1、ApoC2、ApoC3、ApoE および ApoH を発現させ、粒子産生能を検討した。興味深いことに、ApoE だけでなく、ApoA1、ApoA2、ApoC1、ApoC2、および ApoC3 の発現によっても感染性粒子の産生が認められた。次に、DKO 細胞に発現することで、HCV の感染性粒子産生を回復できるアポリポ蛋白質の共通性を 2 次構造で予測したところ、これらのアポリポ蛋白質には共通して両親媒性  $\alpha$  ヘリックスを複数有することが明らかになった。さらに、ApoC1 と ApoE から、単一の  $\alpha$  ヘリックスだけを DKO 細胞に発現させるだけで、HCV の粒子産生が回復することから、アポリポ蛋白質の両親媒性の  $\alpha$  ヘリックスが HCV の感染性粒子産生に関与していることが示唆された。さらに、HCV 粒子を超遠心で濃縮すると、アポリポ蛋白質も濃縮されることから、HCV 粒子にアポリポ蛋白質が結合していることが示唆された。

### D. 考察

アポリポ蛋白質の両親媒性  $\alpha$  ヘリックスが HCV の感染性粒子産生に関与していることが明らかとなった。両親媒性の  $\alpha$  ヘリックスとウイルス粒子の結合を特異的に阻害するような薬剤やペプチドは新規抗 HCV 剤の創薬標的と考えられる。

### E. 結論

HCV の感染粒子産生にはアポリポ蛋白質の両親媒性  $\alpha$  ヘリックスが重要な役割を演じている。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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)
- 3) 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
- 4) 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- $\lambda$  in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013;57:1705-1715
- 5) 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

- 6) 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

## 2. 学会発表

- 1) 岡本 徹、岡本貴世子、森 嘉生、福原 崇介、森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内配列切断の生物学的意義、シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、第 86 回日本生化学会、横浜、2013
- 2) Okamoto T, Taguwa S, Moriishi K, Matsuura Y. Co-chaperones involved in the replication of hepatitis C virus. *Protein Homeostasis & Viral Infection: Mechanisms to Therapeutics*. Bethesda, 2013
- 3) Matsuura Y. Host factors involved in HCV propagation. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma : molecular basis and clinical links”. Marsala, 2013
- 4) Matsuura Y. Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. *Infectious Diseases in Elderly Symposium*. Izmir, 2013
- 5) Matsuura Y. Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. Tainan, 2013
- 6) 松浦善治、C型肝炎ウイルスの複製と病原性発現に関与する宿主因子の解析と創薬の可能性、第 42 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー、東京、2013
- 7) Fukuhara F, Yamamoto S, Motomura T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Okamoto T, Matsuura Y. Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. *The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University Park, 2013*

- 8) Okamoto T, Sugiyama Y, Ono C, Aizawa S, Ngoc PD, Kohwaki T, Hirooka E, Fukuhara T, Yamamoto M, Matsuura Y. Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV. *20th International Meeting on HCV and Related Viruses*. Melbourne, 2013
- 9) Fukuhara T, Yamamoto S, Shiokawa M, Wada M, Ono C, Okamoto T, Matsuura Y. Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. *20th International Meeting on HCV and Related Viruses*. Melbourne, 2013
- 10) Ono C, Fukuhara T, Shiokawa M, Yamamoto S, Wada M, Okamoto T, Okuzaki D, Matsuura Y. Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells. *20th International Meeting on HCV and Related Viruses*. Melbourne, 2013
- 11) 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV 感染により誘導されるオートファジーの性状、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
- 12) 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
- 13) 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川舞、小野慎子、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、2013

## H. 知的所有権の出願・登録状況 特になし。

分担研究報告書

HCV 感染培養系による C 型肝炎関連肝がんと代謝因子に関する研究

研究分担者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染培養系を用い、肝細胞内の脂肪滴の大きさを調節する宿主因子の発現変化を解析した。HCV J6/JFH1をHuh-7.5細胞に感染させるとJNKが活性化され、細胞内のユビキチンリガーゼItchがリン酸化を受け活性化された。Itchの活性化に伴いAdipophilinの蛋白質量が減少したが、TIP47の量は変化しなかった。また、脂肪滴に結合し、Itchなどのユビキチンリガーゼを脂肪滴に引き寄せる足場蛋白のSpartinの量が2本のバンドに分かれ、経時的に見ると全長が減り、低分子量のバンドが増加したため、蛋白質分解酵素により切断される可能性が考えられた。Itchの活性化、およびSpartinの切断と脂肪滴増大化への影響について、さらに解析を進めている。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は慢性肝炎、肝硬変を引き起こす。さらに代謝障害を引き起こし、肝がんの発症に深く関与する。また、肝細胞内の脂肪滴周囲の膜上でHCV複製がおこることが報告されている。しかし、HCV感染による脂肪滴形成機構は未だ不明な点が多く、その対策も確立していない。そこで、HCV感染培養系を用い、HCV感染に伴う脂肪滴増大化の分子機序を解析した。

B. 研究方法

1) HCV感染によるJNK経路とItch活性および脂肪滴結合蛋白の解析

HCV J6/JFH1をヒト肝癌細胞株Huh-7.5細胞に感染させ1-7日まで細胞を回収した。ウエスタンブロット法にてJNK, c-Jun, p-c-Jun (Ser63), Itch, p-Itch (pT222),

adipophilin, TIP47の各抗体で発現レベルを比較した。

2) HCV感染による脂肪滴形成の変化

HCV J6/JFH1をHuh-7.5細胞に感染させ、脂肪滴をBODIPYで染色した。陰性対照のmock細胞と脂肪滴形成の違いを解析した。

3) HCV感染によるSpartinのプロセッシング

HCV J6/JFH1をHuh-7.5細胞に感染させ、Spartinの泳動度の変化をウエスタンブロット法で解析した。

4) Spartin内のNS3/4Aプロテアーゼ切断モチーフの検索

Spartinのアミノ酸配列内にNS3/4Aプロテアーゼ切断モチーフが存在するか、既知のモチーフと比較検討を行った。

(倫理面の配慮)

取り扱うすべてのDNAおよび病原微生物に



関しては適切な封じ込めレベルの実験室で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析はおこなっておらず、倫理面に抵触する研究は行っていない。

### C. 研究結果

1. HCV J6/JFH1 感染に伴い JNK が活性化され、細胞内のユビキチンリガーゼ Itch が T222 でリン酸化され、活性化された。また、Itch の活性化に伴い Adipophilin の蛋白質量が減少したが、TIP47 の量は変化しなかった。

2. HCV 感染に伴い、BODPY で染色される脂肪滴の大きさが mock 細胞と比較して増大傾向にあった。

3. HCV J6/JFH1 を Huh-7.5 細胞に感染にさせ、経時的に観察したところ、Spartin の全長のバンドが減少し、2本のバンドに分かれ、低分子量のバンドの比が増加した。

4. Spartin 内に NS3/4A プロテアーゼの切断モチーフと類似のアミノ酸配列が存在した。

### D. 考察

1. HCV J6/JFH1 感染に伴い JNK が活性化され、細胞内のユビキチンリガーゼ Itch が活性化されており、Itch の基質の量に影響する可能性が考えられた。実際に Adipophilin の量が減少しており、Itch 活性化による影響が示唆された。

2. Spartin は脂肪滴にユビキチンリガーゼ (WPP1, WPP2, Itch など) を引き寄せ、Adipophilin をユビキチン依存性に分解して脂肪滴の大きさを制御することが知られており、Spartin の泳動度の変化が脂肪滴

形成に影響する可能性が考えられた。

3. Spartin のプロセシングに HCV NS3/4A プロテアーゼ, NS2 プロテアーゼ, または宿主由来のプロテアーゼが関与しているか今後明らかにする必要がある。

4. Spartin 内に NS3/4A プロテアーゼの切断モチーフに類似した配列が認められ、その部位に変異を導入して Spartin のプロセシングに影響があるか解析する必要がある。また、HCV 感染による脂肪滴形成機構への影響と生理学的意義を明らかにする必要がある。

### E. 結論

1. HCV J6/JFH1 感染に伴い JNK が活性化され、細胞内のユビキチンリガーゼ Itch が T222 でリン酸化を受け活性化された。それに伴い Adipophilin の量が減少した。

2. HCV J6/JFH1 感染に伴い Spartin の全長のバンドが減少し、2本のバンドに分かれ、経時的に低分子量のバンドの比が増加し、プロテアーゼによる切断が示唆され、脂肪滴の増大に関与する可能性が示された。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Ratnoglik SL., Aoki C., Sudarmono P., Komoto M., Deng L., Shoji I., Fuchino H., Kawahara N., and Hotta H. Antiviral activity of extracts from *Morindacitrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus.

- Microbiology and Immunology*,doi:  
10.1111/1348-0421.12133.
- 2) 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 *Glycyrrhizauralensis* and other *Glycyrrhiza* species.*Microbiology and Immunology*,doi: 10.1111/1348-0421.12127.
  - 3) 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.
  - 4) 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.
  - 5) Wahyuni TS., Tumewu L., Permanasari AA., Apriani E., Adianti M., Rahman A., Widyawaruyanti A., Lusida MI., Fuad A., Soetjipto, 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.
  - 6) 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.
  - 7) 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.
2. 学会発表
- 1) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I., Hotta H. HCV NS5A interacts with SMYD3 and upregulates SMYD3-mediated expression of AGR3 mRNA. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
  - 2) Deng L, Chen M, Shoji I., Hotta H. HCV upregulates Bim through ROS/JNK signaling pathway leading to Bax-mediated apoptosis. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
  - 3) Ratnoglik SL, Jiang DP, Aoki C, Sudarmono P, Deng L, Shoji I., Hotta H. Development of a prophylactic and therapeutic vaccine against Hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
  - 4) Matsui C, Shoji I., Minami N, Sianipar I R, Deng L, Hotta H. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  by hepatitis C virus NS5A protein. 20th International Symposium on

- Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 5) Hotta H, Aoki C, Ratnoglik SL, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N. Antiviral activity of chlorophyll derivatives, pheophorbide a, chlorin e6 and mono-L-aspartylchlorin e6 (NPe6), against hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 6) Shoji I. Molecular Mechanisms of HCV-induced glucose metabolism disorder. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop. Trapani, Italy, October 20-21, 2013.
- 7) 勝二郁夫, DENG Lin, 松井千絵子, 堀田博. HCV 感染による糖代謝障害の分子機序. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. シンポジウム, 神戸, 2013 年 11 月.
- 8) DENG Lin, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Bax 活性化の分子機序の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 9) SuratnoLulutRatnoglik, 青木千恵, 河本真理, PratiwiSudarmono, Lin Deng, 勝二郁夫, 瀧野裕之, 川原信夫, 堀田博. Chlorophyll 分解産物 Pheophorbide a、Chlorin e6 及び半合成誘導体 Mono-L-aspartylchlorin e6 (NPe6) は C型肝炎ウイルス増殖を阻害する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.
- 10) 松井千絵子, 勝二郁夫, 南奈苗, SianiparImelda Rosalyn, DENG Lin, 堀田博. HCV NS5A と Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 $\alpha$  の相互作用と病態生理. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 11) 松岡陽子, 朝日朱美, DENG Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による Smad1/Smad5 経路の脱制御とその分子機序について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 12) 竹内健司, 孫 雪東, 千原一泰, DENG Lin, 勝二郁夫, 堀田博, 定清直. C型肝炎ウイルス非構造蛋白質 NS5A における Fyn-SH2 ドメインとの結合に重要なチロシン残基同定の試み. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 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

分担研究報告書

胆汁酸による代謝変化に関する研究

研究分担者 森屋 恭爾 東京大学医学部感染制御学 教授

研究要旨：C型肝炎 NASH(非アルコール性肝炎)において肝発癌と治療において脂質、糖質、アミノ酸、鉄代謝の重要性が認識されている。今回胆汁酸代謝に代表される腸肝代謝ネットワークおよび腸管分泌ホルモンインクレチンについてそれぞれのび発癌抑制作用についてデータを得ることを目的とし高脂肪食投与マウスに対する投与比較検討を行い、UDCAは肝腫瘍マーカーであるSCD mRNAの抑制ならびに膵臓においてGLP1-RmRNA発現増加をもたらす肝発癌抑制とともにインクレチン signal増強をもたらす可能性が示唆された。一方DPP4inhibitorはTGR5mRNA増加ならびに脂肪組織抗炎症作用と補完的作用をもたらす可能性が示された。

A. 研究目的

C型肝炎 NASH(非アルコール性肝炎)において肝発癌と治療において脂質、糖質、アミノ酸、鉄代謝正常化の重要性が認識されている。肝臓で精製される一次胆汁酸はCholesterol代謝経路の一部をなすとともに、腸肝代謝ネットワークを形成するとともに近年腸管内細菌により生成された二次胆汁酸による発癌促進も報告されている。インクレチンも腸管分泌ホルモンであるが膵臓を介しインスリンが肝臓代謝に直接作用する一方、胆汁酸がTGR5を介し直接インクレチン分泌を促進するという報告もなされている (Thomas. Cell Metab.

2009TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis) がその詳しい機序については不明である。今回UDCA (ウルソ) DPP-4inhibitorそれぞれの肝臓、膵臓、筋肉各臓器に対する代謝変化のデータを得ることによってウルソイン代表

される日本が古くから有する薬剤による新たな脂肪肝、糖尿病、肝発癌抑制標的の探索を目指す。

本年度は、腸管肝臓代謝ネットワークに着目し胆汁酸、およびGLP-1について検討を行った。

B. 研究方法

3ヶ月齢C57/b16 オスに対し通常食及び高カロリー食、また高カロリー食に (UDCA0.05%)、およびDPP-4阻害薬 (0.0015%) 配合食を3ヶ月間投与6ヶ月齢時にsacificeし体重、肝臓/体重比、血清脂質、AST/ALT 血糖 インスリン 肝臓膵臓脂肪細胞 膵臓についてmRNA発現変化を含め検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する倫理規定を順守し苦痛を与得ることの内容配慮した。

C. 研究結果

体重 肝臓内中性脂肪量 血中インスリン量は 高脂肪食群で薬剤投与の有無に関係なく増加を認めるとともに薬剤間の有意差認めなかった。

一方肝臓内総コレステロール量は高脂肪食で増加を認め、DPP4-inhibitorでは有意な変化認めなかったがUDCA投与群では低下を認めた。一方血糖値は高脂肪食投与で上昇傾向認めるが有意差認めず薬剤投与認めなかった。高脂肪食で発現増加したFAS SREBP1などの肝臓内脂質代謝関連酵素は2種類の薬剤投与によっても有意な低下は認めないが UDCAのみSCDmRNAを有意に低下させた。一方TGR5mRNAはDPP-4inhibitor群で増加を認めた。また膵臓においてGLP1-RmRNAがUDCAによって発現増加を認めた。脂肪組織においてはDPP-4inhibitorが高脂肪食で増加したTNFalpha mRNAを減少させた。

#### D. 考察

UDCAは肝腫瘍マーカーであるSCD mRNAの抑制ならびに膵臓においてGLP1-RmRNA発現増加をもたらす肝発癌抑制とともにインクレチン signal増強をもたらす可能性が示唆された。一方DPP4inhibitor はTGR5mRNA増加ならびに脂肪組織抗炎症作用と異なるなら部位で補完的作用をもたらす可能性が示された。

#### E. 結論

ウルソは TGR5 agonist としての糖質、脂質の代謝にも関与し 腸管循環のほかに膵臓に対しインクレチン作用を増強する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1) 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. **Hepatology Res.** 2013 Nov 14. doi: 10.1111/hepr.12275. PMID:24224477
- 2) 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
- 3) 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

##### 学会発表

- 1) Moriya K. BCAA, steatosis and hepatocarcinogenesis in HCV infection. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links. Trapani, 2013.

集団生活の場における肝炎ウイルス感染予防ガイドラインの作成(厚生労働省作成中)

G. 知的所有権の出願・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

分担研究報告書

我が国における非B非C肝癌の背景因子の検討

研究分担者 建石 良介 東京大学大学院医学系研究科 特任講師

研究要旨：急速に増加する非ウイルス性肝細胞癌の背景を探るために全国55の第3次医療機関において1991年～2010年までに診断された非B非C型肝細胞癌5633症例を収集した。そのうち、PBCや自己免疫性肝炎などの固有の慢性肝疾患を除き、データの欠損のない2166例を対象に16の臨床データを用いた階層別クラスタリングを行い、5つのカテゴリーに分別できた。近年の増加はカテゴリー1(高齢中等度飲酒男性)、5(非飲酒メタボリック男性)によるものであった。

A. 研究目的

近年増加傾向にある非B非C肝癌の背景には生活習慣病の影響が大きいと考えられているが、その詳細はこれまで明らかになっていない。また、飲酒や肥満を含む多数のリスク因子が関与する非B非C肝癌はウイルス性肝癌に比べて多様性が高いとも考えられる。本研究は、大規模コホートを用いて非B非C肝癌の背景因子からカテゴリー化を行うことを目的とした。

B. 研究方法

全国55の第3次医療機関において1991年～2010年までに診断された非B非C型肝細胞癌5633症例を収集した。そのうち、PBCや自己免疫性肝炎などの固有の慢性肝疾患を除き、データの欠損のない2166例を対象に16の臨床データを用いた階層別クラスタリングを行った。使用したデータは、以下のとおり：年齢、性別、飲酒量、糖尿病、高血圧、脂質代謝異常症、脂肪肝の有無、身長体重比(BMI)、アルブミン値、総ビリル

ビン値、AST、ALT、GGT、ALP、プロトロンビン活性、血小板数。それぞれのデータは、正規化した上で解析に用いた。

(倫理面の配慮)

本研究は、東京大学大学院医学系研究科倫理委員会で審査され、承認された(承認番号3710)。患者登録に際して氏名・生年月日等の個人情報登録されず、個々のデータは、本研究独自の登録番号を割り当てた上で管理された。

C. 研究結果

階層クラスタリングによって、対象者は、以下の5つの群に大別できた：C1 高齢男性、中等度飲酒、肝機能正常、C2 高齢男性、肥満、中等度飲酒、肝硬変、C3 比較的若年男性、大量飲酒、肝機能不良、C4 肥満男性、非飲酒、生活習慣病、C5 高齢女性、肥満、非飲酒、肝硬変。年代別の各グループの割りあいを検討したところ、C1とC5の増加が近年の非B非C肝癌の増加

に寄与している可能性が示唆された。

#### D. 考察

近年、肥満人口の増加とともに非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の肝細胞癌発癌への関与が注目されているが、成人日本人男性では、20g/日以下の飲酒者はむしろ少数派であり、飲酒と肥満のリスクを併せ持つ集団(C2)の同定が必要である。また、中等度飲酒と加齢以外に特段の危険因子を擁しない集団(C1)が同定されたため、今後これらの集団に隠れた危険因子が存在しないか精査する必要があると思われる。

#### E. 結論

階層化クラスタリングを用いることによって、従来言われている NASH やアルコール性肝硬変以外に肝機能正常高齢男性や肥満と飲酒のリスクを併せ持つ集団など新たな背景集団を抽出することができた。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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, Hatziaepostolou 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.
- 2) 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]

##### 2. 学会発表

- 1) 柏木真太郎、建石良介、榎奥健一郎、藤原直人、佐藤雅哉、南達也、三神信太郎、内野康志、椎名秀一朗、吉田晴彦、小池和彦、慢性肝疾患における肝発癌への糖尿病の関与、第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013
- 2) 建石良介、岡上武、小池和彦、非 B 非 C 肝細胞癌の現況と問題点、第 49 回日本肝臓学会、東京、2013
- 3) 榎奥健一郎、建石良介、近藤真由子、藤原直人、南達也、佐藤雅哉、内野康志、浅岡良成、近藤祐嗣、吉田晴彦、小池和彦、NAFLD/NASH の肝病理組織像と肝および全身のインスリン抵抗性、第 34 回日本肥満学会、東京、2013
- 4) 藤原直人、建石良介、榎奥健一郎、近藤真由子、佐藤雅哉、南達也、三神信太郎、内野康志、浅岡良成、近藤祐嗣、吉田晴彦、小池和彦、NAFLD/NASH、および NASH-HCC における酸化ストレスマーカー d-ROMs の意義、第 17 回日本肝臓学会大会、東京、2013
- 5) 建石良介、増崎亮太、小池和彦、病態別に見た肝予備能評価の新展開肝発癌リスク・肝予備能評価における肝弾性度測



- |   |                |
|---|----------------|
| 定の意義、第 17 回日本肝臓学会大会、東京、2013   | 1.特許取得<br>なし   |
| 6) 榎奥健一郎、 <u>建石良介</u> 、小池和彦、NAFLD/NASH における高インスリン血症は肝炎症と相関している、第 17 回日本肝臓学会大会、東京、2013   | 2.実用新案登録<br>なし |
| 7) 榎奥健一郎、 <u>建石良介</u> 、小池和彦、非 B 非 C 肝炎において肝脂肪は発癌の危険性を低下させる、第 55 回日本消化器病学会大会、東京、2013   | 3.その他<br>なし    |
| 8) <u>RyosukeTateishi</u> , Takeshi Okanoue, Naoto Fujiwara, KiwamuOkita, Kendo Kiyosawa, Masao Omata, HiromituKumada, Norio Hayashi, and Kazuhiko Koike for the INUYAMA NOBLESSE Study Group, Categorization of non-B, non-C hepatocellular carcinoma patients using hierarchical clustering, The annual meeting of American Association for the Study of the Liver Diseases, Washington, USA, 2013  |                |
| 9) <u>RyosukeTateishi</u> , Takeshi Okanoue, Naoto Fujiwara, KiwamuOkita, Kendo Kiyosawa, Masao Omata, HiromituKumada, Norio Hayashi, and Kazuhiko Koike for the INUYAMA NOBLESSE Study Group, Clinical characteristics, treatment and prognosis of non-B non-C hepatocellular carcinoma: a large retrospective multicenter cohort study、The annual meeting of European Association for the Study of the Liver, Amsterdam, Netherland, 2013 |                |

H. 知的所有権の出願・取得状況

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, <u>Koike K</u> , Yatomu Y, Ikeda H.	Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients.	<b>Int J Cancer</b>			[Epub ahead of print]
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.	<b>Proc Natl Acad Sci U S A</b>			[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.	<b>J Gastroenterol</b>			[Epub ahead of print]
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,	Results of the Tokyo Trial of Prevention of Post-ERCP Pancreatitis with Risperidone-2: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial.	<b>Gastrointest Endosc</b>			[Epub ahead of print]

Hirano K, Tada M, <u>Koike K.</u>					
Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, <u>Koike K.</u> , Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H.	Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis C using multiple fibrosis markers.	<b>Hepatol Res</b>			[Epub ahead of print]
Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, <u>Koike K.</u>	Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression.	<b>Biochem Biophys Res Commun</b>			[Epub ahead of print]
Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, <u>Koike K.</u>	Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C.	<b>Hepatol Res</b>			[Epub ahead of print]
Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Fushimi K, <u>Koike K.</u>	Acute liver disease in Japan: a nationwide analysis of the Japanese Diagnosis Procedure Combination database.	<b>J Gastroenterol</b>			[Epub ahead of print]
Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, <u>Koike K.</u>	IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection.	<b>J Gastroenterol</b>			[Epub ahead of print]

Mikoshiba N, Miyashita M, Sakai T, Tateishi R, <u>Koike K.</u>	Depressive symptoms after treatment in hepatocellular carcinoma survivors: prevalence, determinants, and impact on health-related quality of life.	<b>Psychooncology</b>			[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, <u>Koike K.</u>	CT with hepatic arteriportography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial.	<b>Am J Gastroenterol</b>	108	1305-1313	2013
Inoue Y, Tomiya T, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ikeda H, <u>Koike K.</u>	Induction of p53-Dependent p21 Limits Proliferative Activity of Rat Hepatocytes in the Presence of Hepatocyte Growth Factor.	<b>PLoS One</b>	8(11)	e78346	2013
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, <u>Koike K.</u> , Yatomi Y, Ikeda H.	Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- $\alpha$ and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1.	<b>Hepatol Res</b>	43(10)	1005-1012	2013
Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C,	Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene	<b>Sci Rep</b>	3	2739	2013