

201320021A

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
C型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立に関する研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 松浦 善治

平成26(2014)年4月

目次

I. 総括研究報告書

C 型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立に関する研究

松浦善治 2

II. 分担研究報告書

C 型肝炎ウイルス感染によって誘導されるオートファジーの解析

松浦善治 16

脂肪肝と肝細胞癌の発症機構の解析

小池和彦 19

HCV 感染による肝線維化誘導の機構

鈴木哲朗 23

HCV 感染症における IFN- λ 産生樹状細胞の意義

考藤達哉 25

HCV 感染による肝がん発症と変動分子

森石恆司 27

切除肝組織を用いた C 型肝炎細胞癌の発生と悪性度マーカーの探索 ~脂肪酸代謝酵素 (FABP) の重要性の検討~

武富紹信 30

HCV 感染と酸化ストレス応答に関する研究

勝二郁夫 34

HCV コア蛋白質発現マウスにおける肝炎発症機構の解析

山本雅裕 37

HCV 関連遺伝子発現アデノウイルスベクターシステムの開発 及び班員へのベクター供給

鐘ヶ江 裕美 40

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

43

IV. 研究成果の刊行物・別冊 (別添)

50

C型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立に関する研究

研究代表者 松浦善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：オートファジー関連遺伝子を Huh7 細胞から欠損させると、オートファゴソーム形成は抑制されるものの、HCV の増殖には何ら影響は認められないことから、HCV 感染によって誘導されるオートファジーはこれまでのものとは異なることが示唆された。Statin によって HCV 感染で誘発される肝脂肪化、脂肪組成異常、ミトコンドリア機能・形態異常の改善が認められた。HCV 感染による肝線維化に関連して、小胞体ストレス依存的な TGF β 2 の発現制御機構が示唆された。HCV コア蛋白質発現マウスの肝臓を種々のストレス誘導剤で刺激し、その破砕液とマクロファージと共培養すると、マクロファージの炎症反応が増強された。コア蛋白質発現マウスの肝臓や HCV 感染細胞の微量質量分によって、HCV コア蛋白質の発現や HCV の複製によって、脂質全体の変動に一定のパターンが認められた。また、HCV コア蛋白質による過酸化水素消去酵素の分解誘導にユビキチンリガーゼ E6AP の関与が示唆された。IL28BSNP major の健常者の BDCA3+ の樹状細胞に HCV が侵入すると、IL28BSNP minor のものよりも多量の IFN- λ を産生し、肝細胞の ISG を誘導することが示された。C 型肝細胞癌の初回肝切除症例(97 例)の切除組織の解析から、Fatty acid binding protein 5 (FABP5)が AFP-L3 を陵駕する細胞癌の悪性度に強く関連する予測因子であることが明らかとなった。VA 欠失アデノウイルスベクターは miR122 などの small RNA の発現ベクターとして有用性が高いことが証明された。

研究分担者

小池和彦 東京大学・教授
鈴木哲朗 浜松医科大学・教授
考藤達哉 国際医療研究センター・室長
森石恆司 山梨大学・教授
武富紹信 北海道大学・教授
勝二郁夫 神戸大学・准教授
山本雅裕 大阪大学・教授
鐘ヶ江裕美 東京大学・助教

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)に有効な薬剤の開発により、C 型慢性肝炎患者からのウイルス排除に関しては良好な成果が得られつつある。しかしながら、HCV の *in vivo* ならびに *in vitro* の解析系は限定されており、病原性の発症機序の解析は進んでいない。特に、化学療法によって HCV を生体から排除できたとしても肝発癌の危惧は払拭できず、今後は肝癌への進展を制御する新しい治療法の確立が重要となる。本研究では、*in vitro* および *in vivo* の感染モデルを構築し、HCV 感染による慢性持続性感染、線維化、脂肪化、そして発癌のメカニズムを解明し、慢性 C 型肝炎から肝細胞癌への進展を阻止できる新しい治療法の開発を基礎、臨床の両面から検討することを目的とする。

B. 研究方法

(松浦) In vitro で合成した人工ヌクレアーゼをコードする mRNA を Huh7 細胞に導入し、クローニングした細胞の遺伝子を解析することによって、ATG5、ATG13、および ATG14 遺伝子を欠損した Huh7 細胞を樹立した。ノックアウト Huh7 細胞における血清飢餓や Rapamycin 処理によるオートファジーの誘導を検討するとともに、HCV 感染によるオートファジーの誘導と HCV の増殖性を検討した。

(小池) HCV コア遺伝子発現マウスおよび対照マウスに、それぞれ通常食と同カロリー同成分の Fluvastatin 配合食を 3 ヶ月投与し、肝臓内の脂質量、ミトコンドリアの電子顕微鏡像、及び電子伝達系の蛋白量を検討した。

(鈴木) HCV を感染させた HuH-7 細胞からトータル RNA を回収し、目的遺伝子の発現を TaqMan RT-PCR 法で解析した。蛋白発現は Western Blotting および蛍光染色により評価した。HCV 蛋白発現ベクターは、pCAGMCS へ各 HCV 蛋白領域の遺伝子を挿入し作製した。TGFbeta プロモーター活性の解析には、pGL4.1 ベクターに同プロモーター遺伝子またはその変異体遺伝子を挿入し作製した種々のレポータープラスミドを作製し肝癌細胞株へトランスフェクションし細胞内ルシフェラーゼ活性を測定した。

(考藤) 非感染者末梢血から DC サブセット (BDCA3+DC, PDC, MDC) を分離し、TLR リガンド、HCVcc、HCV-JFH-1 感染 Huh7.5.1 など刺激し、IFN- α/β 、IFN- λ を ELISA で定量した。HCV の細胞への侵入経路、DC 内での認識機構を検討するために、抗 CD81 抗体、Endosome 酵素阻害剤、TRIF 阻害ペプチドなどで DC を処理し、同様の HCV 刺激を加えて IFN 産生を評価した。また Huh7.5.1 での ISG 誘導を定量的 PCR で評価した。IL28B SNP Major、minor の対象者それぞれから同様に DC サブセットを分離し、HCV 刺激に対する IFN 産生能と肝 ISG 誘導能を比較した。

(森石) 脂質分子群の変化をリアルタイムで解析できる簡便で正確な方法として、Probe Electrospray Ionization 質量分析法を採用した。測定試料として、HCV レプリコン細胞および Cured 細胞、ウイルス感染細胞お

よびコア蛋白発現 (CoreTg) マウス肝臓組織を用いた。各試料の脂質成分を解析し、アルゴリズムにより脂質分子組成の変化を解析した。それぞれのレプリコン細胞株の Cured 細胞は Vx950 と BMS-790052 処理によって作製した。

(武富) HCV による肝脂肪化・線維化・発癌関連因子の発現変化を患者サンプルで網羅的に解析した。切除組織を用いて網羅的に HCV による肝脂肪化・線維化・発癌に関連して変動する microRNA を検討した。包埋組織から HCV および非 HCV 関連 HCC 組織の spiral 組織アレイを作製し、蛋白質の発現を組織レベルで検証した。

(勝二) 各種遺伝子型の HCV コア蛋白と相互作用する新規宿主因子の探索とその相互作用を介した糖代謝・脂質代謝系への影響を HCV 感染培養系で解析した。HCV 感染による酸化ストレス、ユビキチン・プロテアソーム系、リソソーム系などの蛋白質分解系への影響と病原性・発癌の関連を解析した。

(山本) HCV ゲノムを肝臓特異的かつ時間特異的に誘導するノックインマウス (iHCV-KI マウス) を作製し、炎症性宿主因子群の動態を指標に HCV 依存的な肝炎発症機序を検討する。高脂肪食・アルコール投与などにより iHCV-KI マウスにおいて慢性肝炎を誘発・持続・促進させ、ヒト型により近い炎症肝癌誘導モデルを確立する。

(鐘ヶ江) HCV の増殖に関与する遺伝子を高度に発現するアデノウイルスベクターを作製する。マウスモデルへの直接投与が可能なレベルのアデノウイルスベクターの作製と臨床応用を見据えたベクター大量培養系の確立。マウスモデルを用いたアデノウイルスベクターの治療効果の評価と各班員の要望に応じたアデノウイルスベクターを供給した。

C. 研究結果

(松浦) 人工ヌクレアーゼを用いて、ATG5、ATG13、および ATG14 のノックアウト Huh7 細胞を樹立した。血清飢餓や Rapamycin の処理によるオートファゴソームの誘導は、いずれのノックアウト細胞においても抑制

されていた。ATG5 の欠損により HCV 感染によるオートファジーのマーカーである LC3 の Lipidation は抑制されたが、ATG13 や ATG14 の欠損細胞では、HCV の感染で LC3 の Lipidation が誘導された。また、ATG5、ATG13 および ATG14 のノックアウト細胞における HCV の増殖能は対照細胞と同レベルであった。また、HCV に感染した細胞では、オートファジーの新規誘導が抑制されていたことから、HCV は非定型的にオートファジーを制御していることが示唆された。

(小池) Fluvastatin (FLV) 投与によって、コア遺伝子発現マウスおよび対照マウスの体重、肝重量には変化がなかった。FLV 投与によって、通常食を与えたコア遺伝子発現マウスに認められた肝脂肪化(中性脂肪の増加)、肝臓中性脂肪の不飽和化(オレイン酸/ステアリン酸比、パルミトオレイン酸/パルミチン酸比は有意に改善した。HMG-CoA reductase は FLV により抑制された。肝内コレステロール量の低下に伴うと考えられる LDL-R の発現増強が認められたコア遺伝子発現マウスでは、FLV により stearyl-CoA desaturase (SCD)-1 (不飽和化) が抑制された。脂肪酸合成抑制の negative feedback と考えられる SREBP-1c の mRNA 上昇がみられた。HCV コア蛋白によって引き起こされる肝細胞のミトコンドリア外膜の形態異常と電子伝達系蛋白質の減少のいずれもが、FLV 投与によって改善した。

(鈴木) 細胞外基質の発現調節に働くサイトカインである TGFbeta の発現が HCV 感染によってどのように変化するか調べるため、HuH-7 細胞へ HCV を感染させ 3 日後に TGFbeta1, TGFbeta2 の mRNA を測定したところ、両遺伝子とも感染量依存的に発現上昇が認められた。特に、TGFbeta の発現亢進は顕著で、MOI=1 で非感染細胞の 7 倍まで上昇した。感染を抗 CD81 抗体で阻害したときこの発現変化はキャンセルされた。

HCV タンパク質の強制発現系で TGFbeta2 mRNA 発現及びプロモーター活性を調べた所、Core 単独、NS3~NS5B の発現に比べ、Core~NS2 発現のとき mRNA 発現及びプロモーター活性は最も顕著な上昇を認めた。この解析では、TGFbeta2 プロモーターとして-931~+37 (転写開始点を+1)

領域を用いたが、-96~+37 領域の場合もプロモーター活性に大きな変化は認められず、Core~NS2 発現による活性上昇も維持されていた。TGFbeta2 遺伝子-96~+37 領域内には-69~-64 に cAMP response element (CRE) 配列が存在する。実際この部位に CREB/ATF1 また c-Jun/ATF2 が結合し TGFbeta2 の転写調節に働くことが報告されている。今回、データベースサーチから、この領域にはさらに-46~-40 に CREBH という肝臓特異的転写因子の認識配列 CREBHRE が存在することを見出した。この CRE または CREBH を点変異させたときプロモーター活性の顕著な低下が認められ、両配列とも変異させるとさらに活性低下が観察された。Core~NS2 発現または非発現細胞の核抽出物を抗 CREBH 抗体で免疫沈降し、上記の CRE~CREBHRE 領域遺伝子を定量 PCR 解析したところ(クロマチン免疫沈降)、CREBH-TGFbeta2 プロモーター複合体形成を示す成績が得られた。また、Core~NS2 発現細胞で CREBH の活性化(活性化型 CREBH レベルの亢進)を示唆する知見も得られた。

(考藤) HCV や HCV が複製している肝癌細胞を認識して BDCA3+DC は IFN-λ を、PDC は IFN-α/β を産生することが明らかになった。HCV は CD81 を介して BDCA3+DC に侵入し、エンドゾームの TLR3/TRIF によって認識されて IFN-λ を誘導することが明らかになった。IL28BSNP major の健常者から分離した BDCA3+DC は、IL28BSNP minor の健常者の DC よりも多量の IFN-λ を産生し、IFN-λ の量依存的に肝細胞 ISG を誘導することが示された。

(森石) 新規に作製した四つのサブゲノムレプリコン細胞株とそれぞれの Cured 細胞の比較では、トリグリセリドおよびホスファチジルコリン領域の脂質組成の解析からレプリコン細胞群は Cured 細胞群とは異なった組成パターンを示し、レプリコン細胞間で同様の傾向を示した。また HCVcc 感染の有無の比較からも同様の結果が得られた。培養細胞における感染あるいはウイルスゲノム複製によって、クラスターの分布が明らかに異なり、アルゴリズムによってより顕著な区別が可能となると思われる。さらに、コア遺伝子発現マウスの肝臓の脂質組

成に野生型マウスとは異なる特徴的な脂質組成の分布パターンがみられ、ヒートマップによって明らかに異なる分子種が認められた。

(武富) 初回肝切除を受けた HCV 陽性肝細胞癌 97 症例を解析した。累積生存における多変量解析では、AFP-L3 が 10%以上である症例のハザード比(HR)が 2.82 ($p=0.01$)であったのに対し、Fatty acid binding protein 5 (FABP5) 陽性群では HR が 5.32 ($p<0.0001$)であった。FABP5 は肝細胞癌の悪性度に強く関連し、従来のバイオマーカーを凌駕する強力な予後予測因子であることが明らかになった。切除組織非癌部からのウイルス感染肝細胞の初代培養に成功した。維持できる肝細胞の比率は、同じ培養皿内で旺盛に増殖する他の細胞種(おそらく線維芽細胞)の増減によって変動した。DMSO 混合培養下では、形態的には肝細胞と判断される大型細胞の比率が上がるが、絶対数はほとんど変わらなかった。

(勝二) HCV J6/JFH1 感染 Huh-7.5 細胞において感染後 2-3 日目から Prx 1, 2, 3, 5 の蛋白質の著明な減少が認められた。HCV core 蛋白質を恒常的に発現する Huh-7 細胞において Prx1 の分解が促進した。コントロールプラスミドを導入した Huh-7 細胞では Prx1 の分解は遅く、比較的安定であった。HCV J6/JFH1 株を Huh-7.5 細胞に感染させると Akt (S473)のリン酸化が感染後 3 日目より増強した。Akt の蛋白質量は増加していなかった。PTEN の量は大きな変動はなかったが、酸化型、還元型を比較する必要があると考えられた。

(山本) コア発現マウスならびに野生型マウスより単離した初代肝細胞に種々の刺激を行い、その培養上清と細胞溶解液を骨髄由来マクロファージの培養液に添加した際に誘導される炎症性サイトカイン IL-12p40 と TNF-alpha の産生量について検討を行った。HCV の細胞内複製を想定した細胞質内二重鎖 RNA 刺激においては、コア蛋白質発現の有無によるマクロファージからの炎症性サイトカイン産生に差は認められなかった。しかし、肝細胞を LPS または TNF-alpha で刺激を行った場合、野生型肝細胞に比べてコア発現肝細胞の培養上清ならびに細胞溶解液は、マクロファージに IL12-p40 と

TNF-alpha の産生を誘導する傾向が見られた。また、CrebH 欠損マウスに解熱鎮痛剤として使用されているスルピリンを腹腔内投与して致死的ショックについて検討を行った所、CrebH 欠損マウスは野生型マウスに比べ、耐性を示した。詳細な解析の結果、スルピリンは CrebH 依存的に小胞体ストレスを誘導し、肝臓での解毒・薬物代謝に重要な役割を担っている酵素の CYP2B 遺伝子群の発現を誘導して代謝され、その代謝副産物によって致死的ショックが誘発される場合がある事を証明した。HCV コア蛋白質発現マウスの肝臓を種々のストレス誘導剤で刺激し、その破砕液と自然免疫細胞であるマクロファージと共培養した結果、マクロファージの炎症反応が増強されることを見出した。

(鐘ヶ江) miR122 など 5 種類の遺伝子をノックアウトするためのアデノウイルスベクター(AdV)を作製し供給した。また、HCV に対する shRNA を発現する AdV を作製したところ、VA 欠失 AdV は VA 保持 AdV と比べ有意に高い HCV 複製抑制効率を示すことを明らかにし、VA 欠失 AdV は miR122 などの small RNA 発現ベクターとして有用性が高いことを証明した。

D. 考察

(松浦) HCV は ATG13 および ATG14 非依存的にオートファジーを誘導していることが推測される。今後は、オートファジー経路の抑制因子である Rubicon のノックアウト Huh7 細胞を作製し、HCV の感染性に対する影響を検討する予定である。

(小池) Statin が直接ミトコンドリア構成脂質(cardiolipin)などの量、組成を制御し、HCV コア蛋白によるミトコンドリア形態異常、機能異常を改善している可能性が示唆された。

(鈴木) HCV による TGFbeta2 発現変動についてはこれまで一報告あり、Core タンパク質発現によって TGFbeta2 の転写活性が亢進することが示されている (Hepatology 2009)。本研究では、Core だけでなく HCV polyprotein の発現も評価し、Core 発現レベルは単独発現より低いものの Core~NS2 発現の場合に TGFbeta2 発現が最も顕著に亢進することを見出した。E1, E2, p7, NS2

はいずれも小胞体膜貫通型タンパク質である。今回の解析から、肝臓で高発現し小胞体ストレス等で活性化する膜結合型転写因子 CREBH が TGFbeta2 の転写調節及び HCV 発現による活性亢進に関与する可能性が示された。HCV 感染で発現する Core~NS2 によって誘導される小胞体ストレスが CREBH を活性化し TGFbeta2 プロモーターを正に調節するモデルを考えている。

(考藤) BDCA3+DC は HCV を感知して多量の IFN- λ を産生し、一方 PDC は HCV を感知して IFN- α/β を産生した。生体は HCV に対して異なる DC サブセットを用いて異なる IFN 産生で対応しており、生体防御機構としての DC の重層性が示された。

(森石) HCV 複製・感染やコア蛋白質発現による分子組成の変動に一定の規則性を見いだすことができた。また、PESI-MS は先端径数百ナノメートルの金属探針によって試料の採取とイオン化を行う（非切除）、大気圧下で特別な処理なし連続して分析できる（多点での測定が可能）と言った特性を備えており、殺処分せずに経時変化や測定位置を変化させて解析可能である。今後、この手法の特性を生かして CoreTg マウスの加齢、領域による影響も検討する。また、明らかに異なる分子種が存在していることから、次年度以降、それらの分子種の同定する予定である。

(武富) 現在、各種の肝癌細胞株を用いて、FABP5 のノックダウンや強発現による細胞の性質の変化を検討中である。特に、細胞分裂・増殖、細胞運動、にどのように関わるかを詳細に検討する。切除肝組織から癌部、非癌部を分離、分離、培養条件を検討中である。最も困難な切除組織非癌部からのウイルス感染肝細胞の初代培養に成功したが、収率、生細胞率、純度などの詳細な検討が必要である。

(勝二) HCV 感染で Prx 1, 2, 3, 5 の蛋白質量の減少が認められた。また、HCV Core 持続発現細胞で Prx1 の半減期が短縮しており、分解が促進している可能性が示された。

HCV Core に結合するユビキチンリガーゼ E6AP の関与が考えられ、今後、さらに解析が必要である。また、HCV J6/JFH1 感染で Akt が活性化されていた。近年、PTEN の安

定性が Prx1 との相互作用で調節されるとする報告があり、Prx 1 減少と PTEN の oxidation の関連について解析する必要がある。次年度は HCV J6/JFH1 感染による Prx family の減少と病原性、ウイルス増殖への影響、さらに分子機構を明らかにする予定である。

(山本) コア発現肝細胞を LPS や TNF-alpha などの刺激を行うと、野生型肝細胞に比べて、マクロファージに炎症性サイトカイン産生を促す分子がより多く誘導されている可能性が暗示された。また、肝細胞に強く発現している CrebH は肝臓における小胞体ストレス応答に強く関与している事が暗示された。コア蛋白質は小胞体ストレスを誘導しうる事から、コア発現マウスは野生型マウスに比べて肝臓での小胞体ストレス応答が起こりやすく、その結果、肝臓の慢性炎症が引き起されている可能性がある。今後は、活性化型 CrebH を発現するマウスを用いて、肝臓での小胞体ストレス応答による慢性炎症への影響について解析を行う予定である。

(鐘ヶ江) 本研究により、細胞遺伝子発現を OFF に制御するために応用されている shRNA や miRNA を発現するためには VA 欠失 AdV が有用であることが明らかになった。近年 VA RNA 自体が miRNA として機能して複数の細胞遺伝子発現を低下することが報告されており、HCV 関連細胞遺伝子の発現にも影響を与える可能性があるため、今後は全てのベクターを VA 欠失 AdV として供給する体制を整えた。また本研究で同定した shRNA は HCV ゲノム複製を効率的に抑制することが明らかになり、遺伝子治療用ベクターとしても有用性が高いと考える。ベクター供給としては、ZFN 発現 AdV を「切り出し発現型 AdV」として作製することで特定遺伝子ノックアウト細胞の樹立化の効率化が図られたが、今後は CRISP/Cas9 システムなどへも応用を広げていく。

E. 結論

1. HCV は ATG13 や ATG14 非依存的にオートファジーを制御している。
2. C 型肝炎患者および NASH、HBV 患者への statin による肝発癌抑制の可能性が示

唆された。

3. HCV 感染また Core~NS2 発現によって TGFbeta2 発現が有意に亢進する。
4. BDCA3+DC/IFN-λ は抗 HCV 的に作用することが明らかとなり、HCV 排除の治療標的として有用であることが示唆された。
5. HCV 感染、ウイルス複製およびコア蛋白質の発現によって脂質構成成分に異なるパターンが見られ、発がん予測などに応用の可能性が示唆された。
6. FABP5 は肝細胞癌の悪性度に強く関連し、従来のバイオマーカーを凌駕する強力な予後予測因子となることが明らかになった。
7. HCV 感染により、Prx1, 2, 3, 5 の発現抑制が起こり、酸化ストレス応答が減弱している可能性が示された。また、HCV J6/JFH1 感染で Akt が活性化されており、Prx 1 減少と PTEN の oxidation の関連を解析する必要がある。
8. コア発現初代肝細胞は非発現初代肝細胞に比べ、マクロファージを活性化する傾向が認められた。
9. shRNA や miRNA の発現には従来の AdV ではなく、VA 欠失 AdV が、また、ZFN、TALEN 発現には「切り出し発現型 AdV」の有用性が高いことを示した。

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, and Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol* 2013;87:489-502
2. Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, and 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
3. Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, and Takeda K. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol* 2013;87:9997-10003
4. Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, Matsuura Y, and Mizuguchi K. Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach. *J Proteome Res* 2013;12:2537-2551
5. 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 ;438(1):230-235. PubMed PMID: 23891753.
6. 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.
7. 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;57(7):935-942. PubMed PMID: 23704123.
8. 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.
9. 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 ;1305-1313. PubMed PMID: 23629602.
10. 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
11. 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. *Hepatology Res* 2013;43(10):1005-1012. PubMed PMID: 23356977.
 12. 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):384-396. PubMed PMID: 24120137.
 13. 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. PubMed PMID: 24061441.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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. PubMed PMID: 23989853.
 17. 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. *Hepatology Res* 2013;43(6):596-604. PubMed PMID: 23131000.
 18. 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 Hepatology* 2013;58(5):875-882. PubMed PMID: 23321320.
 19. 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
 20. 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. PubMed PMID: 23593129; PubMed Central PMCID: PMC3625228.
 21. 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. PubMed PMID: 23593449; PubMed Central PMCID: PMC3623965.
 22. 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.

23. 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.
24. 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.
25. 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, Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4. *PLOS ONE* (in press).
26. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling. *Microbes Infect* (in press).
27. 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* 9; e1003589, 2013.
28. Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Hmwe SS, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. *PLOS ONE* 8; e68992, 2013.
29. Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi SI, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S. HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor. *Sci Rep* 3; 3243, 2013.
30. Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. *Microbes Infect* 15; 45-55, 2013.
31. Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. *Gastroenterology* 144; 56-58, 2013.
32. Yoshio, S., Kanto, T., Kuroda, S., Matsubara, T., Higashitani, K., Kakita, N., Ishida, H., Hiramatsu, N., Nagano, H., Sugiyama, M., Murata, K., Fukuhara, T., Matsuura, Y., Hayashi, N., Mizokami, M. and Takehara, T., Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013. 57: 1705-1715
33. Oze, T., Hiramatsu, N., Yakushijin, T., Miyazaki, M., Iio, S., Oshita, M., Hagiwara, H., Mita, E., Inui, Y., Hijioka, T., Inada, M., Tamura, S., Yoshihara, H., Inoue, A., Imai, Y., Miyagi, T., Yoshida, Y., Tatsumi, T., Kanto, T., Kasahara, A., Hayashi, N. and Takehara, T., Using early viral kinetics to predict antiviral outcome in response-guided pegylated interferon plus ribavirin therapy among patients with hepatitis C virus genotype 1. *J Gastroenterol* 2013 in press
34. Ishida, H., Kato, T., Takehana, K., Tatsumi, T., Hosui, A., Nawa, T., Kodama, T., Shimizu, S., Hikita, H., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N. and Takehara, T., Valine, the branched-chain amino acid, suppresses hepatitis C virus RNA replication but promotes infectious particle formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013. 437: 127-133
35. Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Shindo H, Maekawa S, Enomoto N, Tsubuki M, Moriishi K: Inhibitory effects of caffeic Acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus. *PLOS One*, 8: e82299, 2013
36. Tani J, Shimamoto S, Mori K, Kato N, Moriishi K, Matsuura Y, Tokumitsu H, Tsuchiya M, Fujimoto T, Kato K, Miyoshi H, Masaki T, Kobayashi R: Ca(2+) /S100 proteins regulate HCV virus NS5A-FKBP8/FKBP38 interaction and HCV virus RNA replication. *Liver Int.*, 33: 1008-1018, 2013
37. Ogawa Y, Kawamura T, Matsuzawa T, Aoki R, Gee P, Yamashita A, Moriishi K, Yamasaki K, Koyanagi Y, Blauvelt A, Shimada S: Antimicrobial Peptide LL-37 Produced by HSV-2-Infected Keratinocytes Enhances HIV Infection of Langerhans Cells.

- Cell Host Microbe, 13: 77-86, 2013
38. Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N: Deep-Sequencing Analysis of the Association between the Quasispecies Nature of the Hepatitis C Virus Core Region and Disease Progression. *J. Virol.*, 87: 12541-12551, 2013
 39. Matsuzawa T, Kawamura T, Ogawa Y, Takahashi M, Aoki R, Moriishi K, Koyanagi Y, Gatanaga H, Blauvelt A, Shimada S: Oral administration of the CCR5 inhibitor, maraviroc, blocks HIV ex vivo infection of Langerhans cells within epithelium. *J. Invest. Dermatol.*, 133: 2803-2805, 2013
 40. Hashimoto K, Yamada S, Katano H, Fukuchi S, Sato Y, Kato M, Yamaguchi T, Moriishi K, Inoue N: Effects of immunization of pregnant guinea pigs with guinea pig cytomegalovirus glycoprotein B on viral spread in the placenta. *Vaccine*, 31: 3199-3205, 2013
 41. Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, Moriishi K, Nishiyama Y, Shimada S: Mast Cells Play a Key Role in Host Defense against Herpes Simplex Virus Infection through TNF-alpha and IL-6 Production. *J. Invest. Dermatol.*, 133: 2170-2179, 2013
 42. Honda S, Miyagi H, Suzuki H, Minato M, Haruta M, Kaneko Y, Hatanaka KC, Hiyama E, Kamijo T, Okada T, Taketomi A. RASSF1A methylation indicates a poor prognosis in hepatoblastoma patients. *Pediatr Surg Int.* 2013 Nov;29(11):1147-52.
 43. Wakayama K, Kamiyama T, Yokoo H, Kakisaka T, Kamachi H, Tsuruga Y, Nakanishi K, Shimamura T, Todo S, Taketomi A. Surgical management of hepatocellular carcinoma with tumor thrombi in the inferior vena cava or right atrium. *World J Surg Oncol.* 2013 Oct 5;11:259.
 44. Shibasaki S, Takahashi N, Toi H, Tsuda I, Nakamura T, Hase T, Minagawa N, Homma S, Kawamura H, Taketomi A. Percutaneous transhepatic gallbladder drainage followed by elective laparoscopic cholecystectomy in patients with moderate acute cholecystitis under antithrombotic therapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2013 Sep 11.
 45. Okada T, Honda S, Miyagi H, Kubota KC, Cho K, Taketomi A. Liver fibrosis in prenatally diagnosed choledochal cysts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2013 Aug;57(2)
 46. Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kurogouchi M, Togashi T, Miura N, Nakanishi K, Kamachi H, Kakisaka T, Tsuruga Y, Fujiyoshi M, Taketomi A, Nishimura S, Todo S. Identification of novel serum biomarkers of hepatocellular carcinoma using glycomic analysis. *Hepatology.* 2013 Jun;57(6):2314-25
 47. Ijichi H, Shirabe K, Taketomi A, Yoshizumi T, Ikegami T, Mano Y, Aishima S, Abe K, Honda H, Maehara Y. Clinical usefulness of (18) F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for patients with primary liver cancer with special reference to rare histological types, hepatocellular carcinoma with sarcomatous change and combined hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Hepatol Res.* 2013 May;43(5):481-7.
 48. Shimada S, Kamiyama T, Yokoo H, Wakayama K, Tsuruga Y, Kakisaka T, Kamachi H, Taketomi A. Clinicopathological characteristics and prognostic factors in young patients after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2013 Mar 2;11:52.
 49. Taketomi A, Shirabe K, Muto J, Yoshiya S, Motomura T, Mano Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Sugio K, Maehara Y. A rare point mutation in the Ras oncogene in hepatocellular carcinoma. *Surg Today.* 2013 Mar;43(3):289-92
 50. Mano Y, Aishima S, Fujita N, Tanaka Y, Kubo Y, Motomura T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, Oda Y. Tumor-associated macrophage promotes tumor progression via STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma. *Pathobiology.* 2013;80(3):146-54.
 51. 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.
 52. 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*, in press.

53. 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*, 10 (1):259, 1-9, 2013.
54. 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*, 126 (Pt9): 2014-26, 2013.
55. 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*, 58 (2): 555-63, 2013.
56. 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.
57. Sasai M, Yamamoto M. Pathogen Recognition Receptors: Ligands and Signaling Pathways by Toll-like Receptors. *Int Rev Immunol.* (2013) 32:116-33.
Kemp LE, Yamamoto M. Soldati-Favre D. Subversion of host cellular functions by the apicomplexan parasites. *FEMS Microbiol Rev.* (2013) 37:607-31.
58. Satoh T, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M., Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O, Akira S. Critical role of Trib1 for the differentiation of adipose tissue-resident macrophages maintaining metabolic homeostasis. *Nature.* (2013) 495:524-8.
59. Lundberg AM, Ketelhuth DF, Johansson ME, Gerdes N, Liu S, Yamamoto M., Akira S, Hansson GK. Toll-like receptor 3 and 4 signalling through the TRIF and TRAM adaptors in hematopoietic cells promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* (2013) 99:364-73.
60. Kamiyama N, Yamamoto M. Saiga H, Ma JS, Ohshima J, Machimura S, Sasai M, Kimura T, Ueda Y, Kayama H, Takeda K. CREBH Determines the Severity of Sulpyrine-Induced Fatal Shock. *PLoS One.* (2013) 8:e55800.
61. Kusu T, Kayama H, Kinoshita M, Jeon SG, Ueda Y, Goto Y, Okumura R, Saiga H, Kurakawa T, Ikeda K, Maeda Y, Nishimura J, Arima Y, Atarashi K, Honda K, Murakami M, Kunisawa J, Kiyono H, Okumura M, Yamamoto M., Takeda K. Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 7 Controls Th17 Cell Responses through Regulation of Luminal ATP in the Small Intestine. *J Immunol.* (2013) 190:774-783.
62. Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, Suzuki T., Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. *Scientific Rep.*, 2013, 3, 3575.
63. Maekawa A., Pei Z., Suzuki M., Fukuda F., Kondo S., Saito I., and Kanegae Y. Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery. *Scientific Rep.*, 2013, 3, 1136.

2. 学会発表

- 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、第86回日本生化学会シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、横浜、9月11-13日、2013
- Toru Okamoto, Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. Co-chaperones involved in the replication of hepatitis C virus, Protein Homeostasis & Viral Infection: Mechanisms to Therapeutics, Bethesda, USA, September 18-19, 2013.
- Yoshiharu Matsuura. Host factors involved in HCV propagation. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma : molecular basis and clinical links” Marsala, Italy, October 20-21, 2013.
- Yoshiharu Matsuura. Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, Infectious Diseases in Elderly Symposium, Izmir, Turkey, October 25-29, 2013.
- Yoshiharu Matsuura. Host factors involved in

- the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 3rd International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, Tainan, Taiwan, November 16-17, 2013
6. 松浦善治、C型肝炎ウイルスの複製と病原性発現に關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、12月9日、2013
 7. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Takashi Motomura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University of Pennsylvania, University Park, July 20-24, 2013.
 8. Toru Okamoto, Yukari Sugiyama, Chikako Ono, Sayaka Aizawa, Pham Duc Ngoc, Takahisa Kohwaki, Eiji Hirooka, Takasuke Fukuhara, Masahiro Yamamoto, and Yoshiharu Matsuura, Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
 9. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Masami Wada, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
 10. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, and Yoshiharu Matsuura, Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 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、11月10日-12日、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、11月10日-12日、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、11月10日-12日、2013
 14. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Sugiyama M, Murata K, Mizokami M, Hayashi N, Takehara T. Human BDCA3+ dendritic cells as a potent interferon-1 producer and an enhancer of helper T cell and natural killer cell responsive to hepatitis C virus. The Liver Meeting AASLD 64th Annual Meeting and Postgraduate Course, Washington, DC, USA, 2013
 15. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Mizokami M, Hayashi N, Takehara T. Human BDCA3+ DCs contribute to the induction of intrahepatic ISGs as a potent interferon-1 producer in HCV infection. The Liver Meeting AASLD 64th Annual Meeting and Postgraduate Course, Washington, DC, USA, 2013
 16. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K. 20th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, October 6-10., 2013
 17. Moriishi K. Exploitation of host functions by hepatitis C virus. 2013 Italy-Japan Liver Workshop "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links", Trapani, Italy, October 20-21, 2013
 18. 葛西宏威、吉村健太郎、安本順、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司 Probe electrospray Ionization 質量分析法 (PESI-MS) を用いたHCV感染細胞内脂質組成の解析 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日~12日、神戸
 19. 山下篤哉、沈暉、田中智久、葛西宏威、森石恆司 Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物によるHCVゲノム複製阻害 第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日~12日、神戸
 20. 安本順、葛西宏威、吉村健太郎、山下篤哉、田中智久、竹田扇、森石恆司、B型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の超微

- 形態変化の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
21. 田中智久、葛西宏威、山下篤哉、森石恆司、日本産ウマの血清から分離した non-primate hepacivirus の性状解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 22. 森石恆司、教育セミナー：HCV に近縁なヘパシウイルスの構造と日本産ウマからの検出、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10 日～12 日、神戸
 23. 天野稜大、山下篤哉、葛西宏威、田中智久、前川伸哉、榎本信幸、津吹政可、森石恆司、Tyrphostin とその類縁化合物による C 型肝炎ウイルス複製阻害、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸
 24. 横尾英樹、神山俊哉、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、武富紹信、大腸癌多発肝転移に対する外科切除のタイミング 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 25. 蒲池浩文、敦賀陽介、若山顕治、柿坂達彦、横尾英樹、神山俊哉、武富紹信、肝門側からの展開困難な血管合併切除を要する左葉系肝門部胆管癌に対する術式の工夫 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 26. 若山顕治、神山俊哉、横尾英樹、柿坂達彦、蒲池浩文、敦賀陽介、中西一彰、鳴村 剛、藤堂 省、武富紹信、下大静脈/右心房腫瘍栓を有する肝細胞癌に対する肝切除 第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 27. 敦賀陽介、蒲池浩文、若山顕治、柿坂達彦、横尾英樹、神山俊哉、武富紹信、当科における門脈再建法、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 28. 柿坂達彦、神山俊哉、横尾英樹、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、武富紹信、肝細胞癌リンパ節転移症例に対する治療法の検討、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 29. 川俣 太、蒲池浩文、永生高広、西原広史、田原宗徳、神山俊哉、藤堂 省、武富紹信、細胞内の局在に着目した肝外胆管癌における Mesothelin 発現の免疫組織学的検討、第 25 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、宇都宮、6 月 12 日-14 日、2013
 30. 大畑多嘉宣、横尾英樹、柿坂達彦、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信、肝細胞癌における予後再発因子としての FABP5 の有用性、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013
 31. 若山顕治、神山俊哉、柿坂達彦、横尾英樹、敦賀陽介、蒲池浩文、武富紹信、肝尾状葉腫瘍切除における 3D 画像によるシミュレーションの有用性、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013
 32. 蒲池浩文、敦賀陽介、若山顕治、柿坂達彦、横尾英樹、山下健一郎、神山俊哉、武富紹信、左葉系切除を要する高度進行胆道癌に対する Transparenchymal glissonean approach を用いた血行再建法、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013
 33. 神山俊哉、柿坂達彦、横尾英樹、蒲池浩文、若山顕治、敦賀陽介、三浦信明、西村紳一郎、藤堂 省、武富紹信、血清中糖鎖の網羅的解析による肝細胞癌新規バイオマーカーの開発、第 68 回日本消化器外科学会総会、宮崎、7 月 17 日-19 日、2013
 34. 大畑多嘉宣、横尾英樹、柿坂達彦、若山顕治、敦賀陽介、蒲池浩文、神山俊哉、武富紹信、第 24 回日本消化器癌発生学会総会、金沢、9 月 5 日-6 日、2013
 35. 皆川のぞみ、崎浜秀康、小林 希、小原美都、柴崎 晋、若山顕治、柿坂達彦、敦賀陽介、本間重紀、横尾英樹、蒲池浩文、川村秀樹、高橋典彦、神山俊哉、武富紹信、第 24 回日本消化器癌発生学会総会、金沢、9 月 5 日-6 日、2013
 36. 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.
 37. 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.

38. 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.
39. Matsui C, Shoji I, Minami N, Sianipar I R, Deng L, Hotta H. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α by hepatitis C virus NS5A protein. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
40. 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-aspartyl chlorin e6 (NPe6), against hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
41. Shoji I. Molecular Mechanisms of HCV-induced glucose metabolism disorder. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop. Trapani, Italy, October 20-21, 2013.
42. 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.
43. 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.
44. Suratno Lulut Ratnoglik, 青木千恵, 河本真理, Pratiwi Sudarmono, 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 及び半合成誘導體 Mono-L-aspartyl chlorin 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.
45. 松井千絵子, 勝二郁夫, 南奈苗, Sianipar Imelda Rosalyn, DENG Lin, 堀田博. HCV NS5A と Hepatocyte nuclear factor (HNF) -1 α 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.
46. 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.
47. 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.
48. Yamamoto M 「Selective and Strain-specific NFAT4 activation by a Toxoplasma gondii polymorphic Dense Granule Protein GRA6」 International Symposium TCUID2013 Toward Comprehensive Understanding of Immune Dynamism (Suita, Osaka, Japan, November 18-20, 2013)
49. Yamamoto M 「A protozoan parasite Toxoplasma gondii manipulates host cell functions by effector molecules」 The XIVth International Congress of Protistology, Symposium 7 (Vancouver, Canada, July 28-Aug 2, 2013)
50. Yamamoto M 「Immunological interface between host and a protozoan parasite Toxoplasma gondii」 FORUM GRADUATE SCHOOLS INFECTION & IMMUNITY BIOLOGIE-MEDECINE (Geneva, Switzerland, June 28, 2013)
51. 山本雅裕, 大嶋 淳, 馬 知秀, 神山長慶, 竹田潔 「インターフェロン誘導性遺伝子群 GBP の抗トキソプラズマ自然免疫における役割の解明」 第 82 回日本寄生虫学会大会 (東京医科歯科大学 湯島キャンパス, 東京, 平成 25 年 3 月 29 日—31 日, 2013)
52. 山本雅裕, 馬 知秀, 大嶋 淳, 笹井美和 「A Cluster of IFN-g-inducible p65 GTPases Plays a Critical role in the Host Defense against Toxoplasma gondii」 第 6 回寄生虫感染免疫研究会 (大分大学・医学部, 大分, 平成 25 年 3 月 8-9 日, 2013)
53. 近藤小貴, 宿主 RNAi 経路に影響を与える virus-associated RNA を欠失したアデノウイルスベクターの高効率作製法, 第 19 回日本遺伝子治療学会学術集会, 岡山, 7 月 4-6 日, 2013
54. 近藤小貴, アデノウイルスベクターから発現しているウイルス由来 miRNAs は細胞増殖関連遺伝子を制御する, 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 10 月 3-5 日, 2013
55. Zheng Pei, Aya Maekawa, Mariko Suzuki, Yumi Kanegae, Saki Kondo, Izumu Saito, Therapeutic strategy of HBV using

- VA-deleted adenovirus vectors dually expressing shRNA and interferon. 2013 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B viruses, Fudan University, Shanghai, October 20-23, 2013.
56. Yumi Kanegae, Aya Maekawa, Zheng Pei, Mariko Suzuki, Saki Kondo, Izumu Saito, Dual-safe adenovirus vector lacking virus-associated RNA genes enhanced shRNA activity. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress 2013, Palacio Municipal de Congresos de Madrid, Madrid, October 25-28, 2013.
57. Saki Kondo, Aya Maekawa, Mariko Suzuki, Yumi Kanegae, Izumu Saito, First-generation adenovirus vector expresses viral-associated (VA) RNAs that disturb cellular gene expressions. The 21th European Society of Gene and Cell Therapy collaborative Congress 2013, Palacio Municipal de Congresos de Madrid, Madrid, October 25-28, 2013.
58. Aya Maekawa, Zheng Pei, Mariko Suzuki, Saki Kondo, Izumu Saito, Yumi kanegae, Very efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNAi machinery: safer alternative to current vector. The European Society of Gene and Cell Therapy 2013 Annual Meeting, Palacio Municipal de Congresos, Spain/Madrid, October 25-28, 2013.
59. 近藤小貴、アデノウイルスベクターから常に発現している virus-associated (VA) RNA は標的細胞内の遺伝子発現に影響を与える、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11 月 10-12 日、2013
60. 鈴木まりこ、アデノウイルスベクターの目的遺伝子挿入領域と向きはベクター作製や発現効率に影響を与えるか：Dual 発現 vector 作製に向けた検討、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11 月 10-12 日、2013
61. 近藤小貴、アデノウイルスベクターの問題点：ベクターがコードする Virus-associated (VA) RNA は宿主遺伝子発現に影響を与える、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
62. 裴崢、1 つの細胞に多数の DNA コピーを導入できるマルチコピーを保持したコスミドのトランスフェクションにおける有用性：B 型肝炎ウイルスゲノム複製研究への応用、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
63. 前川 文、細胞特異的長期発現持続型 mini-adenovirus vector (mini-AdV) の開発、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
64. 鈴木まりこ、E3 領域への目的遺伝子の挿入はアデノウイルスベクターの作製効率に影響を与えるか：ベクター／目的遺伝子キメラ mRNA の生成、第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、12 月 3-6 日、2013
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

C型肝炎ウイルス感染によって誘導されるオートファジーの解析

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： HCV感染によって、細胞にオートファジーが誘導されることが知られている。しかしながら、HCV感染で誘導されるオートファジーの性状や、HCVの増殖に及ぼす影響は未だ不明な点が多い。そこで、オートファジーの誘導に重要な、ATG5、ATG13、およびATG14を欠損させたHuh7細胞を樹立し、HCV感染におけるオートファジーの役割を解析した。血清飢餓やRapamycin処理によるオートファゴソームの誘導は、いずれの欠損細胞においても抑制されていたが、HCVの増殖能に影響は認められなかった。HCV感染によるオートファジーの誘導はATG5欠損細胞では抑制されていたが、ATG13やATG14の欠損細胞では誘導が観察された。HCV感染によって誘導されるオートファジーは通常のものとは異なる可能性が示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染によってオートファジーが誘導されることが明らかとなり、これまでに多くの研究なされてきたが、未だ不明な点が多い。我々は、HCV RNAが自立複製しているレプリコン細胞でオートファゴソームの形成を抑制すると、細胞質内の空胞化を伴う細胞死が誘導されることから、オートファジーはHCVに感染した細胞を細胞死から保護している可能性を提示した。一方、HCV感染によるオートファジーの誘導機構に関しては未だ不明な点が多い。そこで今回、人工ヌクレアーゼを用いて、オートファジーの誘導に重要なATG5、ATG13、およびATG14の遺伝子を欠損させたHuh7細胞を樹立し、HCV感染細胞におけるオートファジーの誘導機構を明らかにするとともに、HCV感染におけるオートファジーの生物学的意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

In vitro で合成した人工ヌクレアーゼをコードするmRNAをHuh7細胞に導入し、クローニングした細胞の遺伝子を解析することによって、ATG5、ATG13、およびATG14遺伝子を欠損したHuh7細胞を樹立した。ノックアウトHuh7細胞における血清飢餓やRapamycin処理によるオートフ

アジーの誘導を検討するとともに、HCV感染によるオートファジーの誘導とHCVの増殖性を検討した。

（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、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

人工ヌクレアーゼを用いて、ATG5、ATG13、およびATG14のノックアウトHuh7細胞を樹立した。血清飢餓やRapamycinの処理によるオートファゴソームの誘導は、いずれのノックアウト細胞においても抑制されていた。ATG5の欠損によりHCV感染によるオートファジーのマーカーであるLC3のLipidationは抑制されたが、ATG13やATG14の欠損細胞では、HCVの感染でLC3のLipidationが誘導された。また、ATG5、ATG13およびATG14のノックアウト細胞におけるHCVの増殖能は対照細胞と同レベルであった。また、HCVに感染した細胞では、オートファジーの新規誘

導が抑制されていたことから、HCV は非定型的にオートファジーを制御していることが示唆された。

D. 考察

HCV は ATG13 および ATG14 非依存的にオートファジーを誘導していることが推測される。今後は、オートファジー経路の抑制因子である Rubicon のノックアウト Huh7 細胞を作製し、HCV の感染性に対する影響を検討する予定である。

E. 結論

1. 人工ヌクレアーゼを用いて ATG5、ATG13、および ATG14 のノックアウト Huh7 細胞を樹立した。
2. HCV は ATG13 や ATG14 非依存的にオートファジーを制御している。

F. 健康危険情報

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, and Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol* 2013;87:489-502
2. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, and 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, and 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, and Takehara T.

Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ 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, and 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, and 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、第86回日本生化学会シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、横浜、9月11-13日、2013
 2. Toru Okamoto, Shuhei Taguwa, Kohji Moriishi, and Yoshiharu Matsuura. Co-chaperones involved in the replication of hepatitis C virus, Protein Homeostasis & Viral Infection: Mechanisms to Therapeutics, Bethesda, USA, September 18-19, 2013.
 3. Yoshiharu Matsuura. Host factors involved in HCV propagation. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop "Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma : molecular basis and clinical links" Marsala, Italy, October 20-21, 2013.
 4. Yoshiharu Matsuura. Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, Infectious Diseases in Elderly Symposium, Izmir, Turkey, October 25-29, 2013.
 5. Yoshiharu Matsuura. Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus, The 3rd International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, Tainan, Taiwan,

- Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation, Tainan, Taiwan, November 16-17, 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、12月9日、2013
 7. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Takashi Motomura, Mai Shiokawa, Chikako Ono, Hiroto Kambara, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University of Pennsylvania, University Park, July 20-24, 2013.
 8. Toru Okamoto, Yukari Sugiyama, Chikako Ono, Sayaka Aizawa, Pham Duc Ngoc, Takahisa Kohwaki, Eiji Hirooka, Takasuke Fukuhara, Masahiro Yamamoto, and Yoshiharu Matsuura, Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
 9. Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Masami Wada, Chikako Ono, Toru Okamoto, and Yoshiharu Matsuura, Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 2013.
 10. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, and Yoshiharu Matsuura, Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells, 20th International Meeting on HCV and Related Viruses, Melbourne, October, 6-10, 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、11月10日-12日、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、11月10日-12日、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、11月10日-12日、2013
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

脂肪肝と肝細胞癌の発症機構の解析

研究分担者 小池和彦 東京大学消化器内科 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルスにより誘発される脂質代謝、糖代謝、鉄代謝などにおける異常が、ウイルス複製、肝炎、肝癌発生の病態において中心的役割を果たすことが示唆されてきた。今年度は、C型肝炎において代謝に起因する発癌メカニズムに関して、脂質代謝異常を中心に検討を行なった。StatinであるFluvastatin投与は、HCVコア蛋白発現トランスジェニックマウスにおいて肝脂肪化生成、中性脂肪の不飽和化を改善すること、ミトコンドリア膜形態異常を改善すること、更にミトコンドリア電子伝達系蛋白質のコア蛋白による減少をも改善した。C型肝炎およびNASH等の脂質代謝の深く関与する肝発癌において、statinは抑制的に働き、発癌予防に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

B型肝炎、C型肝炎、NASHのいずれにも共通する肝炎の病態として脂質代謝変化が存在することが広く知られ、肝発癌への関与が示唆されている。また肝発癌への酸化ストレスの関与に鉄代謝異常も存在する。この鉄代謝異常の解析、ならびに脂質代謝異常メカニズムの原因としてミトコンドリア機能変化を念頭に置きコレステロール代謝を中心に解析し、HCVコア蛋白発現トランスジェニックマウス（以下、Tg）を用いて、HMG-CoA reductase 阻害剤によるミトコンドリア機能異常改善について検討を行った。

B. 研究方法

HCVコア遺伝子発現Tgおよび対照マウス、オス3ヶ月齢に対し、それぞれ通常食と同カロリー同成分のFluvastatin (FLV) 配合食を3ヶ月投与後に安楽死させ、肝臓内の脂質量、分画、およびミトコンドリアの電子顕微鏡像、Western blottingによるミトコンドリア電子伝達系の蛋白量を検討した。

（倫理面の配慮）

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、個人情報厳格

に管理、保存する。実験動物に対する基準を遵守し実験を行った。

C. 研究結果

FLV投与によって、コア遺伝子Tgおよび対照マウスの体重、肝重量には変化がなかった。FLV投与によって、通常食を与えたHCVコア遺伝子発現Tgに認められた肝脂肪化（中性脂肪の増加）、肝臓中性脂肪の不飽和化（オレイン酸/ステアリン酸比、パルミトオレイン酸/パルミチン酸比は有意に改善した。HMGCRはFLVにより抑制された。肝内コレステロール量の低下に伴うと考えられるLDL-Rの発現増強が認められた。コア遺伝子Tgでは、FLVによりstearoyl-CoA desaturase (SCD)-1（不飽和化）が抑制された。脂肪酸合成抑制のnegative feedbackと考えられるSREBP-1cのmRNA上昇がみられた。HCVコア蛋白によって引き起こされる肝細胞のミトコンドリア外膜の形態異常と電子伝達系蛋白質の減少のいずれもが、FLV投与によって改善した。

D. 考察

Statinが直接ミトコンドリア構成脂質(cardiolipin)などの量、組成を制御し、HCVコア蛋白によるミトコンドリア形態異常、機能異常を改善している可能性が示唆された。

E. 結論

C型肝炎患者およびNASH、HBV患者へのstatinによる肝発癌抑制の可能性が示唆され