

た。

特になし。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2014 Jan 13. doi: 10.1002/ijc.28720. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24420733.
2. 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, Koike K, Karin M, Maeda S. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Jan 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24395807.
3. Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. *J Gastroenterol* 2013 Nov 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID:24258409.
4. 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. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24224477.
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. *Hepato 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:pii: 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. *Hepato 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 ;438(1):230-235. 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. *Hepato 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;57(7):935-942. 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 ;1305-1313. 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 liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell* 2013;155(2):384-396. 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. 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. 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. 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. 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.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

HCV 感染による肝線維化誘導の機構

研究分担者 鈴木哲朗 浜松医科大学 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）の感染に伴って肝臓の線維化が進行する。肝線維化は肝硬変、肝細胞癌の発症へ繋がることから、肝線維症の制御は不可逆的な肝不全を防ぐために非常に重要である。本研究では、HCV 感染による肝線維化誘導の分子機構を解析した。TGFbeta、特に TGFbeta2 の発現は HCV 感染量依存的に亢進すること、TGFbeta2 プロモーターの活性化は HCV Core～NS2 発現によって顕著に誘導されること、さらに、TGFbeta2 転写調節、Core～NS2 による転写活性誘導には肝特異的膜型転写因子 CREBH が関与することを見出した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)に対する有効な阻害剤の開発が進んでおりC型慢性肝炎患者からのウイルス排除が現実的になりつつある。しかしながら、HCVによる病態発症機序の解析は進んでいない。HCV感染によって誘発される肝臓の線維化が進行すると肝硬変、肝細胞癌の発症へ繋がることから、肝線維症の制御は不可逆的な肝不全を防ぐために非常に重要である。本研究では、慢性肝疾患に対する新たな治療法の実現に資するため、HCV感染からの肝線維化発症のメカニズムを解明することを目的とした。

B. 研究方法

HCVcc (JFH-1 または J6/JFH-1) 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 蛋白質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。

（倫理面への配慮）

すでに樹立された培養細胞株を使った研究であり倫理面の手続きは要しない。

C. 研究結果

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 または 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。

D. 考察

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。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。

E. 結論

1. HCV 感染また Core~NS2 発現によって TGFbeta2 発現が有意に亢進する。
2. 肝特異的膜型転写因子 CREBH が TGFbeta2 の転写調節及び HCV 発現による転写活性亢進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. Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Saito I, Suzuki T, Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA

expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. Sci Rep (in press).

2. 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).
3. 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).
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

HCV 感染症における IFN- λ 産生樹状細胞の意義

研究分担者 考藤達哉 国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター 肝疾患先進医療研究室長

研究要旨：HCV は種々の免疫細胞の機能異常を来し、持続感染を成立させる。免疫系の異常は、IFN 治療に対する抵抗性や、発癌、癌細胞の増殖にも寄与している。また、IL-28B(IFN- λ 3)の遺伝子多型 (SNP) が、HCV の自然排除や PEG-IFN α /Ribavirin 治療の効果に関与している。樹状細胞 (DC) は、HCV などのウイルスを感知し、I 型、III 型 IFN を産生することで、ウイルス排除に関与する。今年度は、BDCA3+DC の HCV 認識、IFN- λ 産生の分子機序を、PDC や MDC などの他の DC サブセットとの比較から明らかにすることを目的とした。非感染者から BDCA3+DC、PDC、MDC の各サブセットを分離し、*in vitro* 共培養の系で HCV 感染刺激に対する IFN 産生能を比較した。BDCA3+DC は HCVcc、HCV 複製肝がん細胞を認識して IFN- λ を産生し、PDC は HCV に対して IFN- α/β を産生することが明らかになった。また、HCV は CD81 を介して BDCA3+DC に侵入し、endosome の TLR3-TRIF によって認識され、IFN- λ が産生されることを明らかにした。IL28BSNP major の非感染者から分離した BDCA3+DC は、同 minor からの 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。以上の結果より、BDCA3+DC は HCV 感染症における主な IFN- λ 産生細胞であり、その制御が抗 HCV 免疫の活性化に重要であることが示唆された。

A. 研究目的

HCV は種々の免疫細胞の機能異常を来し、持続感染を成立させる。免疫系の異常は、IFN 治療に対する抵抗性や、発癌、癌細胞の増殖にも寄与している。また、IL-28B(IFN- λ 3)の遺伝子多型 (SNP) が、HCV の自然排除やペグインターフェロン+リビリン治療の効果に関与することが報告されている。HCV による免疫系攪乱の機序や IFN- λ の生物学的意義が明らかになれば、HCV 排除のための免疫制御方法を確立することが可能となる。本研究では、BDCA3+DC の HCV 認識、IFN- λ 産生の分子機序を、PDC や MDC などの他の DC サブセットとの比較から明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

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。

(倫理面への配慮)

本研究は国立国際医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C. 研究結果

BDCA3+DC は HCVcc、JFH-1-Huh7 との共培養で、多量の IFN- λ を産生した。一方、PDC は同刺激に対して多量の IFN- α/β を産生した。HCV は CD81 を介して BDCA3+DC に侵入し、endosome の TLR3-TRIF によって認識され、IFN- λ が産生されることが明らかになった。IL28BSNP major の非感染者から分離した BDCA3+DC は、同 minor からの 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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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
2. 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

3. 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

2. 学会発表

1. 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-λ 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
2. 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-λ producer in HCV infection. The Liver Meeting AASLD 64th Annual Meeting and Postgraduate Course, Washington, DC, USA, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に予定なし

HCV 感染による肝がん発症と変動分子

研究分担者：森石恆司 山梨大学医学部 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染は宿主細胞の代謝系に様々な影響を与えることが報告されており、その病態やウイルス複製が特定の脂質分子種に影響する。したがって、HCV感染によって引き起こされる脂質分子群全体の動態をとらえることは重要である。個々の分子の変動ではなく、複数の分子の変動を一まとめにアルゴリズム解析した場合、今までと違う規則性が得られることがある。本研究では、HCV感染による複数の脂質分子種の変化を独自の質量分析手法・アルゴリズムを用いて定量・解析し、HCV蛋白質発現あるいは感染による脂質組成変動に規則性があるかどうか検討した。サブゲノムレプリコン細胞とCure細胞、Coreトランスジェニックマウス(CoreTg)と野生型との比較で、主成分分析およびクラスター解析で、脂質領域で明らかな異なるパターンが確認された。以上のことから、全体の脂質成分分析によって解析することで、HCV感染および肝がんが予測できることが示唆された。

A. 研究目的

本邦の肝がんの約7-8割はC型肝炎ウイルス(HCV)感染に起因するとされ、先進国に多い高ウイルス量タイプのウイルス遺伝子型1の感染者が多く含まれる。C型肝炎患者および感染者は、世界で二億人、国内で約200万人と推定されており、急性感染から持続感染に移行し、慢性肝炎から肝硬変、そして肝細胞癌に至る。新規NS3プロテアーゼ抑制剤の登場により、8割程度の高い著効率が報告されているが、副作用や耐性ウイルスの出現、ウイルス排除後のがん発症などの問題から、今後も抗HCV剤の開発および新規C型肝炎療法の確立は必要と考えられる。

HCVはフラビウイルス科に属し、プラス鎖RNAゲノムを持つ。そのウイルスゲノムに単一の3000アミノ酸残基からなるポリプロテイン前駆体がコードされている。宿主およびウイルスプロテアーゼによってその前駆蛋白質が切断され、10個のウイルス蛋白質になる。C末端側2/3の領域に非構造蛋白質がコードされ、ウイルスゲノム複製に機能し、残りのN末端側にウイルス構造蛋白質をコードする領域がある。

HCVコア蛋白質はヌクレオキャプシド蛋白質として機能する他、発がんなどの病原因子として機能している。C型肝炎では脂肪肝、肝硬変

を経て、高率に肝細胞癌に至ることが知られており、コア蛋白質は脂肪化とがん化を誘導することが多数報告されている。

本年度は、個々の分子種の量的変化に着目しつつ、HCV感染による全体の脂質分子種の変化を独自の質量分析手法・アルゴリズムを用いて定量・解析し、HCV蛋白質発現あるいは感染による脂質組成変動に特徴的な規則性があるかどうか検討した。

B. 研究方法

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質発現

(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。

(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した。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山梨大学医学部倫理委員会規程に従って承認を得た。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、保存した。動物実験は、山梨大学動物実験規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。遺伝子組み換え実験は、山梨大学遺伝子組み換え実験安全管理規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。放射線及び放射性同位元素を扱う実験は、山梨大学総合分析実験センター放射線障害予防規程に従って、山梨大学学長の承認を得て行った。

C. 研究結果

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、レプリコン細胞間内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、CoreTg 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。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1 論文発表

1. 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.*, 12: 2537-2551, 2013
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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

8. 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

学会発表

1. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K. 20th International Symposium on Hepatitis C virus and related viruses. Melbourne, Australia, October 6-10., 2013
2. 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
3. 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
4. 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

5. 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
6. 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
7. 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
8. 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

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし

切除肝組織を用いた C 型肝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～

研究分担者 武富紹信 北海道大学大学院医学研究科・消化器外科学分野 I 教授

研究要旨： 脂肪酸代謝は C 型肝炎からの発癌への関与が予想されるが、詳細は不明である。これまでにわれわれは、肝細胞癌の切除組織の 2 次元電気泳動により、脂肪酸代謝関連酵素 FABP5 が幹細胞癌の悪性度マーカーになり得ることを報告した。本課題では、C 型肝炎細胞癌の初回肝切除症例(97 例)の切除組織を免疫染色(FABP5)し、陽性・陰性群の予後、臨床病理学的因子との関わりを解析した。FABP5 陽性群では生存および無再発生存期間が短縮し、累積生存における多変量解析では、FABP5 陽性が AFP-L3 を凌駕する予後予測因子であった。FABP5 が発癌および増殖、細胞運動をどのように修飾するかを明らかにするために、FABP5 の強制発現、ノックダウンした肝癌細胞株(HepG2, HLE, HLF)を作成し、機能解析を進めている。より正確な解析のために、上記の細胞株を用いた研究とともに切除肝組織の非癌部から HCV 陽性初代培養肝細胞を維持する系を作成した。培養中に細胞数が増加することはなかったが、肝細胞は 8 週間以上維持することができた。今後、HCV 陽性ヒト肝細胞を用いた線維化、癌化、ウィルスの動態、および、新規治療法の開発のために重要なツールになると考えられた。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスによる線維化、癌化の機構を理解するためには、C 型肝炎細胞癌の切除組織および臨床(患者)情報の精査が必要である。線維化の程度と発癌、癌悪性度(再発、転移)の関係や、非 C 型肝炎症例との比較、肝移植後の C 型肝炎再発と肝硬変、肝癌の発生、などから多くの情報が得られるはずである。

脂肪代謝の主要臓器である肝臓において、NASH、アルコール性肝炎、C 型肝炎では肝細胞への脂肪蓄積が認められる。肝再生に肝細胞の脂肪蓄積は必要な物質であるが、HCV の複製にも肝細胞の脂肪滴が利用される。C 型肝炎細胞癌にも脂肪変性が高頻度に認められる。C 型肝炎の肝細胞癌発癌・進展過程には脂肪酸代謝酵素の関与が予想されるが、その関連はほとんど解明されていない。本研究の最終目標である、“C 型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立”を実現するために、分担研究として以下の検討を行う。

目的 1) C 型肝炎感染肝細胞癌の悪性度に関わる臨床的、臨床病理学的、分子生物学的を解析し、肝切除後の予後に関与する因子を明らかにする。具体的には、C 型肝炎細胞癌組織

における脂肪酸代謝関連酵素 FABP5 の発現および臨床病理学的所見、予後、再発との関係を明らかにする。

目的 2) 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 を検討する。

- 1) 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、本研究班で同定された蛋白質の発現を組織レベルで検証する。
- 2) ヒト肝由来肝癌および肝細胞を使用してウイルス存在下での各種ストレスに対する反応を評価し得る細胞ソースを提供するシステムを構築する。

B. 研究方法

方法 1) 北海道大学消化器外科学 I で初回肝切除を受けた C 型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌 90 症例の切除肝(癌)組織を抗 FABP5 抗体で染色し、累積生存期間、無再発生存期間を検討した。また、累積生存について多変量解析を行った。

方法 2) C 型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌症例の切除組織検体、臨床情報を集積し、microRNA およびタンパク解析の準備を行っ

た。

方法3 切除肝組織をコラゲナーゼ灌流により分散し、肝細胞を初代培養した。

(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

結果1)

陽性(FABP5+)群では累積生存期間、無再発生存期間が有意に短縮した。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、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となることが明らかになった。

結果2)

利用し得る検体および臨床情報を集積した。今後、miRNA、タンパクを解析する予定である。

結果3)

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。

D. 考察

考察1) 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。

考察2)3) とくに無し。

考察4) 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。

E. 結論

1. 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。
2. 肝炎ウイルス感染切除肝組織から初代培養細胞を10週程度まで維持、培養することができた。収率、純度、ウイルス感染状態の維持、などを明らかにすることが出来れば、“C型肝炎の病態の解明と肝癌発症制御法の確立”に貢献し得る細胞ソースになるであろう。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor- κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb;35(2):272-81.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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)
 6. Kamiyama T, Yokoo H, Furukawa J, Kuroguchi 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
 7. Shirabe K, Motomura T, Takeishi K, Morita K, Kayashima H, Taketomi A, Ikegami T, Soejima Y, Yoshizumi T, Maehara Y. Human early liver regeneration after hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma: special reference to age. *Scand J Surg.* 2013 Jun 1;102(2):101-5.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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
 11. 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.
2. 学会発表
 1. 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
 2. 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
 3. 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, 嶋村 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
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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 glissonian 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
10. 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
 11. 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
12. 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

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

HCV 感染と酸化ストレス応答に関する研究

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）の感染に伴う酸化ストレスが肝細胞障害、肝線維化、肝脂肪化、代謝異常、肝癌などの病原性に深く関与すると考えられている。HCV感染に伴う酸化ストレスに対し、生体内には活性酸素などを無毒化する抗酸化蛋白質が生体防御機構として備わっているが、HCV感染による抗酸化蛋白質の発現動態の変化については未だ不明な点が多い。そこで、HCV感染による抗酸化蛋白質の発現動態への影響および病態生理学的意義を明らかにするために、HCV感染培養系を用い、Peroxioredoxin (Prx)の発現変化を解析した。HCV J6/JFH1 感染 Huh-7.5 細胞において Prx 1, 2, 3, 5 の蛋白質の著明な減少が認められた。また、HCV core 蛋白質を恒常的に発現する Huh-7 細胞では Prx 1 の半減期が短縮しており、蛋白質分解が促進されることが示唆された。また、HCV J6/JFH1 感染細胞では細胞内蛋白質リン酸化酵素 Akt が活性化されており、その下流のシグナル伝達について更に解析が必要であると考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の感染に伴う酸化ストレスが HCV による病原性発現に深く関与すると考えられている。HCV 感染に伴う酸化ストレスに対し、生体内には活性酸素などを無毒化する抗酸化蛋白質が生体防御機構として備わっているが、HCV 感染による抗酸化蛋白質の動態変化については未だ不明な点が多い。そこで、HCV 感染による抗酸化蛋白質の発現動態変化およびその病態生理学的意義を明らかにすることを目的とし、HCV 感染培養系を用い、Peroxioredoxin (Prx)への影響を解析した。

B. 研究方法

- 1) HCV J6/JFH1 株を Huh-7.5 細胞に感染させ、感染後 1-6 日に細胞を回収し、Prx 1-6 の発現をウエスタンブロット法にて解析した。陰性対照として非感染細胞を用いた。
- 2) Prx1 は HCV core と結合するユビキチンリガーゼの基質であることから、HCV core 蛋白質の有無で半減期を比較した。HCV core 蛋白質を恒常的に発現する Huh-7 細胞とコントロールプラスミドを導入した Huh-7 細胞を 50 μ g/mL の Cycloheximide を処理し、経時的に細胞を回収し、Prx1 の蛋白質量をウエスタンブロット法で比較した。
- 3) HCV J6/JFH1 株を Huh-7.5 細胞に感染させ、感染後 1-6 日に細胞を回収し、ウエスタンブ

ロット法で Akt, pAkt (S473), PTEN を解析した。

（倫理面への配慮）

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いない。

C. 研究結果

- 1) 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。
- 2) 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。
- 3) 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。

D. 考察

HCV J6/JFH1 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。

E. 結論

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。

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 *Morinda citrifolia* leaves and chlorophyll catabolites pheophorbide a and pyropheophorbide a, against hepatitis C virus. *Microbiology and Immunology*, in press.
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 *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species. *Microbiology and Immunology*, in press.
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*, in press.

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*, 10 (1):259, 1-9, 2013.
 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*, 126 (Pt9): 2014-26, 2013.
 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*, 58 (2): 555-63, 2013.
- ##### 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 α 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-aspartyl chlorin 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. 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 及び半合成誘導体 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.
 10. 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.
 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・登録状況**
特になし。

HCV コア蛋白質発現マウスにおける肝炎発症機構の解析

研究分担者 山本雅裕 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染によって引き起こされる慢性炎症が、ヒトにおける肝線維化と肝がん発症に強く関与している事が報告されているが、肝細胞へのHCV感染がどのようにして慢性炎症を引き起こしているのかは不明である。HCV蛋白質の中でもコア蛋白質を肝臓特異的に発現させたマウス(HCV コア発現マウス)では、高頻度に肝がんの発症が見られる事から、コア蛋白質がHCV感染に伴う肝がん発症の一因である事が示唆されているが、詳細なメカニズムは不明である。HCV コア発現マウスにおける慢性炎症とそれに伴う肝がん発症機構を明らかにするため、我々はコア発現肝細胞による免疫細胞への影響に着目し、解析を行った。その結果、HCV コア発現肝細胞は、非発現肝細胞に比べ、外的刺激後の細胞破砕液が免疫細胞をより強くする傾向が認められた。また、HCV コア蛋白質の過剰発現が小胞体ストレス応答を誘導する事が報告されていた事から、肝臓に非常に強く発現している小胞体ストレスセンサーのCrebHに着目し、その機能について遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。その結果、CrebHは肝臓において代謝酵素のCYP2B遺伝子群の発現に関与しており、それらの酵素による代謝副産物を介した致死的ショックを引き起こす場合がある事を示した。

A. 研究目的

HCV コア蛋白質を発現しているマウスでは、未発現マウスに比べ顕著に発がん率の増加が認められている。HCV コア蛋白質の機能として様々な報告がなされているが、HCV コア蛋白質による発がん機構の詳細は明確ではない。HCV感染による肝がん発症には、肝臓の慢性炎症が先立って誘導される事が知られている事から、我々はHCV コア蛋白質発現肝細胞が、非発現肝細胞に比べて免疫機構を活性化し、炎症反応を増幅することにより慢性炎症が引き起こされているのではないかと考えた。そこで、コア発現肝細胞によるマクロファージ活性化についての解析を目的とした。

また、酵母においてHCV コア蛋白質を過剰発現すると小胞体ストレスが誘導される事、コア蛋白質過剰発現により小胞体ストレスを感知する分子として知られているATF6が活性化する事が報告されていた事から、肝細胞でコア蛋白質が発現する事により小胞体ストレスが誘導され、その結果、慢性肝炎からの肝線維化が誘導されている可能性が暗示された。小胞体ストレスセン

サーの中で肝臓に強く発現している分子について探索を行った結果、CrebHが非常に強く肝臓に発現していた。CrebHは小胞体ストレスが誘導されると肝臓で急性期反応蛋白質やヘプシジンの発現を誘導し、急性期反応や体内鉄恒常性の維持に関与している事が知られているが、機能未知な部分が多い。我々はコア蛋白質発現マウスでの肝炎発症におけるCrebHの関与について解析するに当たり、まずCrebHの肝臓での新たな機能解析を目的とした。

B. 研究方法

HCV コア蛋白質発現マウスより単離した初代肝細胞を細胞質内二重鎖RNA、LPSまたはTNF-alphaで刺激した際の培養上清と細胞溶解液を、マウス骨髄由来マクロファージの培養上清に添加し、24時間後のマクロファージからのサイトカイン産生量について、ELISA法を用いて解析を行った。

また、CrebHの機能を解析するため、CrebH欠損マウスを作製し、薬物代謝に対するCrebHの機能についてマウスの生存率や薬物代謝産物量等について検討した。

(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、個人情報に厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

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 ウイルス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命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命的ショックが誘発される場合がある事を証明した。

D. 考察

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。

E. 結論

1. 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。
2. CrebH はスルピリン代謝副産物による致命的ショックの誘導に関与していた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Ohshima J, Lee Y, Sasai M, Saitoh T, Ma JS, Kamiyama N, Matsuura Y, Pann-Ghill S, Hayashi M, Ebisu S, Takeda K, Akira S, Yamamoto M. Role of the mouse and human autophagy proteins in IFN- γ -induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* (2014) In press.
2. Haldar AK, Piro AS, Pilla DM, Yamamoto M, Coers J. The E2-Like Conjugation Enzyme Atg3 Promotes Binding of IRG and Gbp Proteins to Chlamydia- and *Toxoplasma*-Containing Vacuoles and Host Resistance. *PLoS One.* (2014) 9:e86684.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. 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.

2. 学会発表

1. 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)

2. 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)
3. Yamamoto M 「Immunological interface between host and a protozoan parasite *Toxoplasma gondii*」 FORUM GRADUATE SCHOOLS INFECTION & IMMUNITY BIOLOGIE-MEDECINE (Geneva, Switzerland, June 28, 2013)
4. 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)
5. 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)

H. 知的所有権の出願・登録状況 特になし