

201321011A

# B型肝炎ウイルスの 完全排除等、完治を目指した 新規治療法の開発に関する包括的研究

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：森屋 恭爾

東京大学大学院医学系研究科 感染制御学 教授

平成26（2014）年3月

平成 25 年度厚生労働科学研究費補助金  
B 型肝炎創薬実用化等研究事業

「B 型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した新規治療法の開発に関する包括的研究」

平成 25 年度 班の構成

森屋 恭爾	東京大学医学部	感染制御学	教授
斎藤 泉	東京大学医科学研究所	遺伝子治療学	教授
小池 和彦	東京大学医学部	消化器内科	教授
國土 典宏	東京大学医学部	肝胆膵外科・人工臓器移植外科	教授
鈴木 哲朗	浜松医科大学医学部	感染症学	教授
北川 雅敏	浜松医科大学医学部	分子生物学講座	教授
朝比奈靖浩	東京医科歯科大学	肝臓病態制御学講座	教授
森石 恆司	山梨大学医学部	微生物学	教授
田川 陽一	東京工業大学大学院生命理工学研究科		准教授
福原 崇介	大阪大学微生物病研究所	分子ウイルス分野	助教

## 目 次

### I. 総括研究報告

B 型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した  
新規治療法の 開発に関する包括的研究

森屋 恭爾 ..... 1

### II. 分担研究報告

1. B 型肝炎ウイルス転写複製機構の解析による治療法の開発

齋藤 泉 ..... 21

2. B 型肝炎ウイルス複製の miRNA による制御

小池 和彦・大塚 基之..... 24

3. 非 B 非 C 肝に発生した肝細胞癌に対する肝切除後の長期成績

國土 典宏..... 31

4. HBV の遺伝子発現制御機構の解析

スタチンによる抗酸化、抗炎症因子発現誘導の解析

鈴木 哲朗..... 33

5. HBV 複製に関与する長鎖ノンコーディング RNA の同定と

治療への応用

北川 雅敏..... 36

6. 肝細胞分化と HBV 増殖機構の解明および HBV 蛋白の機能解析に

関わる研究

朝比奈 靖浩 ..... 39

7. HBV 産生抑制物質の探索と感染による細胞内変化

森石 恆司..... 43

8. HBV の in vitro 感染・増殖系の確立と

抗ウイルス薬スクリーニング系への応用

田川 陽一 ..... 46

9. B 型肝炎ウイルスの持続感染に関与する宿主因子の同定

福原 崇介..... 50

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 53

IV. 研究成果の刊行物・別刷..... 65

平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(B 型肝炎創薬実用化等研究事業)

## B 型肝炎ウイルスの完全排除等、完治を目指した 新規治療法の開発に関する包括的研究

### 総括研究報告書

研究代表者 **森屋 恭爾**  
東京大学医学部感染制御学教授

#### 研究要旨

現行の治療薬とは作用機序の異なる HBV 阻害剤、特に感染細胞の核内 HBV DNA を排除できる新規薬剤、HBV 肝発がん抑制剤等の開発は喫緊の課題である。HBV 阻害剤の探索を開始するとともに、新規創薬標的を見出すため、HBV 複製及び病態発現機構の解析、更に治療技術、実験モデルの開発を行い以下の成果を得た。1) HBV 感染ヒト肝臓キメラマウスへの statin 投与によって副作用なく HBV 量を減少させる可能性を示した。statin が肝がん細胞株で炎症因子、抗酸化因子の発現を誘導することを見出した。2) 阻害剤スクリーニングから、HBV 転写活性を選択的に阻害する海綿抽出物質を見出した。3) enhancer II/basal core promoter 領域に結合する新たな HBV 転写制御因子を同定した。4) LRPPRC が HBV 感染性を正に制御すること、HBV RNA の核から細胞質への輸送を抑制することを見出した。5) HBV により発現上昇する lncRNA を 6 種、発現低下するもの 6 種を見出した。泌尿器系腫瘍の発生と関連する lncRNA UCA1 が著明に発現上昇することも見出した。6) HBV の preS2 領域配列が、宿主の microRNA の一種で癌抑制機能を持つ let-7 を吸着し その機能を攪乱する可能性を示した。7) HBV 感染によって培養細胞で不完全な融合による脂肪滴の肥大が認められた。8) ヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞株を用いた細胞分化度を調節し得る培養系を構築し、HBV の強制発現系での HBs 抗原の産生を確認した。9) HepG2 または HuH-7 細胞を用いた in vitro 肝組織モデルへの HBV 遺伝子導入により HBV の高発現を見出した。ヒト ES/iPS 細胞を用いた同モデルでは HBV 感染感受性を明らかにした。10) HBV ゲノムをタンデムに 12 コピー有する mulcos また AdV 等を用いて HBV ゲノム複製検出システムの構築を行った。11) 非 B 非 C 型肝炎症例で HBc 抗体陽性例が陰性例に比較して予後が不良という結果は得られなかった。

#### 研究分担者

齋藤 泉 東京大学医科学研究所 遺伝  
子治療学 教授

小池 和彦 東京大学医学部 消化器内科  
教授

國土 典宏 東京大学医学部 肝胆膵外科・人  
工臓器移植外科 教授

鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 感染症

#### 学 教授

北川 雅敏 浜松医科大学医学部 分子生  
物学講座 教授

朝比奈靖浩 東京医科歯科大学 肝臓病態  
制御学講座 教授

森石 恆司 山梨大学医学部 微生物学  
教授

田川 陽一 東京工業大学大学院生命理工

学研究科 准教授

福原 崇介 大阪大学微生物病研究所 分子ウイルス分野 助教

#### A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) の持続感染者は全世界で三億人以上とされ、慢性肝炎から肝硬変、肝がんへ到る連鎖に苦しめられている。治療薬として核酸アナログ製剤、インターフェロンなどが使われているが、薬剤の作用機序が限られていること、ウイルス DNA の完全排除は困難なこと、薬剤耐性ウイルスの出現などの問題があり、根治療法は確立されていない。現行の治療薬とは異なる作用機序を有する阻害剤、特に感染細胞の核内 HBV DNA を排除できる新規薬剤、HBV 肝発がん抑制剤等が開発されれば、HBV キャリアからの肝不全、肝がんの発生を防ぎ、キャリア状態の解消に繋がる。

本研究では、抗 HBV 薬スクリーニング、マウスモデルでの評価を通じて新規治療薬候補の取得を目指す。また、HBV DNA の複製制御、遺伝子発現調節の分子機構、non-coding RNA による HBV 複製制御、HBV 複製における肝細胞分化レベルの関与等を明らかにし新規創薬標的、戦略を見出す。HBV により発現変動する non-coding RNA の同定と機能解析、HBV タンパク質-宿主因子相互作用解析を行い、病態発現機構解明へ繋げる。さらに、高機能肝組織培養系を駆使し新たな HBV 増殖モデルを作出し、HBV 複製細胞選択的な遺伝子治療用アデノウイルスベクターを開発する。また、HBV 関連症例の肝切除等手術後の補助化学療法に資する臨床研究を行う。

#### B. 研究方法

##### 1. 阻害剤の探索、評価

動物モデルでの評価には、ヒト肝細胞キメラ

マウス及び HBx 遺伝子発現トランスジェニックマウスを用いた。マウスへの投与に伴う HBV 発現量また癌関連遺伝子発現の変動を解析した。遺伝子型 C (CAT) の core promoter/enhancer 領域遺伝子を PCR で増幅し pGL2 に組み込み、ルシフェラーゼレポータープラスミドを作製した。このレポータープラスミドを組み込んだ細胞株を樹立し阻害剤スクリーニングに用いた。

##### 2. HBV 複製増殖機構の解析

HBV Enhancer (Enh) II/Basal core promoter (BCP) DNA 配列を末端ビオチン化修飾の形で合成した。これをヒト肝がん細胞株 HuH-7 の核抽出物と混和し、Factor Finder kit を用いて DNA 結合分画を調製した。この分画をトリプシン処理によりペプチド化した後、LC-MS/MS 解析によって Enh II/BCP 結合タンパク質を同定した。HBV 遺伝子型 A (Ae), B (Bj56) のゲノム DNA から core promoter/enhancer 領域をルシフェラーゼプラスミドへクローン化した。転写活性は dual luciferase assay で測定した。細胞分化度の異なる細胞における HBV 複製系を樹立するため、ヒト肝細胞及びヒト肝幹・前駆細胞等を用いた。

HBV 複製、持続感染に関与する宿主因子の解析として、細胞の核または膜面分を調製した後、SILAC 法によって HBV 感染によって発現変動するタンパク質を網羅的に探索し、遺伝子ノックダウンによる HBV 発現変化を解析した。

##### 3. HBV 持続感染、病態発現機構の解析

HBV ゲノム複製 Huh-7 細胞を用いて HBV による長鎖ノンコーディング (lnc) RNA の発現変動を定量 RT-PCR 及びマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。

数種類の HBV RNA と宿主 microRNA との相同性を in silico 解析し、HBV RNA と相互作用する可能性の高い宿主 microRNA を抽出し、その

機能変化をHBV配列発現下でのレポーターアッセイで、また標的タンパク発現をウェスタンブロット法で解析した。

HBVを持続産生するHepG2.2.15細胞および親株のHepG2細胞の細胞内微細構造を透過型電子顕微鏡によって解析した。

#### 4. 新規治療技術、実験モデルの開発

EHSゲル上に形成した血管内皮細胞の管腔ネットワークにヒト肝癌細胞株(Hep G2またはHuH-7)、HBV遺伝子を導入した持続発現細胞株(Hep G2.2.15, HuH-HB-Ae)、または、ヒトES/iPS細胞から分化誘導した肝細胞系譜細胞を播種して肝組織様構造を構築した。

HBVゲノムの1.2倍長のSコード領域にPol発現には影響を与えないように点変異を加えたS変異体(kS)の1.2倍長を持つプラスミドを構築した。kSを単独でもつプラスミド(1.2倍長-kS)、CMVプロモーターからkSを発現するプラスミド(CMVpro-kS)及びkSの1.2倍長DNAを12コピータンデムで持つ40~50kbのコスミド(multicopy-containing cosmid: mulcos)を定法通りに作製した。またCMVpro-kSを挿入したアデノウイルス(AdV)も定法通りに作製した。

#### 5. 肝細胞癌症例に関する臨床的解析

1997年から2011年に肝切除手術を行った肝細胞癌患者1486例のうち初発でAblationなどの前治療を行っていない682例を対象とした。(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、個人情報等を厳格に管理、保

存する。

動物実験にあたっては、当該研究機関の動物実験規程に従い承認を得た上で実施した。実験動物に苦痛を与えることのないよう配慮した。

#### C. 研究結果

##### 1. 阻害剤の探索、評価

HBV感染ヒト肝臓キメラマウスへのstatin投与によって、副作用なくHBc抗原量が減少する事を見出した。statinが作用するHBV増殖関連宿主因子の同定、作用機序の検討を開始した。HBV肝発癌モデルにおいてHBx蛋白によって発現変化する宿主蛋白群のなかで、p53関連発癌タンパク質等の複数因子がstatin投与によって正常化されることを見出した。8種類のstatin (Rosuvastatin, Atorvastatin, Compactin, Fluvastatin, Lovastatin, Pitavastatin, Pravastatin, Simvastatin)による抗酸化、抗炎症因子の発現誘導効果を解析した。HBV複製細胞に各statinを添加し3日後の細胞内Heme oxygenase 1 mRNAを測定したところ、Fluvastatin, Pravastatinで有意な発現上昇が認められた。同様にGlutamate cysteine ligaseの発現を調べたところ、Atorvastatin, Fluvastatin, Pitavastatin, Simvastatinで有意な発現上昇が認められた。

抗HBV活性を示す化合物を海洋動物抽出物ライブラリーから探索した。コアプロモーター活性を抑制する活性を示す化合物スクリーニングを行ったところ、細胞増殖に影響せず、プロモーター活性を抑制する抽出物として、*Liosina*属(種未同定)の海綿動物からの画分を見出した。さらに、海洋動物抽出物由来252画分を探索した結果、4画分ヒットし、そのうち2画分の主成分がPolybrominated diphenyl ether (PBDE)であった。PBDEおよびその誘導

体 3 化合物のウイルス粒子産生に対する影響を、HepG2. 2. 15 細胞を使って解析した。PBDE と一つの誘導体はウイルス産生を抑制したが (EC<sub>50</sub> が数 μM)、ともに毒性 CC<sub>50</sub> が 10-20 μM を示し、毒性が高かった。より有効な化合物探索と高ヒット率を期待して、HepG2. 2. 15 細胞からのウイルス産生抑制する活性を指標に、48 画分スクリーニングし、4 画分がヒットした。

## 2. HBV 複製増殖機構の解析

質量分析によって同定した HBV Enh II/BCP 結合タンパク質群について、遺伝子発現との関連が考えられるものを選び各因子に対する siRNA を用いて HBV プレゲノム転写活性への影響を調べた。その結果、ノックダウンによって HBV 転写活性が有意に低下するもの 2 因子を見出した。そのうちの 1 つ ACIN1 はノックダウンによって HBV 遺伝子型 A, B の転写活性は 40% 程度まで低下した。また、HBV ゲノム複製細胞の HBc 抗原産生もノックダウンによって低下することを確認した。

SILAC 法により核内で発現上昇した因子を 9 種類、減少した因子を 32 種類同定した。また、膜画分でも変動した因子を 40 種類同定した。2 次スクリーニングとして HepG2. 2. 15, T23 および YE12 細胞を用いて、HBV 感染による遺伝子発現変動を検討し、それぞれの細胞で同じ発現パターンを示す因子として 20 種類の宿主因子を同定した。それらの因子を標的とした shRNA を作製し二次スクリーニングを行った。LRPPRC をノックダウンした細胞では、細胞内および上清中のコア関連 HBV-DNA 量が有意に低下していた。HepG2. 2. 15 および 1. 28 倍長の HBV-DNA を導入した細胞において、LRPPRC の発現抑制によって、核内の pregenomic RNA の量は増加し、細胞質内で減少することが明らかとなった。以上の成績より、LRPPRC は pregenomic RNA の輸送を介し、HBV の感染性を正に制御している

ことが示唆された。

ヒト iPS 細胞をマトリゲル上で培養し、activin-A、bFGF・hBMP-4 および hHGF を添加し、それぞれ未分化内胚葉細胞、肝幹前駆細胞および成熟肝細胞各段階への分化誘導を試み、細胞分化度を調節しうる培養系を確立した。ソーティングを繰り返すことで、より純度の高い肝細胞様細胞を得た。本細胞で HBV レセプターの発現を確認した。1. 24 倍長の HBV ゲノムを持つベクターを用い、強制発現系により、HBs 抗原の産生を確認した。

## 3. HBV 持続感染、病態発現機構の解析

HBV により発現変動する lncRNA をマイクロアレイで解析し、RT-PCR で確認した結果、著明な発現上昇を示す 6 種の lncRNA (UHGI-6)、発現低下を示す 6 種 (DHGI-6) を見出した。一方で、泌尿器系腫瘍の発生と関連する lncRNA UCA1 が著明に発現上昇することも見出した。

宿主 microRNA の一種でがん抑制機能を持つ let-7 が HBV preS2 領域と相同性を有することを見出した。let-7 の機能を評価するためのレポーターと、genotype C 由来の HBV の preS2 mRNA を発現するコンストラクトを用い、HBV preS2 mRNA 存在下では let-7 の機能が損なわれることを確認した。さらに、let-7 の本来の標的因子である癌遺伝子 LIN28B の蛋白発現量が HBV preS2 mRNA 存在下では増強することを見出した。この効果は HBV preS2 の let-7 認識配列に変異を入れると見られないこと、let-7 を過剰発現するとレスキューされることから、HBV preS2 mRNA が let-7 の機能を抑制するためと考えられた。

HBV タンパク質発現、複製による脂質成分変化を Probe electrospray ionization 法によって質量分析し、トリアシルグリセリド領域に明らかな変動が認められた。その脂質変化による微細構造への変化を解析するために、透過型電

子顕微鏡により細胞内超微細構造を観察した。HepG2. 2. 15 細胞で、HepG2 細胞で見られない不完全な融合体の脂肪滴の集合体が見られ、病態あるいはウイルス複製に重要な現象と考えられた。

#### 4. 新規治療技術、実験モデルの開発

HepG2 または HuH-7 細胞を用いた *in vitro* 肝組織モデル (IVL<sup>Hep G2/HuH-7</sup>) において、肝特異的遺伝子発現の向上や細胞極性に関わるトランスポーターが機能していることを確認した。さらに、各細胞株に HBV 遺伝子を導入した持続発現細胞株 (Hep G2. 2. 15, HuH-HB-Ae) を用いた IVL<sup>Hep G2. 2. 15/HuH-HB-Ae</sup> では、平面上の共培養に比較し HBV 遺伝子の発現、ウイルス粒子や抗原タンパク質の培地中への放出レベルが上昇していたが、感染は確認できなかった。次に、ヒト ES/iPS 細胞を用いて同様に、IVL<sup>ES/iPS</sup> を構築した。IVL<sup>ES/iPS</sup> は培養とともに肝特異的遺伝子発現の上昇および肝特異的代謝機能を獲得していた。さらに、HBV レセプターとして知られる Ntcp の遺伝子発現が肝癌細胞株ではほとんどなかったが、IVL<sup>hiPS</sup> においては非常に強く 2 週間程度維持されていた。IVL<sup>hiPS</sup> に HBV 遺伝子を導入したところ、細胞内 HBV 遺伝子発現および培養上清中への HBV 粒子が放出しており、HBV の増殖が可能であることを確認した。さらに、IVL<sup>hiPS</sup> に HBV を感染させたところ、細胞内で HBV の増殖および HBV 粒子の細胞外へ放出など HBV が感染させることに成功した。

HBV ゲノムそのもの、プレゲノム転写効率を上昇するために CMV プロモーターを応用したもの、HBV ゲノムをタンデムに 12 コピー有する *mulcos* 及び AdV を用いて HBV ゲノム複製検出システムの構築を行った。その結果、HBV ゲノムの 1.2 倍長を有するプラスミドでは HBV ゲノム複製は非常に非効率的でサザン法による検出は困難であったが、CMV プロモーターや

*mulcos* を用いることにより、HBV ゲノム複製過程で出現する不完全環状二本鎖 DNA (RC)、直鎖状二本鎖 DNA (dsL) 及び cccDNA フォームの検出に成功した。また、CMV プロモーターから HBV ゲノムの 1.2 倍長を発現する AdV も効率的に HBV ゲノム複製の検出が可能であった。

#### 5. 肝細胞癌症例に関する臨床的解析

B 型肝炎、C 型肝炎、非 B 非 C 型肝炎各症例群別の生存期間や無再発生存期間には差を認めなかった。非 B 非 C 型かつ HBc 抗体陽性 41 例の無再発生存率は陰性例 101 例に比較して有意に良好であった。しかし、これを非 B 非 C かつアルコール多飲歴のない 90 例について限定して解析したところ、HBc 抗体の有無による予後の差は認められなかった。

#### D. 考察

##### 1. 阻害剤の探索、評価

キメラマウスモデル実験系で statin による HBV 発現抑制作用が示唆された。阻害作用メカニズムの解明により創薬開発の手掛かりとなりうる。また、HBV により発現が亢進する増殖関連遺伝子群が statin によって発現抑制されることから statin による肝発癌抑制の可能性が期待される。一方、Fluvastatin 等の statin によって、抗酸化、抗炎症因子の発現が HBV 複製細胞で確かに誘導されることが示された。今後、肝障害動物モデルで statin による細胞保護作用が認められるか明らかにしたい。

抗 HBV コアプロモーター活性やウイルス産生に対して阻害活性を示す化合物を含む海綿動物の抽出物が存在することが分かったので、今後も海洋動物抽出物ライブラリー等のスクリーニングを継続する。

##### 2. HBV 複製増殖機構の解析

HBV Enh II/BCP 領域は、プレゲノム RNA、



HBc 抗原の発現に必須であるだけでなく、HBV 関連肝発がん例でこの領域の変異が蓄積することから癌化にも関与すると考えられている。本年度、Enh II/BCP 結合し HBV 転写活性を正に制御する因子として ACIN1 (Apoptotic Chromatin Condensation Inducer 1) を同定した。このタンパク質は、caspase 3 で活性化されることによりクロマチン濃縮に働く他に splicing-dependent multiprotein exon junction complex を構成することが知られている。HBV 転写制御における分子機構を明らかにしたい。

LRPPRC は、pregenomic RNA の輸送を介して HBV の感染に関わることが示唆された。今後は LRPPRC のノックアウト細胞を樹立して、その機能をより詳細に解析するとともに、細胞毒性を検討し、創薬標的になりうるかの検討を進める。また、より効率の良い HBV 複製系も樹立されつつあるため、再度 SILAC 法で Screening を行い、新たな宿主因子の同定を試みる。

ヒト iPS 細胞由来肝幹・前駆細胞株を用いた細胞分化度を調節し得る培養系を構築し、HBV の強制発現系での HBs 抗原の産生を確認した。本系を用いた HBV 培養・増殖系を確立し、細胞分化度の変化が HBV ライフサイクルに与える影響の解析することは、従来の薬剤開発とは視点を異にする細胞分化機構を標的とした新規治療の創出に新たな知的・技術的基盤を確立するためには有用である。

### 3. HBV 持続感染、病態発現機構の解析

HBV 複製により著明な発現上昇を示す 6 種の lncRNA (UHG1-6)、発現低下を示す 6 種 (DHG1-6) を見出した。機能未知の lncRNA UHG1-6 および DHG1-6 は HBV ゲノムの複製制御に関与している可能性が高い。今後は、肝炎、肝癌患者における発現変動を解析し検証する。一方、これら lncRNA のノックダウンおよび過剰発現による

HBV 複製や ccc DNA 形成への影響を解析する。以て、これら lncRNA の機能および発現制御機構を明らかにし、それを阻害する分子をスクリーニングし、lncRNA を分子標的とした全く新しい治療薬の創成が可能と考えられる。

HBV の preS2 領域の mRNA 塩基配列が、宿主の microRNA の一種で癌抑制機能を持つ let-7 を吸着しその機能を攪乱する結果、肝癌でもその重要性が報告されている癌遺伝子 LIN28B の発現を増強することを確認した。これは、HBV の cccDNA から転写される preS2 mRNA 領域の存在が細胞癌化に関与していること、「HBs 抗原量が癌化と相関する」と近年報告されているが、実は抗原蛋白量ではなく HBV mRNA 量はその病態の本体である可能性を示唆するものである。来年度以降、更にこれらの RNA を発現した transgenic mouse を解析しウイルス RNA の存在による宿主恒常性の攪乱機構とその対処法を検討する。

持続的に HBV 産生する Hep2. 2. 15 細胞内の脂肪滴は有意に大きく、不完全な融合が見られ、脂肪滴形成に異常が見られた。脂肪滴の制御がウイルス複製・産生と関連があることが示唆された。

### 4. 新規治療技術、実験モデルの開発

IVL<sup>肝細胞株</sup> 培養系では HBV DNA 複製や抗原タンパク質産生が IVL 構築しなかった場合に比べて有意に高かったことは、IVL 構築による細胞内の特異的な肝機能が活性化されたことが要因であると思われ、IVL 構築の重要性が指摘できた。次に、ヒト ES/iPS 細胞を用いて同様に、IVL<sup>ES/iPS</sup> を構築した。この IVL<sup>ES/iPS</sup> では、個体における肝組織構築と同じようなプロセスを経ることにより、肝細胞特異的な極性シグナルが発生し、NTCP の発現の上昇を得ることができたと思われる。

検出が困難であった複製した HBV ゲノムを

細胞の総 DNA を用いた Southern 法により検出することに成功した。CMV プロモーターで 1.2 倍長-kS を発現させることでプレゲノム量が上昇した結果、複製ゲノムの検出が可能になった。また今回 CMVpro-kS と同程度の複製 HBV ゲノム検出が可能であった mulcos-kS のトランスフェクションした重量あたりの HBV ゲノム数は、ベクターバックボーンが多くを占める 1.2 倍-kS と比べると 2 倍程度にすぎないが、1 つの細胞に確実に 12 コピーの HBV ゲノムを導入可能なシステムであると言える。この mulcos-kS では HBV 本来のプロモーターからの HBV ゲノム複製の検出が可能であり、HBV ゲノム複製研究には有用性が高いと考える。また、AdV は肝臓細胞に高い導入効率を示すことから、HBV ゲノム複製を検出するために非常に有用なツールであり、HBV ゲノム複製効率も高かった。

#### 5. 肝細胞癌症例に関する臨床的解析

近年、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) や非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の増加に伴い、非 B 非 C 肝に発生する肝細胞癌は増加傾向にあると報告されている。しかし、非 B 非 C 肝の一部には B 型肝炎への既感染症例が含まれており、HBcAb 陽性例の予後については不明な点が多い。肝細胞癌に対する肝切除の成績をもとに、肝炎ウイルスの抗原・抗体別の予後を解析した。nBnC 症例の 3 分の 1 にはアルコール多飲歴を認め、NASH や NAFLD など HBV, HCV 肝炎症例とは異なった背景が存在すると考えられる。従って、HBcAb の意義については非ウイルス性肝障害の因子を除いて考慮しなければならない。今回の検討では B 型肝炎の既感染の意義は限定されたものであると考えられた。

#### E. 結論

マウスモデル実験系で statin による HBV 発現

抑制作用が示された。HBV 複製細胞系、レポーターアッセイで阻害剤の探索を行い候補物質を見出した。HBV 複製機構、HBV タンパク質発現によって変動する宿主因子に関する解析、更に新規技術、実験モデルの開発に新たな知見を得た。

#### F. 健康危険情報

問題なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nguyen T, Xu J, Chikuma S, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, Koike K, Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, Kobayashi M. Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models. *Int Immunol*. 2014 Mar 15. PMID:24569264
2. 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. *Hepatol Res*. 2013 Nov 14. doi: 10.1111/hepr.12275. PMID:24224477
3. Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. *Int J Cancer*. 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547 PMID:24174293

4. Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, Koike K. High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. **Clin Infect Dis**. 2013 Oct;57(7):935-42. doi: 10.1093/cid/cit348. Epub 2013 May 23. PMID:23704123
5. Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, Saito I, Suzuki T and Kanegae Y. Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication. *Scientific Rep.*, 2013, 3, 3575.
6. 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
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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. **Hepatology** 2013 Oct 11. doi: 10.1111/hepr.12258. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24125181.
11. 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.
12. 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. **Hepatology Res** 2013 Aug 14. doi: 10.1111/hepr.12221. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23941604.
13. Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, Koike K. Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression. **Biochem Biophys Res Commun** 2013 Jul 23. doi:pil: S0006-291X(13)01224-2. 10.1016/j.bbrc.2013.07.064. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23891753.
  14. 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. **Hepatology Res** 2013 Jul 11. doi:10.1111/hepr.12203. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23841664.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Mikami S, Sato M, Uchino K, Arano T, Enooku K, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Matsuyama Y, Omata M, Ohtomo K, Koike K. CT with hepatic arteriography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial. **Am J Gastroenterol** 2013 Apr 30. doi: 10.1038/ajg.2013.109. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23629602.
  19. 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
  20. 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- $\alpha$  and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1. **Hepatology Res** 2013;43(10):1005-1012. PubMed PMID: 23356977.

21. He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalapour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziaepostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. **Cell** 2013;155(2):384-396. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.031. PubMed PMID: 24120137.
22. Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Kondo Y, Akanuma M, Yoshida H, Koike K. Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs. **Sci Rep** 2013 Sep 24;3:2739. doi:10.1038/srep02739. PubMed PMID: 24061441.
23. 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.
24. Koike K. The oncogenic role of hepatitis C virus. **Recent Results Cancer Res** 2014;193:97-111. PMID: 24008295.
25. 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.
26. Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, Akanuma M, Kang YJ, Yoshida H, Otsuka M, Koike K. The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice. **Sci Rep** 2013 Aug 30;3:2553. doi: 10.1038/srep02553. PubMed PMID: 23989853.
27. 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.
28. 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.
29. 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, Yatomiyama 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
30. Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Otomo K, Omata M, Yoshida H, Koike K. Frequency, risk factors and survival associated with an intrasubsegmental recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. **PLoS One** 2013 Apr 12;8(4):e59040. doi: 10.1371/journal.pone.0059040. Print 2013. PubMed PMID: 23593129; PubMed Central PMCID: PMC3625228.
  31. Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the mica promoter which regulates mica expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. **PLoS One** 2013 Apr 11;8(4):e61279. doi: 10.1371/journal.pone.0061279. Print 2013. PubMed PMID: 23593449; PubMed Central PMCID: PMC3623965.
  32. 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.
  33. 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.
  34. 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- $\kappa$ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. **Hepatology** 2013;57:162-170. PMID: 22898998.
  35. Shindoh J, Hasegawa K, Matsuyama Y, Inoue Y, Ishizawa T, Aoki T, Sakamoto Y, Sugawara Y, Makuuchi M, Kokudo N. Low hepatitis C viral load predicts better long-term outcomes in patients undergoing resection of hepatocellular carcinoma irrespective of serologic eradication of hepatitis C virus. **J Clin Oncol** 2013; 31:766-73.
  36. 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).
  37. 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).
  38. 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.
  39. 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.
40. 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- $\beta$  type I receptor. Sci Rep 3; 3243, 2013.
41. 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.
42. 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.
43. Uchida, C., Hattori, T., Takahashi, H., Yamamoto, N., Kitagawa, M., Taya, Y.: Interaction between RB protein and NuMA is required for proper alignment of spindle microtubules. Genes Cells, doi: 10.1111/gtc.12119 in press.
44. Miyazaki, S., Kikuchi, H., Iino I., Uehara, T, Setoguchi, T., Fujita, T., Hiramatsu, Y., Ohta, M., Kamiya, K., Kitagawa, K., Kitagawa, M., Baba, S., Konno, K.: Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts. Int J Cancer, doi: 10.1002/ijc.28686 in press.
45. Kotake, Y., Ozawa, Y., Harada, M., Kitagawa, K., Niida, H., Morita, Y., Tanaka, K., Suda, T. and Kitagawa, M.: YB1 binds to and represses the p16 tumor suppressor gene. Genes Cells 18: 999-1006, 2013.
46. Kitagawa, M., Kitagawa, K., Kotake, Y., Niida, H. and Ohhata, T.: Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. Cell Mol Life Sci. 70: 4785-4794, 2013.
47. Suzuki, S., Ohashi, N. and Kitagawa, M.: Roles of the Skp2/p27 axis in the progression of chronic nephropathy. Cell Mol Life Sci. 70: 3277-3289, 2013.
48. Yutaka Yasui, Atsushi Kudo, Masayuki Kurosaki, Shuya Matsuda, Masaru Muraoka, Nobuharu Tamaki, Shoko Suzuki, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Kotaro Matsunaga, Hiroyuki Nakanishi, Kaoru Tsuchiya, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Shinji Tanaka, Yasuhiro Asahina, Nobuyuki Enomoto, Shigeki Arii, Namiki Izumi. Reduced organic anion transporter expression is a risk factor for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients: A propensity score matching study. Oncology 86:53-62, 2014.
49. Kaoru Tsuchiya, Yasuhiro Asahina, Nobuharu Tamaki, Yutaka Yasui, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura, Masayuki Kurosaki, Nobuyuki Enomoto, Namiki Izumi. Risk factors for exceeding the Milan criteria after successful radiofrequency ablation in patients with early stage hepatocellular carcinoma. Liver Transplant 2013 in press.
50. Nobuharu Tamaki, Masayuki Kurosaki, Shuya Matsuda, Masaru Muraoka, Yutaka Yasui, Shoko Suzuki, Takanori Hosokawa, Ken

- Ueda, Kaoru Tsuchiya, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi. Non-invasive prediction of hepatocellular carcinoma development using serum fibrosis marker in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2013 in press
51. Sato A, Sata M, Ikeda K, Kumada T, Izumi N, Asahina Y, Osaki Y, Chayama K, Kaneko S, Sakai A, Onji M, Hiasa Y, Omura T, Ozeki I, Yokosuka O, Shiina S, Itsubo M, Nishiguchi S, Hirano K, Ide T, Sakisaka S, Yamasaki T, Hidaka I, Tanaka M, Kim SR, Ichida T. Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan. *Internal Medicine* 52: 2701-2706, 2013.
52. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N.  $\alpha$ -fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 58:1253-1262, 2013. doi: 10.1002/hep.26442.
53. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. Genetic variation near interleukin 28B and the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013 Jul 17.
54. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* 2013; 43: 1-34.
55. Tsuchiya K\*, Asahina Y\*, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N.\* These authors contributed equally to this study. Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 120:229-237, 2014.
56. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Moriwaki H, Adachi H, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H. Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN $\alpha$ -2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multicenter cooperative study. *J Gastroenterol* 48: 382-390, 2013.
57. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 57: 46-58, 2013.



58. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fijuki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M. Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells in mice. *Hepatology* 57: 2502-2513, 2013.
59. Toyota J, Ozeki I, Karino Y, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H. Virologic response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. *J Viral Hepat* 20: 167-173, 2013.
60. Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N. Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 20: 72-76, 2013.
61. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 85: 449-458, 2013.
62. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, Izumi N. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: Evaluation by near-infrared spectroscopy. *Hepatol Res* 2013 Apr 5. doi: 10.1111/hepr.12127.
63. Tamaki N, Kurosaki M, Matsuda S, Nakata T, Muraoka M, Suzuki Y, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Nishimura T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Matsunaga K, Taki K, Asahina Y, Izumi N. Prospective comparison of real-time tissue elastography and serum fibrosis markers for the estimation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2013 Jun 6. doi: 10.1111/hepr.12179.
64. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. *JSH Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection: A 2014 Update for Genotype 1*. *Hepatol Res* 2014; 44: S59-S70.
65. Asahina Y, Hayashi N, Hiramatsu N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Kurosaki M, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tanaka E, Tanaka Y, Tsubouchi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. *Guidelines for the Management of Hepatitis B Virus Infection*. *Hepatol Res* 2014; 44: S1-S58.
66. 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
67. 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
68. 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
69. 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
70. 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
71. 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
72. 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
73. 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
74. Ahn S, Tamai M, Nakashima K, Ito M, Suzuki T, Tagawa Y. An *in vitro* liver model consisting of endothelial vascular networks surrounded by human hepatoma cell lines allows for improved hepatitis B virus replication. *J Biosci Bioeng.* (2014) *in press* doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.016.
75. Aikawa H, Tamai M, Mitamura K, Itmainati F, Barber GN, Tagawa Y. Innate immunity in an *in vitro* murine blastocyst model using embryonic and trophoblast stem cells. *J Biosci Bioeng.* (2014) *in press* doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.09.001.
76. Tamai M, Aoki M, Nishimura A, Morishita K, Tagawa Y. *In vitro* recapitulation of the urea cycle using murine embryonic stem cell-derived *in vitro* liver model. *Amino Acids.* (2013) *in press* doi: 10.1007/s00726-013-1594-x.
77. Shang Y, Tamai M, Ishii R, Nagaoka N, Yoshida Y, Ogasawara M, Yang J, Tagawa Y. Hybrid sponge comprised of galactosylated chitosan and hyaluronic acid mediates the co-culture of hepatocytes and endothelial cells. *J Biosci Bioeng.* (2014) *in press* doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.015.

78. Tamai M, Adachi E, Tagawa Y. Characterization of a liver organoid tissue composed of hepatocytes and fibroblasts in dense collagen fibrils. *Tissue Eng Part A*. (2013) *in press* doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0704.
79. Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol* 2013;87:489-502
80. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- $\lambda$  in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013;57:1705-1715
81. Fukuhara T, Matsuura Y. Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. *J Gastroenterol*. 2013; 48(2): 169-76.
- 2.学会発表
1. Moriya K, *BCAA, steatosis and hepatocarcinogenesis in HCV infection*, The 2013 Italy-Japan Liver Workshop Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma:molecular basis and clinical links, Marsala (Trapani, Italy), October 20-21, 2013
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 阪本良弘、大道清彦、山本訓史、三瀬祥弘、石沢武彰、金子順一、青木琢、長谷川潔、菅原寧彦、國土典宏。非B非C肝に発生した肝細胞癌に対する肝切除後の長期成績—特にB型肝炎感染歴の意義について—第25回日本肝胆膵外科学会 平成25年6月12日—14日、栃木

7. 長谷川潔、青木琢、井上陽介、佐藤彰一、石沢武彰、高橋道郎、金子順一、阪本良弘、菅原寧彦、國土典宏。肝臓外科における RCTエビデンス。第67回日本消化器外科学会。平成25年7月、富山
8. 丹伊田浩行、北川雅敏：Role of HB01 for nucleotide excision repair. The 2nd Symposium of Cell Cycle Control and Cell Fate、浜松、2014
9. 丹伊田浩行、塩谷文章、松本雅記、西谷秀男、北川雅敏：ATM/ATR-dependent phosphorylation dissociates HB01 from replication origin。第36回日本分子生物学会年会 神戸 2013年
10. 大畑樹也、松本美香、Martin Leeb, 柴田進和、廣瀬哲郎、北川恭子、丹伊田浩行、北川雅敏、Anton Wutz:マウスES細胞におけるXist抑制機構解析。第36回日本分子生物学会年会 ポスター発表 神戸 2013年
11. Tatsuya Ohhata, Masatoshi Kitagawa: Investigation of long non-coding RNAs involved in regulating X-chromosome inactivation. The 13th Hamamatsu-Kyungpook Joint Medical Symposium, Plenary talk, Deagu, Korea, 2013.
12. Tatsuya Ohhata, Mika Matsumoto, Martin Leeb, Shinwa Shibata, Tesuro Hirose, Masatoshi Kitagawa, Anton Wutz: Molecular dissection of Xist repression through Tsix dependent/independent manner in undifferentiated ES cells. Gordon research conference, Epigenetics. Rhode Island, USA, 2013
13. Masatoshi Kitagawa, Kyoko Kitagawa : A novel substrate for Fbw7, the tumor suppressive ubiquitin ligase.第72回日本癌学会総会 横浜 2013年.
14. 丹伊田浩行、塩谷文章、松本雅記、北川雅敏：Regulation of Licensing by Cell Cycle Checkpoint. 第65回日本細胞生物学会大会 シンポジウム 名古屋 2013年
15. 北川恭子、北川雅敏：リン酸化とユビキチン化修飾による転写因子 GATA3 タンパク質の安定性制御機構、第65回日本細胞生物学会合同年会、名古屋、2013年。
16. Tsuchiya K, Yasui Y, Matsuda S, Muraoka M, Tamaki N, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N. Monitoring of plasma vascular endothelial growth factor after sorafenib administration as predictor of survival in advanced hepatocellular carcinoma. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.
17. Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.
18. Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto Wk, Yuen MF, Poovorawan Y, Ahn SH, Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Korenaga M, Mawatari Y, Kawashina M, Tokunaga K, Mizokami M. Trans-ethnic analysis of HLA-DPA1, DOB1 haplotypes to be associated with hepatitis B virus infection. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2013), Washington DC, USA, November 1-5, 2013.
19. Asahina Y, Nakagawa M, Taniguchi M, Kawai F, Fujiki J, Otani T, Yamanaka H, Murakawa M, Nitta S, Kitazume A, Watanabe T, Sakurai Y, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Serum interleukin-6 levels during treatment correlate with resistance to telaprevir-based triple therapy in chronic hepatitis C. The 48th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2013), Amsterdam, Netherlands, April 24-28, 2013.
20. Azuma S, Asahina Y, Sakurai Y, Ootani H, Yamanaka H, Kawai F, Fujiki J, Nitta S, Kitazume A, Murakawa M, Nakagawa M,