

2. 実用新案登録

無

3. その他

無

■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

研究分担報告書

## 肝細胞分化とHBV増殖機構の解明および HBV蛋白質の機能解析に関わる研究

研究分担者 朝比奈 靖浩 東京医科歯科大学 肝臓病態制御学講座 教授

研究要旨：HBVは成熟肝細胞でのみで複製するとされるが、定常状態の肝細胞が一定の速度でturn overしているにも関わらず、複製中間体のcccDNAが核内に残存し続ける原因は不明である。本研究では、細胞周期が静止し幹細胞類似形質を持つ細胞など、肝細胞の分化状態の違いがHBVライフサイクルに与える影響を解明し、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ことを目的とする。本年度は、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有用である。

### A. 研究目的

定常状態の肝細胞が一定の速度でturn overしているにも関わらず、HBV複製中間体のcccDNAが核内に残存し続ける原因は不明である。本研究では、「細胞周期が静止し幹細胞類似形質を持つ細胞においてcccDNAが保存されることが一因」との仮説に基づき、肝細胞の分化状態の違いがHBVライフサイクルに与える影響を解明し、従来の薬剤開発とは視点を異にする細胞分化機構を基軸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ことを目的とした。

### B. 研究方法

入手可能なヒト肝細胞及びヒト肝幹・前

駆細胞株等を用いて細胞分化度を調節しうる培養系を確立する。分化度の異なる細胞におけるHBV発現培養系を確立し、HBV増殖、cccDNA、宿主遺伝子発現の関係性を網羅的に解析する。これによりcccDNAが肝内に存在し続ける機構に関連する因子を標的とした低分子化合物のスクリーニングを行う。

(倫理面の配慮)

本研究における遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく「研究開発二種省令・研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に準拠し遂行する。研究の施行に当た

っては、東京医科歯科大学組み換え DNA 実験安全管理委員会の承認、および文部科学大臣の確認を取得している。

### C. 研究結果

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、細胞分化度を調節する培養系を確立し、よりソーティングを繰り返すことにより、より純度の高い肝細胞様細胞を得た。本細胞における、HBV レセプター及び HCV レセプターの発現を確認した。本年度は導入 HBV ベクターとして、in vitro で複製可能な 1.24 倍長の HBV ベクターを用い、強制発現系により、HB s 抗原の産生を確認した。尚、ヒト iPS 細胞に関わる研究は、東海大学 紙谷聡英 准教授・東京大学 中内啓光 教授からの技術支援と緊密な連携の基に行われている。

### D. 考察

本研究の成果により、細胞分化の変化と HBV ライフサイクルに関連する新たなウイルス・宿主因子の同定し、現在の B 型肝炎治療を補完する新規クラスの抗ウイルス治療法の創出が期待できる。また、薬剤スクリーニング・ケミカルバイオロジー技術の応用範囲の拡大が期待でき、多分野での新たな研究の創造が期待できる。

### E. 結論

細胞分化度を調整し得るヒト肝細胞培養系を構築し、より純度の高い肝細胞様細胞

を得る技術を開発した。肝細胞の分化状態の違いが HBV ライフサイクルに与える影響を解明し、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、本系は有用である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 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 Arai, 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.
2. 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.
3. 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
4. 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.
5. 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.
6. 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.
  7. 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.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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. *Hepatology* 2013 Apr 5. doi: 10.1111/hepr.12127.
  16. 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. *Hepatology* 2013 Jun 6. doi: 10.1111/hepr.12179.
  17. 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. *Hepatology* 2014; 44: S59-S70.
  18. 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. *Hepatology* 2014; 44: S1-S58.
- ## 2. 学会発表
1. 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.
  2. 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.
3. 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.
  4. 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.
  5. Azuma S, Asahina Y, Sakurai Y, Ootani H, Yamanaka H, Kawai F, Fujiki J, Nitta S, Kitazume A, Murakawa M, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M. Comparison between Gd-EOB-DTPA MRI and CTHA/CTAP for detection of hypervascular hepato-cellular carcinoma: efficacy of diffusion weighing image and hepatobiliary phase. APASL Liver Week 2013 (Annual Meeting of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver), Singapore, June 2013.
  6. Asahina Y, Murakawa M, Nitta S, Itsui Y, Nakagawa M, Azuma S, Kakinuma S, Watanabe M. Impaired IL28B gene induction and expression of IFN  $\lambda$  4 are closely associated with a non-response to interferon-based therapy in chronic hepatitis C patients. 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.

H. 知的所有権の出願・取得状況  
なし

■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

研究分担報告書

## HBV 産生抑制物質の探索と感染による細胞内変化

研究分担者 森石 恆司 山梨大学医学部 教授

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）のコア蛋白質遺伝子上流のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子と連結させ、海洋生物抽出物ライブラリーから新規の252抽出物をスクリーニングした。その中の4抽出物が抗HBV活性をしめし、うち二つの主成分がPolybrominated diphenyl ether (PBDE)であった。PBDEとその誘導体はHepG2.2.15細胞からのウイルス粒子産生に対して抑制活性を示したが、細胞毒性が高かった。ヒット率を上げるためHepG2.2.15細胞のウイルスDNA放出を指標に48海洋抽出物画分をスクリーニングしたところ、4画分ヒットした。持続的にウイルス粒子を産生するHepG2.2.15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。これらの結果は、新規抗HBV薬開発などに繋がるものと期待される。

### A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）の持続感染者は世界で三億人を越えるといわれ、半数の肝癌患者がHBV感染に由来すると考えられている。HBVのコア蛋白質コード領域の上流に、プロモーター領域が存在しており、宿主の転写因子HNF4、C/EBP、PPAR $\gamma$ などが認識する配列が認められる。コア蛋白質は、ウイルス粒子を形成するキャプシド蛋白質と考えられ、感染性粒子を構成する構造蛋白質である。細胞内にcccDNAが残されていても、ウイルス蛋白質の発現を制御できれば、再活性化などに際し、感染拡大や病原性発現を抑制・遅延させることができる。核内にあるcccDNAは宿主ヒストンと会合し、ミニクロモゾームを形成することから、エピジェネティックな制御をうけると考えられる。

本研究で、HBV感染を抑制する化合物探索と感染による細胞内変化を解析し、得られた成果を新規B型肝炎治療薬開発に発展させることを目指す。本年度は、HBVコアプロモーターを制御する化合物探索、ウイルス粒子産生を抑制する化合物探索、および感染による脂肪滴変化の影響を解析した。

### B. 研究方法

遺伝子型C（CAT株）からコアプロモーター領域をPCRで増幅し、pGL2プラスミドに組み込み、ルシフェラーゼ遺伝子と連結させ、細胞株を樹立した。その細胞株を用いて、45海洋生物抽出物をスクリーニングした。MTS法によって細胞増殖を

測定した。また、HBVを持続産生している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。

### （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、個人情報を厳格に管理、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

以前、我々は、C型肝炎ウイルスのウイルス複製を指標に、抗NS3活性を示す化合物が海洋生物（海綿やウミシダ）に存在することを報告している（Yamashita et al, Mar Drugs, 10, 744 ; Fujimoto et al, PLoS one, 7, e48685, 2012）。そこで抗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、昨年、*Liosina* 属(種未同定)の海綿動物からの画分を報告した。しかしながら、この海綿の再採取を試み、同様に抽出画分を調整したが、抗 HCV 活性は見られなかった。また、この海綿の収集は難しく精製のための絶対量が不足が予想されるため、さらなる探索を進めた。252 画分を探索した結果、ヒットした 4 画分のうち 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。さらに、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。低毒性で、抗 HBV 活性が高く、今後、これらの画分の詳細を検討したい。

昨年、感染による脂質成分変化を質量分析し、TAG 領域に感染により明らかに低下しているピークがみられたことを報告している。さらに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。

#### D. 考察

本研究により、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、今後もスクリーニングを継続する。また、TAG 領域に変化がみられたが脂肪酸成分の違いをより細かく解析する必要があると思われる。また、他の脂質成分の解析などを、臨床サンプルも対象にして解析する予定である。

#### E. 結論

本研究によって、海洋動物抽出物ライブラリーを用いて抗 HBV 化合物を同定できる可能性が示された。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。本研究結果は、新規 B 型肝炎治療法開発および診断法開発に繋がるものと期待できる。

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

## 2. 学会発表

1. Tanaka T, Kasai H, Yamashita A, Moriishi K. 20<sup>th</sup> 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



■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  
研究分担報告書

## 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

研究分担者 田川 陽一 東京工業大学 大学院生命理工学研究科 准教授

研究要旨：内皮細胞・星細胞の管腔ネットワークと肝細胞株、ヒト肝細胞またはヒトES/iPS細胞由来肝細胞との共培養による肝組織モデル (*in vitro* Liver model: IVL<sup>肝細胞株、ヒト肝細胞またはhES/iPS</sup>) とマイクロ流体デバイスとを応用した実際の肝組織に近いヒト肝様組織チップを構築する。これらのヒト肝様組織チップにHBV-DNAを導入し、遺伝子発現やウイルス粒子の放出、さらには、HBV感染性粒子の感染を検討し、班内分担者と連携して各段階における薬剤スクリーニング系の確立を目的とした。

### A. 研究目的

初代培養肝細胞やヒト肝癌由来細胞株等の一般的な培養法ではHBVの感染は成立できないことが知られているが、ヒト肝細胞キメラマウスのみHBVの感染が可能である。しかし、ヒト肝細胞キメラマウスは高価であり大規模な薬剤スクリーニング等には適さず、*in vivo*を反映した*in vitro*感染・増殖モデルの開発が望まれる。効率の良いHBVの*in vitro*感染・増殖系を確立するためには、実際の肝臓中の肝細胞と同等に活発な細胞内システムを有する細胞を維持する必要がある。一般的な肝細胞株は幼若(腫瘍)細胞であり、また、肝臓から調製された初代肝細胞は*in vitro*で増殖できないことや肝機能のほとんどを長期間維持することもできないということから、成熟肝細胞としての特異的細胞内システムを有していないということになる。実際の肝臓は実質細胞である肝細胞と非実質細胞である

類洞内皮細胞や星細胞等からなり、特異的な組織構造を形成している。また、肝臓中の肝細胞は立体的であり、肝細胞—肝細胞、肝細胞—類洞内皮(直接の結合はない)、肝細胞—微小胆管という3つの細胞極性を有しているが、様々な細胞内小器官の配置・構成や酵素活性は細胞極性に依存していると考えられる。我々は、ヒト初代培養肝細胞と内皮細胞等、または、ヒトES/iPS細胞を用いて細胞極性を再構築した高機能肝組織モデル (*in vitro* Liver model: IVL<sup>hPH</sup> またはIVL<sup>hES/iPS</sup>)の構築に成功している。そこで、IVL<sup>hES/iPS</sup>を用いてcccDNAの安定形成系または効率よい*in vitro*HBV感染・増殖系を確立することを目的とする。さらには、この系を用いて、cccDNAの選択的不活化やワクチン開発を試みる。

## B. 研究方法

Engelbreth-Holm-Swarm (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 (IVL<sup>Hep G2/HuH-7</sup>, Hep G2.2.15/HuH-HB-Ae、または ES/hiPS)を構築した。

(倫理面の配慮)

東工大ではヒトES細胞専用実験室を有し、田川のヒトES細胞を用いた肝組織分化誘導研究はすでに文部科学大臣より平成24年度末まで承認を得ており、東工大のヒトES細胞倫理規則および文部科学省のヒトES細胞使用指針に遵守し実験をおこなった。また、平成25年度におこなったその他の研究では、細胞株や市販されている内皮細胞株等を用いたため、人権擁護、不利益等は発生していない。

## C. 研究結果

IVL<sup>Hep G2/HuH-7</sup>における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

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 のレセプターとして唯一知られているナトリウム・胆汁酸共輸送体(sodium taurocholatecotransporting polypeptide: 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。

## D. 考察

これらIVL<sup>肝細胞株</sup>培養系ではHBV導入DNAの発現や抗原タンパク質の産生が有意にIVL構築しなかった場合に比べて高かったことは、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る。IVL構築の重要性が指摘できた。しかしながら、これらの細胞株ではIVLを構築しても、HBVのレセプターとして唯一知られているNTCPの発現の上昇は確認できなかった。それは、肝細胞特異的な極性シグナルが不十分であったためと思われる。

IVL<sup>肝細胞株</sup>では感染・増殖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。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。

## E. 結論

IVL<sup>肝細胞株</sup>の構築による肝機能向上による

HBV 遺伝子発現の上昇に成功した (Ahn et al, *J BiosciBioeng.* 2014)。さらに、IVL ES/iPS では、H 効率よい *in vitro* HBV 感染・増殖系の確立に成功した (in preparation)。

F. 健康危険情報  
無

G. 研究発表

論文発表

1. 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 BiosciBioeng.* (2014) *in press*doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.12.016.
  2. 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 BiosciBioeng.* (2014) *in press*doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.09.001.
  3. 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.
  4. 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 BiosciBioeng.* (2014) *in press*doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.06.015.
  5. 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.
- 学会発表
- 1) 安 成皓, 中島 謙治, 玉井 美保, 村上 努夢, 伊藤 昌彦, 鈴木 哲朗, 田川 陽一: ”ヒト iPS 細胞由来 *in vitro* 肝組織を用いた HBV 感染・増殖モデルの開発” 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, (2013).
  - 2) SunghoAhn and Yoh-ichiTagawa : ”High functional *in vitro* liver model consisting of human ES / iPS cell-derived hepatic lineage cells and endothelial networks” Poster Presentation. 23rd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Singapore, (2013)
  - 3) ShinsukeImamatsu, SunghoAhn, KenzoBamba, Hirosato Okazaki, and Yoh-ichiTagawa : “A xeno-free slow-freezing cryopreservation medium for primate ES/iPS cells.” Oral Presentation. TERMIS-AP, Shanghai, (2013)
  - 4) ShinsukeImamatsu, SunghoAhn, KenzoBamba, Hirosato Okazaki, and Yoh-ichiTagawa. A xeno-free slow-freezing cryopreservation medium for primate ES/iPS cells、日本組織培養学会第 86 回大会, 筑波. (2013)
  - 5) 今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一: ”霊長類 ES/iPS 細胞の単一細胞での緩慢凍結保存” 第 65 回日本生物工学会大会, 広島, (2013)
  - 6) Miho Tamai, Yoh-

- ichiTagawa : "Recapitulation of the hepatic function using *in vitro* liver model from murine ES/iPS cells" CBI学会 2013年大会、東京、(2013)
- 7) Miho TAMAI, Hiroshi SAKAI, Shinichi Miyagawa, Eijiro ADACHI, Yoh-ichi TAGAWA : "Reconstruction of Liver Tissues Model Composed of Murine Hepatic Progenitor Cells and Fibroblasts in Dense Collagen Fibrils" 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
- 8) SunghoAhn, Yoh-ichiTagawa : "Reconstitution of human *in vitro* liver model consisting of ES/iPS cell-derived hepatic cells and endothelial networks" 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
- 9) Yuuki Taniguchi, Je-Young Ryu, Yoh-ichiTagawa : "Chimeric analysis of EGFP and DsRed2 transgenic mice demonstrates polyclonal maintenance of pancreas and liver" 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
- 10) Tsutomu Murakami, Miho Tamai, Yoh-ichiTagawa : "In vitro sinusoid-like networks consisting of hepatocytes, endothelial cells and hepatic stellate cells" 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
- 11) Yi Shang, Miho Tamai, Yoichi Fujiyama, Yoh-ichiTagawa : "Construction of hepatocyte and endothelial cell co-culture system in hybrid sponge integrated with a microfluidic device" 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
- 12) ChonnipaNilubol, Miho Tamai, Hidemitsu Uchisawa, Yoh-ichiTagawa : "Suppression of ethanol-induced liver injury in mouse by a novel tripeptide consisted of non-proteinogenic amino acids" 第20回肝細胞研究会、大阪、(2013)
- 13) 玉井美保、田川陽一 : "マウス ES/iPS 細胞由来 *in vitro* 肝器官形成モデルにおける肝細胞極性" 第86回日本生化学会大会、横浜、(2013).

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

無

##### 2. 実用新案登録

無

##### 3. その他

無

■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

研究分担報告書

## 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

研究分担者 福原 崇介 大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨： B型肝炎の根治を目指す治療法の確立にはHBVの持続感染を可能にする新たな宿主因子の同定が必要である。本研究では、定量的なプロテオミクス法であるSILAC法を用いて、HBV感染時に核内で有意に発現量が変化している蛋白質を81種類同定した。shRNAによるノックダウンにより、HBVのpregenomic RNAの核外移行に関与する宿主因子としてLRPPRCを同定した。

### A. 研究目的

B型肝炎に対する現行の治療は、HBVの逆転写酵素を標的としているため、核内に存在するcccDNAには効果がないことから根治は難しい。従って、HBV感染を根治するには新たな宿主因子の同定と、それを標的とした創薬が重要である。本研究では定量的なプロテオミクス法であるSILAC法を用いて、HBV感染によって核内で発現変動する分子を同定し、その中からHBVの持続感染や病原性に関与する宿主因子を同定することを目的とする。

### B. 研究方法

宿主因子の探索として、核または膜画分を精製した後に、SILAC法を用いてHBV感染によって核内で有意に発現が変化している蛋白質を網羅的にスクリーニングした。遺伝子発現の確認としては、Taqman-arrayおよび定量PCRを行った。次に、shRNAを用いて宿主因子の発現を抑制したHepG2.2.15細胞を樹立し、細胞内および上清中に分泌されるコア粒子関連HBV-DNA量を測定することで、HBVの感染性に関与する宿主因子を同定する。また、同定されたLRPPRCの意義を解析するために、LRPPRCの発現抑制細胞における核内と細胞質のpregenomic RNA量を定量した。

### (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

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、ノックダウンHepG2.2.15細胞を樹立した。20種類の宿主因子のうち、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。LRPPRCは特定のmRNAに結合し、核から細胞質への輸送に関与することが知られているため、HBVのpregenomic RNAの輸送への関与を検討した。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。

#### D. 考察

本研究によって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。

#### E. 結論

網羅的な解析によって、HBVの感染性に関与する宿主因子としてLRPPRCを同定した。

#### 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, 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. 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
3. 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. 岡本 徹、岡本貴世子、森 嘉生、福原 崇介、森石恆司、松浦善治、C型肝炎ウイルスコア蛋白質の膜内配列切断の生物学的意義、シンポジウム「非常識なプロテアーゼ反応：膜内部でのタンパク質切断」、第86回日本生化学会、横浜、2013
2. Fukuhara T, Yamamoto S, Motomura T, Shiokawa M, Ono C, Kambara H, Okamoto T, Matsuura Y. Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. The American Society for Virology, 32nd Annual Meeting, University Park, 2013
3. Okamoto T, Sugiyama Y, Ono C, Aizawa S, Ngoc PD, Kohwaki T, Hirooka E, Fukuhara T, Yamamoto M, Matsuura Y. Roles of de-ubiquitinating enzymes on the propagation of HCV. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
4. Fukuhara T, Yamamoto S, Shiokawa M, Wada M, Ono C, Okamoto T, Matsuura Y. Role of HCV-RNA quasispecies on the cell-specific infectivity. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
5. Ono C, Fukuhara T, Shiokawa M, Yamamoto S, Wada M, Okamoto T, Okuzaki D, Matsuura Y. Propagation of HCV in the miR-122-knockout Huh7 cells. 20th International Meeting on HCV and Related Viruses. Melbourne, 2013
6. 福原 崇介、塩川 舞、小野 慎子、山本 聡美、和田 真実、岡本 徹、野田 健司、吉森 保、松浦 善治、HCV感染により誘導されるオートファジーの性状、第61回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
7. 小野慎子、福原崇介、塩川 舞、山本聡美、和田真実、岡本 徹、奥崎大介、松浦善治、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞における HCV 増殖、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、2013
8. 和田真実、福原崇介、山本聡美、塩川舞、小野慎子、岡本徹、松浦善治、C型肝炎

ウイルスの粒子産生における VLDL 関連タンパク質の役割、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、2013

9. 山本聡美、福原崇介、塩川舞、小野慎子、岡本徹、松浦善治、B 型肝炎ウイルスの増殖に関わる宿主因子の解析、第 61 回日本ウイルス学会総会、神戸、2013

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

特になし。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
NorihiroKokudo, Takeshi Ishizawa	History and Basic Technique of Fluorescence Imaging for Hepatobiliary-Pancreatic Surgery	NorihiroKokudo, Takeshi Ishizawa	Fluorescent Imaging/Treatment of Hepatobiliary and Pancreatic Disease	KARGER	Basel (Switzerland)	2013	1-9
今松 伸介, 安 成皓, 馬場 憲 三, 岡崎 宏悟, 田川 陽一	霊長類ES/iPS細胞 の凍結保存・輸 送・解凍. 再生医 療・細胞培養の開 発と市場		再生医療・細 胞培養の開発 と市場	シーエム シー出版		2013	89-96

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nguyen T, Xu J, Chikuma S, Hiai H, Kinoshita K, <u>Moriya K</u> , <u>Koike K</u> , Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, Kobayashi M.	Activation-induced cytidinedeaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models	<b>IntImmun</b>  ol. Mar 15.		in press	2014
Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, <u>Moriya K</u> , Tsutsumi T, <u>Koike K</u> , Akatsuka T	The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells	<b>Hepato Res</b>		in press	2013
Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, <u>Moriya K</u> , Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H	High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential	<b>Int J Cancer.</b>		in press	2013
Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, <u>Moriya K</u> , Mizokami M, Miyakawa Y, <u>Koike K</u>	High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B	<b>Clin Infect Dis.</b>	57(7)935-42	935-42	2013



Pei Z, Shi G, Kondo S, Ito M, Maekawa A, Suzuki M, <u>Saito I</u> , Suzuki T and Kanegae Y.	Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity to suppress hepatitis C virus replication.	Scientific Rep.	3	3575	2013
Maekawa A, Pei Z, Suzuki M, Fukuda F, Kondo S, <u>Saito I</u> and Kanegae Y.	Efficient production of adenovirus vector lacking genes of virus-associated RNAs that disturb cellular RNA machinery.	Scientific Rep.	3	1136	2013
Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H	Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients	<b>Int J Cancer</b>			[Epub ahead of print]
Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, <u>Koike K</u> , Karin M, Maeda S	Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis	<b>Proc Natl Acad Sci U S A</b>			[Epub ahead of print]
Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, <u>Koike K</u>	The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects.	<b>J Gastroenterol</b>			[Epub ahead of print]
Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, <u>Koike K</u> .	The impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection	<b>Hepatology Res</b>			[Epub ahead of print]
Uchino R, Isayama H, Tsujino T, Sasahira N, Ito Y, Matsubara S, Takahara N, Arizumi T, Toda N, Mohri D, Togawa O, Yagioka H, Yanagihara Y, Nakajima K, Akiyama D, Hamada T, Miyabayashi K, Mizuno S, Kawakubo K, Kogure H, Sasaki T, Yamamoto N, Nakai Y, Hirano K, Tada M, <u>Koike K</u> .	Results of the Tokyo Trial of Prevention of Post-ERCP Pancreatitis with Risperidone-2: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial	<b>Gastrointestinal Endosc</b>			[Epub ahead of print]

Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, <u>Koike K</u> , Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H.	Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis C using multiple fibrosis markers	<b>Hepatol Res</b>			[Epub ahead of print]
Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, <u>Koike K</u>	Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression	<b>BiochemBiophys Res Commun</b>			[Epub ahead of print]
Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, <u>Koike K</u> .	Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C	<b>Hepatol Res</b>			[Epub ahead of print]
Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Fushimi K, <u>Koike K</u>	Acute liver disease in Japan: a nationwide analysis of the Japanese Diagnosis Procedure Combination database	<b>J Gastroenterol</b>			[Epub ahead of print]
Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, <u>Koike K</u>	IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection.	<b>J Gastroenterol</b>			[Epub ahead of print]
Mikoshiha N, Miyashita M, Sakai T, Tateishi R, <u>Koike K</u>	Depressive symptoms after treatment in hepatocellular carcinoma survivors: prevalence, determinants, and impact on health-related quality of life	<b>Psychooncology</b>			[Epub ahead of print]
Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Mikami S, Sato M, Uchino K, Arano T, Enooku K, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Matsuyama Y, Omata M, Ohtomo K, <u>Koike K</u>	CT with hepatic arteriography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial	<b>Am J Gastroenterol</b>	108	1305-1313	2013
Inoue Y, Tomiya T, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ikeda H, <u>Koike K</u>	Induction of p53-Dependent p21 Limits Proliferative Activity of Rat Hepatocytes in the Presence of Hepatocyte Growth Factor.	<b>PLoS One</b>	8(11)	e78346	2013
Hikita H, Enooku K, Satoh Y, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Tateishi R, Soroida Y, Sato M, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Yokota H, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H.	Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- $\alpha$ and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1	<b>Hepatol Res</b>	43(10)	1005-1012	2013
	1				

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, Hatzia Apostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M	Identification of livercancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6signaling	<b>Cell</b>	155(2)	384-396	2013
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	<b>Sci Rep</b>	3	2739	2013
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	<b>BiochemBiophys Res Commun</b>	432(1)	22-27	2013
<u>Koike K</u>	The oncogenic role of hepatitis C virus	<b>Recent Results Cancer Res</b>	193	97-111	2014
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	<b>J Clin Virol</b>	57(2)	173-177	20143
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	<b>Sci Rep</b>	3	2553	2013
Ikedo 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	<b>Hepatology Res</b>	43(6)	596-604	2013
Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C,	A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel	<b>J Hepatology</b>	58(5)	875-882	2013

Omata M, <u>Koike K</u> , Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K	susceptibility loci at MHC region.				
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, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H	Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver cancer development in chronic hepatitis C patients	<b>J Gastroenterol</b>	48(3)	366-373	2013
Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Otomo K, Omata M, Yoshida H, <u>Koike K</u>	Frequency, risk factors and survival associated with an intrasubsegmental recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma	<b>PLoS One</b>	8(4)	e59040	2013
Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, <u>Koike K</u> , 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	<b>PLoS One</b>	8(4)	e61279.	2013
Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, <u>Koike K</u>	Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	<b>J Gastroenterol</b>	48(2)254-268	254-268	2013
Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, <u>Koike K</u> , Yatomi Y	Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma	<b>Hepatology</b>	57	417-418	2013
Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, <u>Koike K</u>	MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- $\kappa$ B activity via directly targeting Dnmt1 expression	<b>Hepatology</b>	57	162-170	2013
Mise Y, Sakamoto Y, Ishizawa T, Kaneko J, Aoki T, Hasegawa K, Sugawara Y, <u>Kokudo N</u> .	A worldwide survey of the current daily practice in liver surgery.	Liver Cancer	2(1)	55-66	2013
Utsunomiya T, Shimada M, Kudo M, Ichida T, Matsui O, Izumi N, Matsuyama Y, Sakamoto M, Nakashima O, Ku Y, <u>Kokudo N</u> , Makuuchi M; Liver Cancer Study Group of Japan.	Nationwide study of 4741 patients with non-B non-C hepatocellular carcinoma with special reference to the therapeutic impact.	Ann Surg	259(2)	336-45	2014