

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

研究分担者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：これまでに、VLDL産生系に關わる宿主因子であるApoBやApoE等の肝臓特異的因子がHCVの粒子産生に關わっていることが示唆されてきた。粒子産生におけるアポリポ蛋白質の役割を明らかにするために、ApoBおよびApoEのノックアウト細胞を樹立した。ダブルノックアウト細胞では、HCVの感染性粒子産生効率が顕著に抑制されており、ApoBおよびApoEがHCVの粒子産生において相補的な役割を持っていることが示唆された。さらにApoEのみならずApoAまたはApoCの発現によりダブルノックアウト細胞におけるHCV粒子の産生が回復したことから、ApoAやApoCも粒子産生において同様の役割を演じていることが示唆された。アポリポ蛋白質の2次構造解析から、HCVの粒子産生を可能にするアポリポ蛋白質には共通した両親媒性の $\alpha$ ヘリックスが存在し、この $\alpha$ ヘリックスの発現によっても、HCV粒子の産生が回復することから、アポリポ蛋白質の両親媒性の $\alpha$ ヘリックスがHCVの粒子産生に關与することが示された。さらに、遺伝子型1および3とのキメラHCVを用いても同様の現象が確認されたことから、全遺伝子型で共通して、感染性粒子産生にアポリポ蛋白質が關与している事が明らかになった。

### A. 研究目的

HCVの感染環は様々な研究ツールの開発とともに徐々に解明されつつあるが、粒子産生機構については未だ不明な点が多い。これまでに我々は非肝臓系の細胞株であるHec1Bや293T細胞にHCV-RNAの効率的な複製に必須な宿主因子であるmiR-122を発現させることで、Huh7細胞と同等レベルのHCV-RNAの複製が得られることを示した。しかし、肝臓系の細胞株と異なり、非肝臓系の細胞株からは感染性のウイルス粒子が産生されないことが分かった。過去の報告でVLDL産生に關わる因子であるApoBやApoEがHCVの粒子産生に重要な役割を果たしていることが示唆されており、かつ非肝臓系の細胞株では、これらの因子がほとんど発現していないことから、VLDL産生系がHCVの粒子産生において感染指向性を規定していることが予想された。今回、人工ヌクレアーゼを用

いてApoBおよびApoEをノックアウトしたHuh7細胞を樹立し、HCVの粒子産生におけるApolipoproteinの意義を検討した。

### B. 研究方法

人工ヌクレアーゼをIn vitroで合成したmRNAを導入することで発現させ、細胞をクローニングし、遺伝子解析することによってApoBまたはApoEのノックアウトHuh7細胞を樹立した。同時に、ApoBおよびApoEのダブルノックアウト(DKO)細胞も樹立した。それらの細胞に対するHCVの感染性をqRT-PCRおよびFocus forming assayによって検討した。レンチウイルスベクターによって、種々のアポリポ蛋白質を発現させ、HCVの粒子産生に対する影響を検討した。アポリポ蛋白質の2次構造はCLC Genomics Workbenchにより予測した。ApoC1およびApoEの欠損変異体を発現するDKO細胞を作製し、HCVの感

染性粒子産生における両親媒性の $\alpha$ ヘリックスの意義を検討した。最後にウイルス粒子を超遠心によって精製し、アポリポ蛋白のウイルス粒子への結合を検討した。遺伝子型1および遺伝子型3のキメラHCVccを作製し、アポリポ蛋白によるキメラウイルスの感染性への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報に厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

ApoE または ApoB のノックアウト細胞はワイルドタイプ (WT) の Huh7 と同等の感染性粒子の産生能を示したが、DKO 細胞では感染性粒子産生能が顕著に抑制されており、ApoB および ApoE が HCV の感染性粒子産生において、相補的な役割を演じていることが示唆された。cDNA マイクロアレイの結果より、肝組織と Huh7 細胞におけるアポリポ蛋白の発現パターンが大きく異なることが判明した。ApoB および ApoE の発現は同等であるにも関わらず、ApoA や ApoC の発現が Huh7 細胞で抑制されていた。そこで、HCV の粒子産生における ApoA や ApoC の役割を解析するために、DKO 細胞において ApoA1、ApoA2、ApoC1、ApoC2、ApoC3、ApoE および ApoH を発現させ、粒子産生能を検討した。興味深いことに、ApoE のみならず ApoA および ApoC によっても HCV の感染性粒子の産生が可能になることが明らかになった。種々のアポリポ蛋白が共通した機能を保持する機構を明らかにするために、アポリポ蛋白の2次構造を予測した。興味深いことに、HCV の粒子産生を可能にする ApoA、ApoC よび ApoE は共通した両親媒性 $\alpha$ ヘリックスを複数、有することが明らかになった。さらに、ApoC1 および ApoE の単一の $\alpha$ ヘリッ

スを発現させた DKO 細胞においても、HCV の粒子産生能が回復していたことから、アポリポ蛋白に存在する両親媒性の $\alpha$ ヘリックスが HCV の感染性粒子の産生に関与していることが示唆された。さらに、超遠心にてウイルスを濃縮し、アポリポ蛋白を検出したところ、ウイルス粒子とともに濃縮されたことから、ウイルス粒子にアポリポ蛋白が結合していることが示唆された。遺伝子型1および遺伝子型3のキメラウイルスの粒子産生は ApoB および ApoE の共欠損によって、顕著に抑制されたことから、アポリポ蛋白質は JFH1 株のみならず、様々な遺伝子型の HCV 粒子産生に重要な役割を演じていることが示唆された。

### D. 考察

今回の検討により、ApoA、ApoB、ApoC および ApoE が両親媒性の $\alpha$ ヘリックスとウイルス粒子の結合を介して、HCV の感染性粒子の産生を可能にしていることが明らかとなった。相補的な機能をお互いに保持することから、アポリポ蛋白は抗ウイルス治療の標的に成り難い。

また、ApoA と ApoE はそれぞれ HDL および VLDL に高い特異性を持って結合するが、HCV 粒子産生においては、ApoA も ApoE も同様の機能を保持していた。今後は、アポリポ蛋白質がどのような機構で HCV の粒子産生に関わっているのかを明らかにしたい。

### E. 結論

HCV の感染粒子産生にはアポリポ蛋白に含まれる両親媒性の $\alpha$ ヘリックスが重要な役割を演じている。

### F. 健康危険情報

特になし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike

- K, and Matsuura Y. Amphipathic  $\alpha$ -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens* 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534
2. Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C, Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. *J. Virol.* 2014; 88: 5578-5594
2. 学会発表
1. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
  2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
  3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
  4. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of HCV. 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
  5. Sayaka Aizawa, Toru Okamoto, Takahisa Kouwaki, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, and Yoshiharu Matsuura, Processing of core protein by signal peptide peptidase participates in propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第37回日本分子生物学会年会、横浜、2014
  6. Yoshiharu Matsuura, Toru Okamoto, Takasuke Fukuhara, Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
  7. 山本聡美、福原崇介、小野慎子、和田真実、塩川舞、岡本徹、松浦善治、C型肝炎ウイルスの感染におけるアポリポタンパク質受容体の役割、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
  8. 和田真実、福原崇介、中村昇太、小野慎子、山本聡美、塩川舞、岡本徹、小池和彦、松浦善治、アポリポ蛋白質の両親媒性 $\alpha$ ヘリックスはHCVの感染性粒子産生に寄与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
  9. 岡本徹、相澤清香、杉山由加理、幸脇貴久、福原崇介、森石恆司、小池和彦、松浦善治、C型肝炎ウイルスの病原性発現におけるシグナルペプチドペプチダーゼの役割、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
  10. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCVのQuasispeciesは増殖性に関与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
  11. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic  $\alpha$ -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014
  12. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by

Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014

13. Toru Okamoto, Sayaka Aizawa, Takahisa Kouwaki, Tatsuya Suzuki, Francesc Puig-Basagoiti, Shinya Watanabe, Takasuke Fukuhara, Kohji Moriishi, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Processing of Core Protein by Signal Peptide Peptidase Participates in Propagation and Pathogenesis of Hepatitis C Virus. 第73回日本癌学会学術総会、横浜、2014

**H. 知的所有権の出願・登録状況**  
特になし。

分担研究報告書

## HCV 感染培養系による C 型肝炎関連肝がん 代謝因子の解析

研究分担者 勝二 郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨：C 型肝炎ウイルス(HCV)感染による代謝障害の分子機構は未だ不明な点が多く、治療法は確立されていない。本研究では HCV 感染培養系を用い、HCV 感染による HNF-1 $\alpha$  の発現抑制の分子機構と病態生理学的意義を解析した。HCVcc を感染させた培養肝細胞では HNF-1 $\alpha$  のライソソーム依存性分解が促進され、その標的遺伝子の L-FABP の転写抑制が起こり、mRNA 量、蛋白質量の減少が起こることが示唆された。内在性 L-FABP を siRNA でノックダウンしたところ、HCVcc 感染細胞での感染性 HCV の産生が抑制され、L-FABP が HCV 感染性粒子産生に関与することが示唆された。また、HCV NS5A と HNF-1 $\alpha$  の結合には NS5A の Val121 が必須であり、HNF-1 $\alpha$  の POU5 ドメインが結合に重要であることが明らかとなった。また NS5A 阻害剤 Daclatasvir が NS5A 依存性 HNF-1 $\alpha$  分解を阻害することが示された。

### A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)は慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌を引き起こすだけでなく、代謝障害を引き起こし、肝がんの進展に関与する。したがって、C 型肝炎による代謝障害と肝がんの病態解明及び治療法の開発は、厚生労働行政上、重要な課題である。

しかし、HCV 感染による代謝障害の分子機構は未だ不明な点が多く、治療法は確立されていない。HNF-1 $\alpha$  不活化による肝アデノーマで HNF-1 $\alpha$  の標的遺伝子の L-FABP の転写抑制が起こり、著明な肝脂肪化、糖代謝異常が起こることが知られている。これまでに我々は本研究班で HCV NS5A が HNF-1 $\alpha$  との相互作用を介し、ライソソーム依存性に HNF-1 $\alpha$  の分解を誘導すること

を報告してきた。そこで、本研究では HCV 感染培養系を用い、HCV NS5A による HNF-1 $\alpha$  の発現抑制とその標的遺伝子の L-FABP の発現への影響と、その病態生理学的意義を解析した。また、NS5A と HNF-1 $\alpha$  の相互作用に重要な領域を同定した。

### B. 研究方法

1) HCV J6/JFH1 を感染させた Huh-7.5 細胞での Liver-type Fatty Acid Binding Protein (L-FABP; 肝臓型脂肪酸結合蛋白) の発現レベルを real time PCR 法およびウエスタンブロット法で解析した。

2) HCV レプリコン細胞 SGR/Fluc-neo/JFH1 を用い、内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンし、HCV RNA 複製への影響を

ルシフェラーゼアッセイで解析した。

3) HCV JFH1 を Huh-7 細胞に感染させ、内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンし、上清中への感染性 HCV 粒子の産生への影響を上清中の HCV 感染価の測定により解析した。

4) HCV NS5A 上の HNF-1 $\alpha$  結合領域を解析するために、NS5A の各種欠失変異体および点変異体を作製した。Huh-7.5 細胞にそれぞれを発現させ、両者の結合に重要な NS5A 上のアミノ酸を免疫沈降法で解析した。

5) HNF-1 $\alpha$  上の NS5A 結合領域を解析するために HNF-1 $\alpha$  の欠失変異体を作製した。Huh-7.5 細胞にそれぞれを発現させ、両者の結合に重要な HNF-1 $\alpha$  の領域を免疫沈降法で解析した。

6) Huh-7.5 細胞に HCV J6/JFH1 を感染させ、HNF-1 $\alpha$  分解誘導に対する NS5A 阻害剤 Daclatasvir の効果を解析した。

#### (倫理面の配慮)

取り扱うすべての DNA および病原微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験室で取り扱われた。培養細胞による研究でヒトゲノムの遺伝子解析はおこなっていない。

#### C. 研究結果

1) HCV J6/JFH1 を感染させた Huh-7.5 細胞では L-FABP の mRNA レベルが感染後 2 日、4 日、6 日と経時的に減少し、それに伴い L-FABP の蛋白レベルは著明に減少した。

2) HCV レプリコン細胞 SGR/Fluc-neo/JFH1 の内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンしたところ、HCV RNA 複製はコント

ロール siRNA の場合とほとんど変化なく、複製への影響はみられなかった。

3) HCV JFH1 を Huh-7 細胞に感染させ、内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンしたところ、上清中の HCV 感染価が上昇した。

4) HCV NS5A 上の aa 121-126 が HNF-1 $\alpha$  結合に重要で、V121A 変異体では両者の結合が消失した。

5) HNF-1 $\alpha$  aa 91-181 を欠失させると NS5A との相互作用が消失し、HNF-1 $\alpha$  aa 91-181 だけ発現させると NS5A と相互作用を示したことから、HNF-1 $\alpha$  上の POU5 domain が NS5A との結合に重要であることが示唆された。

6) Huh-7.5 細胞に HCV J6/JFH1 を感染させ、Daclatasvir を培養液中に添加すると HNF-1 $\alpha$  の量が回復し、NS5A による HNF-1 $\alpha$  の分解誘導が阻害された。

#### D. 考察

HNF-1 $\alpha$  不活化による肝アデノーマで HNF-1 $\alpha$  の標的遺伝子の L-FABP の転写抑制が起こり、著明な肝脂肪化、糖代謝異常が起こることが知られている。HCV 感染ではライソソーム依存性に HNF-1 $\alpha$  の分解が促進される。それに伴い L-FABP の転写抑制が起こり、蛋白レベルでも著明な減少をした。L-FABP は脂肪酸と結合し、脂肪酸を細胞内の脂肪滴、ペロキシソーム、ミトコンドリアなどに輸送する。L-FABP の発現量が著明に減少すると脂肪酸の輸送に障害が起こると考えられ、これが脂肪滴の貯留や肝脂肪化につながると考えられた。

L-FABP 量を siRNA によりノックダウン

させると、感染性ウイルス粒子の産生量が上昇した。これは L-FABP の減少は HCV 感染性粒子の産生に有利であることを示唆しており、HCV が HNF-1 $\alpha$  の量を減少させ、L-FABP 量を減少させることにより、ウイルス産生に有利な環境を作っていることが示唆された。L-FABP のウイルス産生における役割については、今後さらに解析する必要がある。

HCV NS5A の Val121 が HNF-1 $\alpha$  との結合および分解に重要であることが示された。以前、NS5A Val121 が FKBP8 との相互作用に重要で HCV 複製制御に深く関与することが報告されているが、同じアミノ酸が別の宿主因子 HNF-1 $\alpha$  との相互作用にも必須であり、病原性に関与することが示唆された。また、NS5A 阻害剤の Daclatasvir は HCV 複製を抑制し、HNF-1 $\alpha$  の量は回復するので、NS5A-HNF-1 $\alpha$  を介した代謝異常に Daclatasvir が有効であることが示唆された。今後、臨床的に Daclatasvir 使用で糖脂質代謝が改善するか解析する必要がある。

#### E. 結論

- 1) HCV を感染させた肝細胞では L-FABP の mRNA および蛋白レベルが著明に減少した。
- 2) 培養肝細胞の内在性 L-FABP の発現を siRNA でノックダウンしたところ、上清中の HCV 感染価が上昇した。
- 3) HCV NS5A 上の aa 121-126 が HNF-1 $\alpha$  結合に重要であり、特に Val121 が必須であった。また、HNF-1 $\alpha$  上の POU5 domain が NS5A との結合に重要である。
- 4) NS5A 阻害剤 Daclatasvir を培養液中に

添加すると HCV により分解が促進された HNF-1 $\alpha$  の量が回復した。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ratnoglik SL, Jang DP, Aoki C, Sudarmono P, Shoji I, Deng L, and Hotta H. Induction of cell-mediated immune responses in mice by DNA vaccines that express hepatitis C virus NS3 mutants lacking serine protease and NTPase/RNA helicase activities., *PLoS One*, 2014, 9 (6): e98877.
- 2) 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*, 2014, 58 (3): 188-94.
- 3) 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*, 2014, 58 (3): 180-7.
- 4) 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*, 2014, 21 (1): 1-16.

## 2. 学会発表

- 1) Deng L, Gan X, Shinozaki K, Shoji I, Hotta H. Peroxiredoxin 1 is a novel binding partner of HBx and a positive regulator of hepatitis B virus transcription. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- 2) Deng L, Hayashi M, Shinozaki K, Chen M, Shoji I, Hotta H. Interaction between HBx and lysine methyltransferase SMYD3, a novel HBx-interacting protein. 2014 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Los Angeles, USA, September 3-6, 2014.
- 3) Deng L, Chen M, Shoji I, Hotta H. HCV induces Bim/Bax-mediated apoptosis through the ROS/JNK signaling pathway. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 4) Matsuoka Y, Deng L, Asahi A, Aoki C, Shoji I, Hotta H. HCV dysregulates Smad2/3- and Smad1/5-signaling pathways of the TGF- $\beta$  superfamily. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 5) Sianipar IR, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. Physical and functional interaction between an OTU deubiquitinase and HCV NS5A protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 6) Matsui C, Shoji I, Sianipar IR, Minami N, Deng L, Hotta H. Determinants of specific interaction between hepatitis C virus NS5A and HNF-1 $\alpha$  protein. 21th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Banff, Canada, September 7-11, 2014.
- 7) Deng L, 甘 翔, 篠崎健太, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質の新規結合因子抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン 1(Prdx1)の同定と機能解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 8) 林美和子, Deng L, 篠崎健太, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. B型肝炎ウイルス X タンパク質とヒストンメチル基転移酵素 SMYD3 の相互作用の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 9) 松岡陽子, Deng L, 朝日朱美, 青木千恵, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルス感染による TGF- $\beta$  スーパーファミリーにおける Smad2/3 と Smad1/5/9 経路の脱制御とその分子機序の解明. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11月10-12日, 2014年.
- 10) 甘 翔, Deng L, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C型肝炎ウイルスによるミト



コンドリア介在性アポトーシス誘導機構の解明. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.

- 11) 松井千絵子, 勝二郁夫, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染による Hepatocyte nuclear factor (HNF)  $-1\alpha$  蛋白質の選択的分解機構. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 12) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I, Hotta H. HCV NS5A interacts with lysine methyltransferase SMYD3 and transcriptionally activates the protein disulfide isomerase gene *AGR3*. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.
- 13) Sianipar I R, Shoji I, Matsui C, Minami N, Deng L, Hotta H. HCV NS5A protein physically and functionally interacts with an OTU deubiquitinase. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜, 11 月 10-12 日, 2014 年.

- 14) 勝二郁夫, 松井千絵子, Sianipar IR, 南 奈苗, Deng L, 堀田博. C 型肝炎ウイルスによる HNF- $1\alpha$  蛋白質の選択的分解機構の解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 横浜, 11 月 25-27 日, 2014 年.

H. 知的所有権の出願・取得状況  
特になし

## C型肝炎関連肝癌と代謝因子

研究分担者 **森屋 恭爾** 東京大学医学部感染制御学 教授

研究要旨：C型肝炎 NASH(非アルコール性肝炎)において肝発癌と治療において脂質、糖質、アミノ酸、鉄代謝の重要性が認識されている。今回HCV core蛋白発現細胞の検討からcore蛋白がca uniporterを介して肝細胞ミトコンドリア内に鉄を輸送しミトコンドリア障害とfenton反応により間接的活性酸素を発生することを示した。またこのca uniporter阻害薬により酸化ストレス発生が抑制されあらたなHCV 肝発癌抑制薬の候補が得られた。

### A. 研究目的

C型肝炎 NASH(非アルコール性肝炎)において肝発癌と治療において脂質、糖質、アミノ酸、鉄代謝正常化の重要性が認識されている。とくにHCV 肝発癌においてmitochondria障害とともに酸化ストレスが増大し肝発癌の原因として認識されているがその詳しい機序は不明である。今回HCV core蛋白発現細胞を中心に鉄投与時酸化ストレス発生メカニズムを検討した。

### B. 研究方法

HCV core蛋白発現細胞およびtransgenic mouse モデルを使用し鉄投与による酸化ストレスの増大とCa uniporter抑制による酸化ストレス抑制の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する倫理規定を順守し苦痛を与得ることの内容配慮した。

### C. 研究結果

HCV core蛋白はCa uniporterを介して

mitochondria 内への鉄輸送をもたらしmitochondria障害(膜電位変化)によりfenton反応を介して酸化ストレスをもたらすことが判明した。Ca uniporterの阻害薬により酸化ストレス産生は抑制された。

### D. 考察

HCV core 蛋白とmitochondria 内の鉄による酸化ストレス増大機序が示されHCV 発癌抑制薬剤の候補が得られた。

### E. 結論

HCV core による酸化ストレス発生を抑制する標的分子としてca uniporter が得られ、肝発癌抑制の可能性が示された。

### F. 研究発表

論文発表

- 1) Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, Koike K, Horie T. Mitochondrial iron accumulation

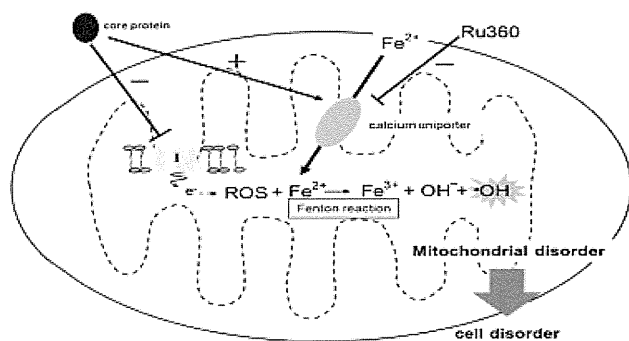
- exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014 Dec 27;282(3):237-243. PMID:25545986
- 2) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, Kato T. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection. **World J Gastroenterol**. 2014 Mar 21;20(11):3044-9. PMID:24659896
- 3) 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
- 4) 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 Ma 15. PMID:24569264.
- Koike K Expression of Bnip3, a mitochondrial autophagy (mitophagy)-related gene, is decreased in cells expressing the core protein of hepatitis C virus. 21st International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, Banff, 2014
- 3) Ogishi M, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Gatanaga H, Moriya K & Koike K. Next-generation sequencing revealed the prevalence of multi-geno/subtypic multiple infection of hepatitis C virus in hemophiliac patients in Japan. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. The Liver Meeting 2014, Boston, 2014

#### ガイドライン

日常生活でウイルス肝炎の伝播を防止するためのガイドライン（一般の人向け）  
 集団の場における肝炎ウイルス感染予防ガイドライン作成のための研究班  
 正木尚彦、森兼啓太、森屋恭爾、八橋弘、四柳宏 厚生労働省 2014年

#### 学会発表

- 1) Yotsuyanagi H, Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Tanaka S, Yamamoto M, Kokudo N, Moriya K, Arii S, Itoh F and Koike K Integrated hepatitis B virus DNA is epigenomically affected by the methylation status of the human genome. 11th Single Topic conference, Hiroshima, 2014
- 2) Tsutsumi T, Okushin K, Enooku K, Fujinaga H, Yotsuyanagi H, Moriya K, G. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし



Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein. Toxicol Appl Pharmacol.より抜粋

## 肝細胞がん患者において体組成が予後に与える影響に関する研究

研究分担者 建石 良介 東京大学大学院医学系研究科 特任講師

研究要旨：肝細胞癌において、低体重群は通常体重群に比較して肝発癌リスクは低いが発癌後の予後は不良である。この矛盾を解明するために、体組成の構成要素である骨格筋量、内臓脂肪量、皮下脂肪量、筋肉内脂肪量を測定し、肝癌治療後の予後との関係を検討した。結果、骨格筋量が少ないほど、内臓/皮下脂肪面積が大きいほど、筋肉内脂肪量が多いほど有意に予後不良であった。低体重群では、内臓肥満や筋肉内脂肪が少ない一方で、予後不良のサルコペニアが多く含まれることで、通常体重群よりも予後が悪くなっていることが考えられる。

### A. 研究目的

肥満は、肝細胞癌発症危険因子であることが、我々を含む内外の複数の施設から報告されている。一方で、一度発癌するとBody Mass Index(BMI)で表される肥満度と肝細胞癌治療後の予後には、V字型の関係があり、肥満群のみならず低体重群の予後も通常体重群と比較して不良である。本研究では、身長と体重で表されるBMIの構成要素である筋肉、皮下脂肪、内臓脂肪を分離して計測することによって体組成のそれぞれの構成因子が肝癌患者の予後に与える影響を検討することを目的とした。

### B. 研究方法

2004年1月から2009年12月までに当院消化器内科で診断された1,257人の肝細胞癌患者の骨格筋量、筋肉内脂肪量、腹部脂肪量、腹部脂肪分布をコンピュータ断層撮影(CT)を用いて測定し、死亡をエンドポイントと

して、体組成の構成要素それぞれの最適なカットオフ値を求めた。次にこのカットオフ値を用いた多変量解析にて個々の因子の独立性を検討した。最後にBMIと各因子との関係を分析し、BMIと肝癌の治療後の予後がなぜV字型になるのかを明らかにした。

(倫理面の配慮)

本研究は文部科学省、および厚生労働省によって公表されている疫学研究に関する倫理ガイドラインに則り、東京大学医学部倫理委員会に承認を受けている(承認番号2058)

### C. 研究結果

BMI 20.0~24.9kg/m<sup>2</sup>の通常体重群に比し低体重群、肥満群ともに治療後の予後が不良であった。予後をエンドポイントとして、骨格筋量(cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)、内臓脂肪量(cm<sup>2</sup>/m<sup>2</sup>)、内臓/皮下面積比、筋肉内脂肪量(HU)のカッ

トオフ値をそれぞれ男女別に決定した。それぞれ、骨格筋量が少ないほど、内臓/皮下脂肪面積が大きいほど、筋内脂肪量が多いほど有意に予後不良であった。次に体組成の構成要素と BMI の関係を検討したところ、低体重群に骨格筋量の少ない「サルコペニア」が多く含まれ、肥満群では、内臓脂肪、筋内脂肪が有意に多いことが判明した。

#### D. 考察

低体重群では、内臓肥満や筋内脂肪が少ない一方で、予後不良のサルコペニアが多く含まれることで、通常体重群よりも予後が悪くなっていることが考えられる。

#### E. 結論

肝細胞癌患者において骨格筋量、筋肉内脂肪量、腹部脂肪量、腹部脂肪分布などの体組成構成因子は、肝機能や癌の進行度から独立した予後因子である。減量に加えて筋肉量増強を目指した食事運動療法が肝細胞癌の予後改善をもたらすかを今後検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Nakagawa H, Fujiwara N, Tateishi R, Arano T, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Impact of Serum Levels of Interleukin-6 and Adiponectin on All-Cause, Liver-Related,

and Liver-Unrelated Mortality in Chronic Hepatitis C Patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2015;30(2): 379-88.

2) Tateishi R, Okanoue T, Fujiwara N, Okita K, Kiyosawa K, Omata M, Kumada H, Hayashi N, Koike K. Clinical Characteristics, Treatment, and Prognosis of Non-B, Non-C Hepatocellular Carcinoma: A Large Retrospective Multicenter Cohort Study. *J Gastroenterol* 2014 [Epub].

3) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. Impact of Pnpla3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatol Res* 2014;44(10): E137-44.

4) Fujiwara N, Tateishi R, Nakagawa H, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K. Slight Elevation of High-Sensitivity C-Reactive Protein to Predict Recurrence and Survival in Patients with Early Stage Hepatitis C-Related Hepatocellular Carcinoma. *Hepatol Res* 2014 [EPub].

##### 2. 学会発表

1) 榎奥健一郎, 建石良介, 奥新和也, 中込良, 近藤真由子, 藤原直人, 南達也, 佐藤雅哉, 内野康志, 浅岡良成, 近藤祐嗣, 藤永秀剛, 堤武也, 森屋恭爾, 四柳宏, 小池和彦. 非 B 非 C 肝障害患者での CAP/Fibroscan 測定データの解析. 第

- 22 回日本消化器関連学会週間，神戸，2014
- 2) 建石良介，岡上武，小池和彦．糖尿病治療内容が非 B 非 C 肝癌発癌年齢に与える影響．第 22 回日本消化器関連学会週間，神戸，2014
- 3) 建石良介，岡上武，沖田極，清澤研道，小俣政男，熊田博光，林紀夫，小池和彦．本邦の非 B 非 C 肝癌における NASH/NASH 近縁疾患の実態．第 50 回日本肝癌研究会，京都，2014
- 4) 建石良介，岡上武，沖田極，清澤研道，小俣政男，熊田博光，林紀夫，小池和彦．非 B 非 C 肝細胞癌におけるメタボリックシンドローム関連因子の関与：多施設大規模研究より．第 1 回肝臓と糖尿病・代謝研究会，東京，2014
- 5) Fujiwara N, Tateishi R, Nakagomi R, Kondo M, Mikami S, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Yoshida H, Shiina S, and Koike K. Underweight is an independent predictor for poor survival in patients with HCV-related hepatocellular carcinoma. The 23rd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Brisbane, 2014
- 6) Fujiwara N, Tateishi R, Ryo Nakagomi, Mayuko Kondo, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, and Koike K. Associations between body mass index, body composition and survival in patients with hepatocellular carcinoma. International Liver Cancer Association 8th Annual Conference. Kyoto, 2014
- 7) Fujiwara N, Tateishi R, Ryo Nakagomi, Mayuko Kondo, Minami T, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, and Koike K. High Sensitivity C-Reactive Protein is an Independent Predictor for Recurrence and Survival after Curative Treatment among Patients with HCV-related Hepatocellular Carcinoma in Early Stage. International Liver Congress / 49th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL). London, 2014
- 8) Tateishi R, Okanoue T, Okita Kiwamu, Kiyosawa Kendo, Omata M, Kumada Hiromitsu, Hayashi Norio, Koike K. Role of Occult HBV Infection in the Development of non-B, non-C Hepatocellular Carcinoma: Analysis from a Large Retrospective Multicenter Cohort Study. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Boston, 2014
- H. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Watanabe Y, Yamamoto H, Oikawa R, Toyota M, Yamamoto M, Kokudo N, Tanaka S, Arii S, Yotsuyanagi H, <u>Koike K</u> , Itoh F.	DNA methylation at hepatitis B viral integrants is associated with methylation at flanking human genomic sequences	Genome Res	25	328-337	2015
Sekine S, Ito K, Watanabe H, Nakano T, Moriya K, Shintani Y, Fujie H, Tsutsumi T, Miyoshi H, Fujinaga H, Shinzawa S, <u>Koike K</u> , Horie T	Mitochondrial iron accumulation exacerbates hepatic toxicity caused by hepatitis C virus core protein	Toxicol Appl Pharmacol	282	237-243	2015
Sato M, Hikita H, Hagiwara S, Sato M, Soroida Y, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Kojima S, Matsuura T, Yotsuyanagi H, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H	Potential associations between perihepatic lymph node enlargement and liver fibrosis, hepatocellular injury, or hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B virus infection	Hepatology Res			[Epub ahead of print]
Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, <u>Koike K</u>	Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma	World J Hepatol	7 (1)	1-6	2015
Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Shibata C, Yoshikawa T, Takata A, Muroyama R, Kowatari N, Sato M, Kato N, Kuroda S, <u>Koike K</u>	Specific delivery of microRNA93 into HBV-replicating hepatocytes downregulates protein expression of liver cancer susceptible gene MICA	Oncotarget	5 (14)	5581-90	2014
Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, Dhar D, Ogata H, Zhong Z, Valasek MA, Seki E, Hidalgo J, <u>Koike K</u> , Kaufman RJ, Karin M.	ER Stress Cooperates with Hypernutrition to Trigger TNF-Dependent Spontaneous HCC Development	Cancer Cell	26	331-343	2014
Asaoka Y, Tateishi R, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, <u>Koike K</u>	Frequency of and predictive factors for vascular invasion after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma	PLoS One	9(11)	e111662	2014
Shibata C, Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Muroyama R, Kato N, Yoshikawa T, Takata A, <u>Koike K</u>	The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels	Virology	462-463	42-48	2014
Kondo M, Ishizawa T, Enooku K, Tokuhara Y, Ohkawa R, Uranbileg B, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Kokudo N, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H	Increased serum autotaxin levels in hepatocellular carcinoma patients were caused by background liver fibrosis but not by carcinoma	Clin Chim Acta	433	128-134	2014
Nguyen T, Xu J, Chikuma S, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, <u>Koike K</u> , 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	26(7)	397-406	2014



Kumada H, Suzuki Y, Ikeda K, Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, Ido A, Yamamoto K, Takaguchi K, Izumi N, <u>Koike K</u> , Takehara T, Kawada N, Sata M, Miyagoshi H, Eley T, McPhee F, Damokosh A, Ishikawa H, Hughes E	Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection	Hepatology	59(6)	2083-2091	2014
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	Int J Cancer	135(4)	871-879	2014
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	J Gastroenterol	49(4)	748-754	2014
Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, Taguri M, <u>Koike K</u>	Impact of IL28B Genetic Variation on HCV-Induced Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis: A Meta-Analysis	PLoS One	9(3)	e91822	2014
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	J Gastroenterol	49(2)	173-184	2014
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, <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	Int J Cancer	134(9)	2189-2198	2014
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	Proc Natl Acad Sci	111(3)	1090-1095	2014
Yuhashi K, Ohnishi S, Kodama T, <u>Koike K</u> , Kanamori H	In vitro selection of the 3'-untranslated regions of the human liver mRNA that bind to the HCV nonstructural protein 5B	Virology	450-451	13-23	2014
Yasui K, Kawaguchi T, Shima T, Mitsuyoshi H, Seki K, Sendo R, Mizuno M, Itoh Y, Matsuda F, <u>Okanoue T</u> .	Effect of PNPLA3 rs738409 variant (I148M) on hepatic steatosis, necroinflammation, and fibrosis in Japanese patients with chronic hepatitis C	J Gastroenterol			2014 Nov 28. [Epub ahead of print]

Yamaguchi K, Nishimura T, Ishiba H, Seko Y, Okajima A, Fujii H, Tochiki N, Umemura A, Moriguchi M, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Yasui K, Minami M, <u>Okanoue T</u> , Itoh Y.	Blockade of interleukin 6 signaling ameliorates systemic insulin resistance through upregulation of glucose uptake in skeletal muscle and improves hepatic steatosis in high-fat diet mice.	Liver Int			2014 Jul 26. Doi: 10.1111/liv.12645. [Epub ahead of print]
Shima T, Seki K, Umemura A, Ogawa R, Horimoto R, Oya H, Sendo R, Mizono M, <u>Okanoue T</u> .	Influence of life-style-related diseases and age on the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease.	Hepatol Res			2014 Jun 30. Doi 10.1111/hepr.12384. [Epub ahead of print]
Tateishi R, <u>Okanoue T</u> , Fujiwara N, Okita K, Kiyosawa K, Omata M, Kumada H, Hayashi N, Koike K.	Clinical; characteristics treatment and prognosis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma: a large retrospective multicenter cohort study.	J Gastroenterol			2014 Jun 15. [Epub ahead of print]
Kessoku T, Ogawa Y, Yoneda M, Imajo K, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Chayama K, Tanaka S, Fujimoto K, Anzai K, Saibara T, Sata M, Itoh Y, Nakajima A, <u>Okanoue T</u> ; Japan Study Group of NAFLD.	Simple scoring system for predicting cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease.	World J Gastroenterol	20	10108-10114	2014
Ono M, Ogasawara M, Hirose A, Mogami S, Ootake N, Aritake K, Higuchi T, Okamoto N, Sakamoto S, Yamamoto M, Urade Y, <u>Saibara T</u> , Oben JA.	Bofutsushosan, a Japanese herbal (Kampo) medicine, attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice.	J Gastroenterol	49	1065-1073	2014
Taketani H, Sumida Y, Tanaka S, Imajo K, Yoneda M, Hyogo H, Ono M, Fujii H, Eguchi Y, Kanemasa K, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, <u>Saibara T</u> , Fujimoto K, Nakajima A	The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease.	J Gastroenterol	49	1163-1174	2014
Kessoku T, Ogawa Y, Yoneda M, Imajo K, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Chayama K, Tanaka S, Fujimoto K, Anzai K, <u>Saibara T</u> , Sata M, Itoh Y, Nakajima A, <u>Okanoue T</u> ; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD).	Simple scoring system for predicting cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease.	World J Gastroenterol	20	10108-10114.	2014
Tanaka K, Hyogo H, Ono M, Takahashi H, Kitajima Y, Ono N, Eguchi T, Fujimoto K, Chayama K, <u>Saibara T</u> , Anzai K, Eguchi Y, Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD).	The upper limit of normal serum alanine aminotransferase levels in Japanese subjects.	Hepatol Res	44	1196-1207	2014

Nakahara T, Hyogo H, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Imajo K, Aikata H, Tanaka S, Kanemasa K, Fujimoto K, Anzai K, <u>Saibara T</u> , Sata M, Nakajima A, Itoh Y, Chayama K, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD).	Type 2 diabetes mellitus is associated with the fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease in a large retrospective cohort of Japanese patients.	J Gastroenterol	49	1477-1484	2014
Noto H, Tokushige K, <u>Hashimoto E</u> , Taniai M, Shiratori K.	Questionnaire survey on lifestyle of patients with nonalcoholic steatohepatitis.	J Clin Biochem Nutr.	55	191-195	2014
Kogiso T, Nagahara H, <u>Hashimoto E</u> , Ariizumi S, Yamamoto M, Shiratori K.	Efficient induction of apoptosis by weel kinase inhibition in hepatocellular carcinoma cells.	PLoS One	24	e100495.	2014
Matsushita N, <u>Hashimoto E</u> , Tokushige K, Kodama K, Tobari M, Kogiso T, Torii N, Taniai M, Shiratori K, Murayama H.	Investigation of ornithine carbamoyltransferase as a biomarker of liver cirrhosis.	Intern Med.	53	1249-1257	2014
Tokushige K, <u>Hashimoto E</u> , Horie Y, Taniai M, Higuchi S.	Hepatocellular carcinoma based on cryptogenic liver disease: The most common non-viral hepatocellular carcinoma in patients aged over 80 years.	Hepato Res.	Jun 13	doi: 0.1111/hepr.12372.	2014
Okajima C, Arie S, <u>Tanaka S</u> , Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanabe M.	Prognostic role of Child-Pugh score 5 and 6 in hepatocellular carcinoma patients who underwent curative hepatic resection.	American Journal of Surgery	209(1)	199-205.	2015
Kudo A, <u>Tanaka S</u> , Ban D, Matsumura S, Irie T, Ochiai T, Nakamura N, Arie S, Tanabe M.	Alcohol consumption and recurrence of non-B or non-C hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a propensity score analysis.	Journal of Gastroenterology	49(9)	1352-1361.	2014
Katsuta E, <u>Tanaka S</u> , Mogushi K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Tanabe M, Arie S.	Age-related clinicopathological and molecular features of patients received curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma.	American Journal of Surgery	208(3)	450-456.	2014
Ogawa K, <u>Tanaka S</u> , Matsumura S, Murakata A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanabe M, Arie S.	EpCAM-targeted therapy for human hepatocellular carcinoma.	Annals of Surgical Oncology	21(4)	1314-1322.	2014
Matsunaga H, <u>Tanaka S</u> , Aihara A, Ogawa K, Matsumura S, Murakata A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Arie S, Tanabe M.	A novel therapeutic combination targeting sequentially Aurora B and Bcl-xL in hepatocellular carcinoma.	Annals of Surgical Oncology			in press

<u>Tanaka S.</u>	Molecular pathogenesis and targeted therapy of pancreatic cancer.	Annals of Surgical Oncology			in press
<u>Tanaka S.</u>	Molecular pathogenesis and targeted therapy of pancreatic cancer.	Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences			in press
Hashimoto S, Kubota N, Sato H, Sasaki M, Takamoto I, Kubota T, Nakaya K, Noda M, <u>Ueki K</u> , Kadowaki T	Insulin Receptor Substrate-2 (Irs2) in Endothelial Cells Plays a Crucial Role in Insulin Secretion	Diabetes		Oct 2. pii: DB_140432. [Epub ahead of print]	2014
Moller JB, Dalla Man C, Overgaard RV, Ingwersen SH, Tornøe CW, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, <u>Ueki K</u> , Lyngø J, Vasconcelos NM, Pedersen BK, Kadowaki T, Cobelli C	Ethnic differences in insulin sensitivity, beta-cell function, and hepatic extraction between Japanese and Caucasians: a minimal model analysis	J Clin Endocrinol Metab	99	4273-4280	2014
Awazawa M, Futami T, Sakada M, Kaneko K, Ohsugi M, Nakaya K, Terai A, Suzuki R, Koike M, Uchiyama Y, Kadowaki T, <u>Ueki K</u>	Deregulation of Pancreas-Specific Oxidoreductin ERO1beta in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus	Mol Cell Biol	34	1290-1299	2014
<u>Akuta N</u> , Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Utility of telaprevir-resistant variant detection for prediction of treatment efficacy in HCV genotype 1.	J Clin Microbiol.	52	193-200	2014
<u>Akuta N</u> , Suzuki F, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H.	Evolution of simeprevir-resistant variants over time by ultra-deep sequencing in HCV genotype 1b.	J Med Virol.	86	1314-1322	2014
Sezaki H, Suzuki F, Hosaka T, <u>Akuta N</u> , Fukushima T, Hara T, Kawamura Y, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H.	Effectiveness and safety of reduced-dose telaprevir-based triple therapy in chronic hepatitis C patients.	Hepatol Res.	44	163-171	2014
Arase Y, Kobayashi M, Kawamura Y, Suzuki F, Suzuki Y, <u>Akuta N</u> , Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T.	Impact of virus clearance for the development of hemorrhagic stroke in chronic hepatitis C.	J Med Virol.	86	169-175	2014
Ikeda K, Kawamura Y, Kobayashi M, Fukushima T, Sezaki H, Hosaka T, <u>Akuta N</u> , Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H.	Prevention of disease progression with anti-inflammatory therapy in patients with HCV-related cirrhosis: a Markov model.	Oncology.	86	295-302	2014