

D. 考察

現在 *PNPLA3* は NAFLD の発症に関与する遺伝子として多く GWAS での Validation が行われている。 *SMM50* 遺伝子はミトコンドリア機能に影響を及ぼし、 *PARVB* 遺伝子はインテグリンに作用し細胞外マトリックスに影響を及ぼすため NAFLD の線維化に影響を及ぼしていると考えられる。本研究から *PNPLA3* と隣接する *SMM50* 遺伝子、 *PARVB* 遺伝子も関与し NAFLD 病態に影響を及ぼすと考えられる。

今後はそれぞれの機能解析を行う必要がある。

E. 結論

今年度は関連施設の協力のもと非 B 非 C 肝臓がんの検体を集めている。これを用いて今回のような GWAS 解析や、網羅的メチル化解析を開始している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoneda M, Thomas E, Sumida Y, Imajo K, Hyogo H, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Eguchi Y, **Nakajima A**. Uric acid levels decrease with fibrosis progression in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Corresponding Author: Dr. Masato Yoneda Clin Biochem. 2014 Aug;47(12):1138-9. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.04.026.
2. Kessoku T, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Hyogo H, Ono M, Kawaguchi T, **Nakajima A**; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). Insulin Resistance Correlated With the Severity of Liver Histology in Japanese NAFLD Patients: A Multicenter Retrospective Study. J Clin Gastroenterol. 2015 Feb;49(2):169-70. doi: 10.1097/MCG.0000000000000186.
3. 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**, Jsg-NaflD TO. Simple scoring system for predicting cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol. 2014 Aug 7;20(29):10108-14.

doi: 10.3748/wjg.v20.i29.10108.

4. Yoneda M, Imajo K, Saito S, **Nakajima A**. Screening of nonalcoholic fatty liver disease in patients with coronary heart disease by transient elastography: proceed with caution. Wiener klinische Wochenschrift. 2015 Jan;127(1-2):75-6. doi: 10.1007/s00508-014-0621-6.

- 1) 作成協力者：結束貴臣、留野渉、今城健人、米田正人、小川祐二、作成委員会 委員：**中島淳** NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014 編集：日本消化器病学会 南江堂 2014 年 4 月発行

- 2) 監修 **中島淳** 見て読んでわかる NASH/NAFLD 診療 - かかりつけ医と内科医のために 発行所 株式会社 診断と治療社 2014 年 9 月 1 日発行

2. 学会発表

- 1) 今城 健人、小川 祐二、**中島淳** 微量エンドトキシンは肝MTTP抑制による脂質排泄障害を介して脂肪肝炎病態進展に関与する 第100回日本消化器病学会総会 シンポジウム8 生活習慣病と消化器疾患・病態生理学の新たな展開 平成26年4月23日 東京
- 2) 結束 貴臣、今城健人、**中島淳** 脂肪肝形成とインスリン抵抗性、双方を同時に惹起する microRNA27b の発見～NASH・DM 発症における新規メカニズムの解析～ 第 50 回日本肝臓学会総会 PD1—4 (追加発言) パネルディスカッション1 DM と NAFLD・NASH の病態を考える：診断と治療の新たな展開

平成 26 年 5 月 29 日 東京

- 3) 小川 祐二、今城健人、中島淳 肝疾患における自然免疫の役割—最新知見と今後の展開—第 50 回日本肝臓学会総会 WS10—8 ワークショップ 10 パルミチン酸単独投与による肝臓における自然免疫応答についての検討
平成 26 年 5 月 29 日 東京

- 4) 中島淳 微量腸内細菌由来エンドトキシンによる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 発生機序 第 14 回日本抗加齢医学会総会 シンポジウム 27 消化管からアンチエイジングを考える～マイクロバイオームと腸内環境～
平成 26 年 6 月 8 日 大阪

- 5) Kessoku T, Honda Y, Ogawa Y, Imajo K, Yoneda M, Nakajima A PLALA SCORE PREDICT CIRRHOSIS PATIENT IN NONALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE 22nd United European Gastroenterology Week Posters in the Spotlight Clinical management of patients with liver cirrhosis October 20, 2014 Vienna, Austria

- 6) Kessoku T, Honda Y, Ogawa Y, Imajo K, Nakajima A RESVERATROL IMPROVES THE PATHOGEN-ESIS OF NONALCOHOLIC STEATOHEPATITIS THROUGH INHIBITION OF ENDOTOXIN-INDUCED LIVER INFLAMATION AND FIBROSIS 22nd United European Gastroenterology Week Free Paper Session: Immunopathogenesis of pancreatitis and hepatitis October 20, 2014 Vienna, Austria

- 7) Ogawa Y, Honda Y, Kessoku T, Tomeno W, Imajo K, Mawatari H, Saito S, Nakajima A LIPOTOXICITY IN LIVER INDUCED BY PALMI-TATE IN VIVO 22nd United European Gastroenterology Week Free Paper Session Liver steatosis: The road from inflammation to fibrosis October 21, 2014 Vienna, Austria

- 8) 結束 貴臣、今城 健人、中島淳 microRNA-27b が引き起こす NAFL, NASH 双

方への発症メカニズム解明と治療への応用
2014 年度日本消化器関連学会週間 (JDDW 2014) シンポジウム 4(肝臓学会・消化器病学会合同)NAFLD/NASH の病態解析と新規治療
平成 26 年 10 月 23 日 神戸

- 9) 小川 祐二、今城 健人、中島淳 パルミチン酸単独投与による肝臓への炎症細胞浸潤についての検討 2014 年度日本消化器関連学会週間 (JDDW 2014) シンポジウム 12(消化器病学会・消化器内視鏡学会・肝臓学会合同)生活習慣病と脂質・胆汁酸代謝 平成 26 年 10 月 24 日 神戸

- 10) 中島淳 非アルコール性脂肪肝炎における腸内細菌由来エンドトキシンへの過剰応答性 第 45 回日本消化吸収学会総会 主題セッション①「腸内細菌叢と生活習慣病：ベンチからベッドサイドまで」 平成 26 年 11 月 22 日 東京

- 11) 留野 渉、中島淳、斉藤 聡 高齢者におけるペグインターフェロン・リバビリン・プロテアーゼ阻害薬 3 剤併用療法における治療効果の検討 第 40 回日本肝臓学会東部会 パネルディスカッション 3 C 型肝炎：3 剤併用療法の Overview 平成 26 年 11 月 28 日 東京

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の
手法を用いた宿主因子の解析に関する研究

研究分担者：近藤 泰輝 東北大学病院 消化器内科 助教

分担研究課題：C 型ウイルス性肝炎における microRNA の発現プロファイリングの
特徴とその役割

研究要旨：次世代シーケンサーにて血清内miRNAの網羅的な解析を行い、C型慢性肝炎に特徴的なmiRNA発現解析を行った。また、一部PBMC内でのmiRNA発現解析も行い、血清中の発現パターンと比較した。C型肝炎特異的に発現変動がみられたものが5つあったが、その中にPBMC内で強く発現しているmiRNAであるmiR146b-5pがあった。PBMCをそれぞれ免疫細胞分画に分離してmiRNAの発現解析を行ったところCD14陽性単球系細胞にて強く抑制されていた。そこで、単球系細胞株であるTHP-1細胞を用いてmiR146b-5pのノックダウンとノックインを行い、機能解析を行った。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス感染症に特徴的なmiRNA発現を次世代シーケンサーにて網羅的に解析することにより発見するとともに、miRNA発現の病態における意義を検討する。

B. 研究方法

C型慢性肝炎(CH-C)20例、B型慢性肝炎(CH-B)20例、健常者(H)10例で検討を行った。血清800μlよりTrizol LSにてTotal RNAを抽出した。TruSeq Small RNA Sample Preparation kitにてライブラリーを作成し、single end 32塩基3サンプル/1レーンでIllumina GA IIxにて読み取りを行った。データ量が膨大となるため、各種ソフトウェアを用いて解析した。シーケンスデータからクオリティチェックを行い、アダプター配列を除去した後miRBaseへマッピングし発現量の計算を行った。

個々のmiRNAについてマッチしたリード数を集計、サンプル毎の総マップリード数(100万リード当たり)で正規化し、発現量を計算。サンプルのばらつきはTMM法により正規化した。3群で発現量に差のあったmiRNAをANOVAで多群比較を行いP-valueを計算しFDRを計算することで多重検体の補正を行い、FDR<0.1の基準でヒートマップを作成した。次にC型肝炎特異的に変動のあったmiR146b-5pの発現の確認を各種肝疾患の血清とPBMCから抽出したRNAを用いて行った。またPBMCから各種免疫細胞を磁気ビーズにて分離し、RNAを抽出し発現解析を行った。また、THP-1細胞株を用いてmiR14b-5pのmimicとinhibitorを導入し機能解析を行った。

C. 研究結果

得られたリード数は1症例平均約1000万リードでmiRBaseへマッピングできたのは約170万リ

ードであった。血清内においてC型慢性肝炎において、低発現量を示した、5つのmiRNAは、hsa-miR181a-2-3p, hsa-miR-374a-3p, hsa-miR-374a-5p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR204-5pであった。次に、PBMC内でのmiRNA発現と血清内のmiRNAの発現の相関関係を4症例にて確認を行うとPBMC内で高発現しているmiRNAの中にhsa-miR-146b-5pがあった。そのため、各種肝疾患の血清とPBMCからRNAを抽出しmiR146b-5pの発現を解析した。結果、C型肝炎患者の血清とPBMCで有意な低下を確認した。PBMCの中では、CD14陽性単球細胞で特に低下していた。この低下は治療によりウイルスが排除されると有意に改善することが分かった。次に単球系細胞株であるTHP-1細胞にmiR146-5pのmimicとinhibitorを導入し、CXCL10、TGF-beta、IL10のmRNAをreal-time PCRにて定量した。結果inhibitorを導入するとCXCL10とTGF-beta、IL10発現が有意に増加した。

D. 考察

他肝疾患と比較してC型肝炎において低発現をするmiRNAを同定した。また、その中で、血清と比較してPBMC内で高発現しているものが確認された。血清内のmiR146b-5p量が免疫系細胞の発現変動によって影響を受ける可能性が考えられた。詳細な解析を行うとmiR146b-5pは、C型肝炎の患者の単球系細胞で強い低下がみられた。また、miR146b-5pの阻害と導入により炎症性サイトカインの発現が変化したことより病態に影響を与えている可能性が示された。

E. 結論

miR146b-5pはC型肝炎の免疫病態に影響を与えている可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **Kondo Y**, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. PLoS One. Jun 6;9(6) e98521 2014
2. **Kondo Y**, Iwata T, Haga T, Kimura O, Ninomiya M, Kakazu E, Kogure T, Morosawa T, Aiba S, Shimosegawa T. Eradication of hepatitis C virus could improve immunological status and pyoderma gangrenosum-like lesions. Hepatol Res. Feb;44(2) 238-45 2014
3. **近藤泰輝**、下瀬川徹 肝炎ウイルスの肝外病変 medicina Vol.52 No.2 248-251 2015

2. 学会発表

1. APASL 2014 Annual Meeting 3月12日-15日 -ブリスベン-
Lymphotropic HCV infection increases IL17A secreting cells and induces autoimmune-related diseases
Yasuteru Kondo, Masashi Ninomiya, Osamu Kimura, Tomoaki Iwata, Tatsuki Morosawa, Yasuyuki Fujisaka, Takayuki Kogure, Takanobu Kato, Tooru Shimosegawa
2. AASLD Annual Meeting 2014 11月7日-12日 -ボストン-
Down regulation of hsa-miR146b-5p might affect the immunopathogenesis of chronic hepatitis C patients
Yasuteru Kondo, Masashi Ninomiya, Osamu Kimura, Takayuki Kogure, Yasuhito Tanaka, Yu Nakagome, Tomoaki Iwata, Tatsuki

Morosawa, Yasuyuki Fujisaka, Tomoo
Kobayashi, Tooru Shimosegawa

3. 第40回日本肝臓学会東部会 11月27日-28
日 -東京-

パネルディスカッション 3 3 剤療法の
Overview 肝硬変症例、DAA 併用治療におけ
る1(OH)VitD3 補充療法の効果

近藤泰輝、岩田朋晃、下瀬川徹

4. 第40回日本肝臓学会東部会 11月27日-28
日 -東京-

ワークショップ 2-肝疾患のゲノム・免疫研
究を治療に繋ぐ 免疫システム攪乱による
HCV 関連自己免疫疾患の発症機序

近藤泰輝、木村修、下瀬川徹

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 26 年度）

C型肝炎の新規診断法や新規治療法を開発するためのゲノムワイド関連解析の
手法を用いた宿主因子の解析に関する研究

研究分担者：池尾 一穂 国立遺伝学研究所 生命情報研究センター 准教授

分担研究課題：次世代シーケンスデータの解析とアノテーション

研究要旨：次世代型シーケンサーを用いた大規模ゲノムシーケンスデータによるゲノムワイド解析のための、次世代シーケンスデータの解析とアノテーション技術を開発し提供する。特に、次世代ゲノムデータを用いて宿主因子を検出するための自動化パイプラインの開発提供を進めるとともに、候補変異の機能予測に必要なアノテーションを行う。また、アノテーションには、構造情報、パスウェイ解析、遺伝子乾燥後作用等、様々な情報の利用とアノテーションパイプラインの開発、次世代シーケンスデータのための関連解析技術の開発を行う。

A. 研究目的

C型肝炎新規診断法、新規治療法開発のための次世代シーケンスデータの解析とアノテーション手法の開発。

B. 研究方法

次世代シーケンスデータの大規模性と多様性に適応でき、なおかつ広く医学研究者が利用できるように解析手法とパイプラインを開発、提供する。特に、GWAS 解析の結果から、更に宿主因子を絞り込むために遺伝子相互作用、パスウェイ解析や遺伝子発現データの統合的利用を行うための解析フローを開発するとともに他の分担者と協力してゲノムワイド NGS データの解析を進める。

C. 研究結果

昨年度に引き続き、次世代シーケンスデータをもとに、宿主因子の変異を抽出し、その機能へ

の影響を、構造、代謝、転写ネットワーク等の複合的なデータをもとに予測、アノテーションするための解析フローの開発を進めた。また、既に公開されている肝ガン次世代シーケンスデータセットを用いて、解析フローの有用性の検証を進めた。また、名古屋市大の田中グループと協力して、GWAS 解析による有力候補 SNP に関して、その影響を推定するための統合解析を進めた。東北大学の近藤グループとは、少量サンプルからの NGS による遺伝子発現解析と miRNA の発現変動解析を協力して進めた（図）。

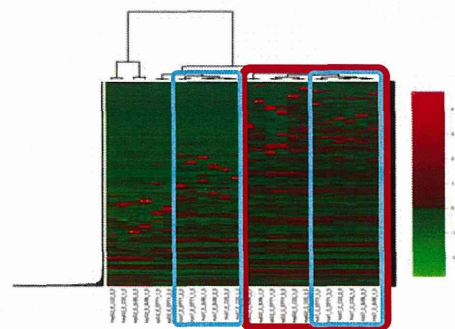


図 遺伝子発現比較によるサンプルのグルーピング

D. 考察

今後継続して方法の改良、検証が必要であるが、得られた解析結果には、有力な候補因子が含まれることが明らかになった。さらに、少量血液サンプルを用いた遺伝子発現解析に関しても、十分な精度の結果が得られることが確認された。

E. 結論

次世代シーケンサーデータにパスウェイ解析、遺伝子発現情報等を組み合わせることによって、更に因子の絞り込みが可能である可能性が示された。今後、更に方法を改良するとともに、自動化を図り、広く活用できるようにしていき、今後の大規模解析への展開を行えるような技術基盤としていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Sergeev Y, Akahori M, Furuno M, Nishino J, Ikeo K, Tsunoda K, Tsuneoka H, Iwata T. Congenital Achromatopsia and Macular Atrophy Caused by a Novel Recessive PDE6C Mutation (p.E591K). *Ophthalmic Genet.* 2015 Jan 21:1-8 [Epub ahead of print]
2. Katagiri S, Hayashi T, Kondo M, Tsukitome H, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K, Tsuneoka H, Iwata T. RPE65 Mutations in Two Japanese Families with Leber Congenital Amaurosis. *Ophthalmic Genet.* 2014 Dec12:1-9 [Epub ahead of print]
3. Katagiri S, Hayashi T, Akahori M, Itabashi T, Nishino J, Yoshitake K, Furuno M, Ikeo K, Okada T, Tsuneoka H, Iwata T.

RHO Mutations (p.W126L and p.A346P) in Two Japanese Families with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *J Ophthalmol.* 2014; 2014:210947

4. Monden Y, Fujii N, Yamaguchi K, Ikeo K, Nakazawa Y, Waki T, Hirashima K, Uchimura Y, Tahara M. Efficient screening of long terminal repeat retrotransposons that show high insertion polymorphism via high-throughput sequencing of the primer binding site. *Genome.* 2014 May; 57(5):245-52

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行一覧

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
松浦健太郎, <u>田中靖人</u> .	II. 診断編 3. 宿主遺伝子診断 A. IL28B.	竹原徹郎, 持田智, 榎本信幸.	Hepatology Practice VOL. 3 C型 肝炎の診療 を極める 基本から最 前線まで	文光堂	東京都文 京区	2014	56-62

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
*Zheng LS, Hitoshi S, Kaneko N, Takao K, Miyakawa T, <u>Tanaka Y</u> , Xia H, Kalinke U, Kudo K, Kanba S, Ikenaka K, Sawamoto K.	Mechanisms for interferon- α -induced depression and neural stem cell dysfunction.	Stem Cell Reports	3(1)	73-84	2014
*Matsuura K, <u>Tanaka Y</u> , Watanabe T, Fujiwara K, Orito E, <u>Kurosaki M</u> , Izumi N, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsuhashi H, Kusakabe A, Shinkai N, Nojiri S, Joh T, Mizokami M.	ITPA genetic variants influence efficacy of PEG-IFN/RBV therapy in older patients infected with HCV genotype 1 and favourable IL28B type.	J Viral Hepat.	21(7)	466-474	2014
*Matsuura K, Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Fujiwara K, Orito E, Iio E, Endo M, Kusakabe A, Shinkai N, Miyaki T, Nojiri S, Joh T, <u>Tanaka Y</u> .	Serum interferon-gamma- inducible protein-10 concentrations and IL28B genotype associated with responses to pegylated interferon plus ribavirin with and without telaprevir for chronic hepatitis C.	Hepatol Res.	44(12)	1208-1216	2014

*Oda K, Uto H, Kumagai K, Ido A, Kusumoto K, Shimoda K, Hayashi K, Stuver SO, <u>Tanaka Y.</u> Nishida N, <u>Tokunaga K.</u> Tsubouchi H.	Impact of a single nucleotide polymorphism upstream of the IL28B gene in patients positive for anti-HCV antibody in an HCV hyperendemic area in Japan.	J Med Virol.	86(11)	1877-1885	2014
Masaki N, Sugiyama M, Shimada N, <u>Tanaka Y.</u> Nakamuta M, Izumi N, Watanabe S, Tsubota A, Komatsu M, Masaki T, Enomoto N, Yoneda M, Murata K, Ito K, Koike K, Mizokami M.	Pretreatment prediction of the outcome of response-guided peginterferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.	J Gastroenterol Hepatol.	29(12)	1996-2005	2014
*Iijima S, Matsuura K, Watanabe T, Onomoto K, Fujita T, Ito K, Iio E, Miyaki T, Fujiwara K, Shinkai N, Kusakabe A, Endo M, Nojiri S, Joh T, <u>Tanaka Y.</u>	Influence of Genes Suppressing Interferon Effects in Peripheral Blood Mononuclear Cells during Triple Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C.	PLOS ONE	10(2)	e0118000	2015

<p>*Iio E, Matsuura K, Nishida N, Maekawa S, Enomoto N, Nakagawa M, Sakamoto N, Yatsuhashi H, <u>Kurosaki M</u>, Izumi N, Hiasa Y, Masaki N, Ide T, Hino K, Tamori A, <u>Honda M</u>, Kaneko S, Mochida S, Nomura H, Nishiguchi S, Okuse C, Itoh Y, Yoshiji H, Sakaida I, Yamamoto K, <u>Watanabe H</u>, Hige S, Matsumoto A, Tanaka E, <u>Tokunaga K</u>, <u>Tanaka Y</u>.</p>	<p>Genome-wide association study identifies a PSMD3 variant associated with neutropenia in interferon-based therapy for chronic hepatitis C.</p>	<p>Hum Genet.</p>	<p>134(3)</p>	<p>279-289</p>	<p>2015</p>
<p>渡邊綱正, <u>田中靖人</u>.</p>	<p>C型肝炎治療効果に影響する IL28B 遺伝子多型と肝内自然免疫応答の解析.</p>	<p>Nagoya Medical Journal</p>	<p>54(1)</p>	<p>45-50</p>	<p>2014</p>
<p>*Saito T, Mizuno K, Katsumi T, Tomita K, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, <u>Watanabe H</u>, Shao L, Ueno Y.</p>	<p>Transmission of hepatitis C virus from a mother to a child carrying IL28B heterozygote rs8099917 among three brothers: A long-term follow-up.</p>	<p>J Med Cases.</p>	<p>5(4)</p>	<p>227-231</p>	<p>2014</p>
<p>*Tomita K, Haga H, Ishii G, Katsumi T, Sato C, Aso R, Okumoto K, Nishise Y, <u>Watanabe H</u>, Saito T, Otani K, Ueno Y.</p>	<p>Clinical manifestations of liver injury in patients with anorexia nervosa.</p>	<p>Hepatol Res.</p>	<p>44(10)</p>	<p>E26-31</p>	<p>2014</p>

*Shirasaki T, <u>Honda M</u> , Shimakami T, Murai K, Shiomoto T, Okada H, Takabatake R, Tokumaru A, Sakai Y, Yamashita T, Lemon SM, Murakami S, Kaneko S.	Impaired interferon signaling in chronic hepatitis C patients with advanced fibrosis via the transforming growth factor beta signaling pathway.	Hepatology	60(5)	1519-1530	2014
Shimakami T, <u>Honda M</u> , Shirasaki T, Takabatake R, Liu F, Murai K, Shiomoto T, Funaki M, Yamane D, Murakami S, Lemon SM, Kaneko S.	The acyclic retinoid peretinoin inhibits hepatitis C virus replication and infectious virus release in vitro.	Sci Rep.	4	4688	2014
*Yamashita T, Kitao A, Matsui O, Hayashi T, Nio K, Kondo M, Ohno N, Miyati T, Okada H, Yamashita T, Mizukoshi M, <u>Honda M</u> , Nakanuma Y, Takamura H, Ohta T, Nakamoto Y, Yamamoto M, Takayama T, Arii S, Wang XW, Kaneko S.	Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging and alpha-fetoprotein predict prognosis of early-stage hepatocellular carcinoma.	Hepatology	60(5)	1674-1685	2014
*Terashima T, Yamashita T, Iida N, Yamashita T, Nakagawa H, Arai K, Kitamura K, Kagaya T, Sakai Y, Mizukoshi E, <u>Honda M</u> , Kaneko S.	Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy.	Hepatol Res.	in press		2014

*Selitsky SR, Baran-Gale J, <u>Honda M.</u> Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, Shirasaki T, Shimakami T, Kaneko S, Lanford RE, Lemon SM, Sethupathy P.	Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C.	Sci Rep.	5	7675	2015
*Yamada K, Mizukoshi E, Sunagozaka H, Arai K, Yamashita T, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kitamura S, Zen Y, Nakanuma Y, <u>Honda M.</u> Kaneko S.	Characteristics of hepatic fatty acid compositions in patients with nonalcoholic steatohepatitis.	Liver Int.	35(2)	582-590	2015
*Tamaki N, <u>Kurosaki M.</u> Matsuda S, Muraoka M, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y Izumi N.	Non-invasive prediction of hepatocellular carcinoma development using serum fibrosis marker in chronic hepatitis C patients.	J Gastroenterol.	49(11)	1495-1503	2014

*Tamaki N, <u>Kurosaki M.</u> Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H Izumi N.	Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients.	Hepatol Res.	in press		2015
*Kenjo A, Miyata H, Gotoh M, Kitagawa Y, <u>Shimada M.</u> Baba H, Tomita N, Kimura W, Sugihara K, Mori M.	Risk stratification of 7,732 hepatectomy cases in 2011 from the National Clinical Database for Japan.	J Am Coll Surg.	218(3)	412-422	2014
Utsunomiya T, <u>Shimada M.</u> <u>Morine Y.</u> Tajima A, Imoto I.	Specific molecular signatures of non-tumor liver tissue may predict a risk of hepatocarcinogenesis.	Cancer Sci.	105(7)	749-754	2014
*Wubetu GY, Utsunomiya T, Ishikawa D, Yamada S, Ikemoto T, <u>Morine</u> <u>Y.</u> Iwahashi S, Saito Y, Arakawa Y, Imura S, Kanamoto M, Zhu C, Bando Y, <u>Shimada M.</u>	High STAT4 expression is a better prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma after hepatectomy.	Ann Surg Oncol.	21 Suppl 4	S721-728	2014

*Zhu C, Utsunomiya T, Ikemoto T, Yamada S, <u>Morine Y</u> , Imura S, Arakawa Y, Takasu C, Ishikawa D, Imoto I, <u>Shimada M.</u>	Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) is associated with poor prognosis via activation of c-MET in hepatocellular carcinoma.	Ann Surg Oncol.	21 Suppl 4	S729-735	2014
*Utsunomiya T, <u>Shimada M.</u> , Kudo M, Ichida T, Matsui O, Izumi N, Matsuyama Y, Sakamoto M, Nakashima O, Ku Y, Takayama T, Kokudo N; Liver Cancer Study Group of Japan.	A Comparison of the Surgical Outcomes Among Patients With HBV-positive, HCV-positive, and Non-B Non-C Hepatocellular Carcinoma: A Nationwide Study of 11,950 Patients.	Ann Surg.	261(3)	513-520	2015
*Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, <u>Komori A.</u> , Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, <u>Yatsuhashi H.</u>	Elevated serum levels of Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients.	Hepatology	60(5)	1563-1570	2014
Yoneda M, Thomas E, Sumida Y, Imajo K, Hyogo H, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Eguchi Y, <u>Nakajima A.</u>	Uric acid levels decrease with fibrosis progression in patients with nonalcoholic fatty liver disease.	Clin Biochem.	47(12)	1138-1139	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, Saibara T, Sata M, Itoh Y, <u>Nakajima A</u> , Jsg-NaflD TO.	Simple scoring system for predicting cirrhosis in nonalcoholic fatty liver disease.	World J Gastroenterol.	20(29)	10108-14	2014
Kessoku T, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Hyogo H, Ono M, Kawaguchi T, <u>Nakajima A</u> ; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD).	Insulin Resistance Correlated With the Severity of Liver Histology in Japanese NAFLD Patients: A Multicenter Retrospective Study.	J Clin Gastroenterol.	49(2)	169-170	2015
Yoneda M, Imajo K, Saito S, <u>Nakajima A</u> .	Screening of nonalcoholic fatty liver disease in patients with coronary heart disease by transient elastography: proceed with caution.	Wien Klin Wochenschr.	127(1-2)	75-76	2015
* <u>Kondo Y</u> , Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T.	HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases.	PLOS ONE	9(6)	e98521	2014

* Kondo Y , Iwata T, Haga T, Kimura O, Ninomiya M, Kakazu E, Kogure T, Morosawa T, Aiba S, Shimosegawa T.	Eradication of hepatitis C virus could improve immunological status and pyoderma gangrenosum-like lesions.	Hepatology Res.	44(2)	238-245	2014
Katagiri S, Hayashi T, Kondo M, Tsukitome H, Yoshitake K, Akahori M, Ikeo K , Tsuneoka H, Iwata T.	RPE65 Mutations in Two Japanese Families with Leber Congenital Amaurosis.	Ophthalmic Genet.	in press		2014
Katagiri S, Hayashi T, Akahori M, Itabashi T, Nishino J, Yoshitake K, Furuno M, Ikeo K , Okada T, Tsuneoka H, Iwata T.	RHO Mutations (p.W126L and p.A346P) in Two Japanese Families with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa.	J Ophthalmol.	2014	210947	2014
Monden Y, Fujii N, Yamaguchi K, Ikeo K , Nakazawa Y, Waki T, Hirashima K, Uchimura Y, Tahara M.	Efficient screening of long terminal repeat retrotransposons that show high insertion polymorphism via high-throughput sequencing of the primer binding site.	Genome	57(5)	245-252	2014
Katagiri S, Hayashi T, Yoshitake K, Sergeev Y, Akahori M, Furuno M, Nishino J, Ikeo K , Tsunoda K, Tsuneoka H, Iwata T.	Congenital Achromatopsia and Macular Atrophy Caused by a Novel Recessive PDE6C Mutation (p.E591K).	Ophthalmic Genet.	in press		2015

*IV. 研究成果の別冊あり

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Mechanisms for Interferon- α -Induced Depression and Neural Stem Cell Dysfunction

Lian-Shun Zheng,^{1,2,12} Seiji Hitoshi,^{3,4,12} Naoko Kaneko,^{2,12,*} Keizo Takao,^{5,6} Tsuyoshi Miyakawa,^{5,6,7} Yasuhito Tanaka,⁸ Hongjing Xia,² Ulrich Kalinke,⁹ Koutaro Kudo,¹⁰ Shigenobu Kanba,¹¹ Kazuhiro Ikenaka,³ and Kazunobu Sawamoto^{2,*}

¹Institute of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

²Department of Developmental and Regenerative Biology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Aichi 467-8601, Japan

³Division of Neurobiology and Bioinformatics, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Aichi 444-8585, Japan

⁴Department of Integrative Physiology, Shiga University of Medical Science, Otsu, Shiga 520-2192, Japan

⁵Section of Behavior Patterns, Center for Genetic Analysis of Behavior, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Aichi 444-8585, Japan

⁶Japan Science and Technology Agency, Core Research for Evolutionary Science and Technology (CREST), Kawaguchi 332-0012, Japan

⁷Division of Systems Medical Science, Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University, Toyoake 470-1192, Japan

⁸Department of Virology and Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Aichi 467-8601, Japan

⁹Institute for Experimental Infection Research, TWINCORE, Centre for Experimental and Clinical Infection Research, a joint venture between the Helmholtz Centre for Infection Research (HZI) and the Hannover Medical School (MHH), Hannover 30625, Germany

¹⁰Yokohama Clinic, Yokohama, Kanagawa 220-0004, Japan

¹¹Department of Neuropsychiatry, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan

¹²Co-first author

*Correspondence: naokoka@med.nagoya-cu.ac.jp (N.K.), sawamoto@med.nagoya-cu.ac.jp (K.S.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.015>

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

SUMMARY

New neurons generated by the neural stem cells (NSCs) in the adult hippocampus play an important role in emotional regulation and respond to the action of antidepressants. Depression is a common and serious side effect of interferon- α (IFN- α), which limits its use as an antiviral and antitumor drug. However, the mechanism(s) underlying IFN-induced depression are largely unknown. Using a comprehensive battery of behavioral tests, we found that mice subjected to IFN- α treatment exhibited a depression-like phenotype. IFN- α directly suppressed NSC proliferation, resulting in the reduced generation of new neurons. Brain-specific mouse knockout of the IFN- α receptor prevented IFN- α -induced depressive behavioral phenotypes and the inhibition of neurogenesis, suggesting that IFN- α suppresses hippocampal neurogenesis and induces depression via its receptor in the brain. These findings provide insight for understanding the neuropathology underlying IFN- α -induced depression and for developing new strategies for the prevention and treatment of IFN- α -induced depressive effects.

INTRODUCTION

New neurons are continuously generated in the hippocampal dentate gyrus (DG) throughout life in mammals, including rodents (Altman and Das, 1965; Kaplan and Hinds, 1977; Kuhn et al., 1996), nonhuman primates (Gould et al., 1999; Kornack and Rakic, 1999), and humans (Eriksson et al., 1998; Manganas et al., 2007). In the DG, neural stem cells (NSCs) residing in the subgranular zone (SGZ), a thin cell layer between the granule cell layer (GCL) and the dentate hilus, generate transit-amplifying intermediate progenitors that give rise to new neurons (Gage, 2002; Zhao et al., 2008). The newly generated neurons then migrate into the GCL, where they differentiate into mature granule cells to be integrated into the hippocampal circuitry (Mathews et al., 2010; Toni et al., 2007; van Praag et al., 2002). Evidence suggests that neurogenesis in this region plays a role in emotional regulation (Eisch and Petrik, 2012; Samuels and Hen, 2011).

Decreased neurogenesis in the adult DG is implicated in the pathophysiology of depression, a common psychiatric

disorder. Clinical imaging studies demonstrated reduced volume and altered metabolism in the hippocampus of depressed patients (Block et al., 2009; Campbell et al., 2004; Gilbertson et al., 2002; Huang et al., 2010). Hippocampal neurogenesis is downregulated in animal models of depression induced by exposure to chronic psychosocial stress (Jacobs et al., 2000; Kempermann and Kronenberg, 2003). Conversely, chronic treatment with antidepressants enhances hippocampal neurogenesis (Anacker et al., 2011; Malberg et al., 2000; Pechnick et al., 2011), which is required for the behavioral effects of these drugs in mice (Santarelli et al., 2003). However, the relationship between neurogenesis suppression and depressive symptoms remains elusive (Airan et al., 2007; David et al., 2009; Lucasen et al., 2010). Animal models of depression induced by a single ligand and its receptor would be useful for investigating these mechanisms in vivo using genetic approaches.

Interferon- α (IFN- α), a proinflammatory cytokine with potent antiviral, antiproliferative, and immunoregulatory effects, has been widely used to treat chronic viral hepatitis and several types of malignancy (Deutsch and

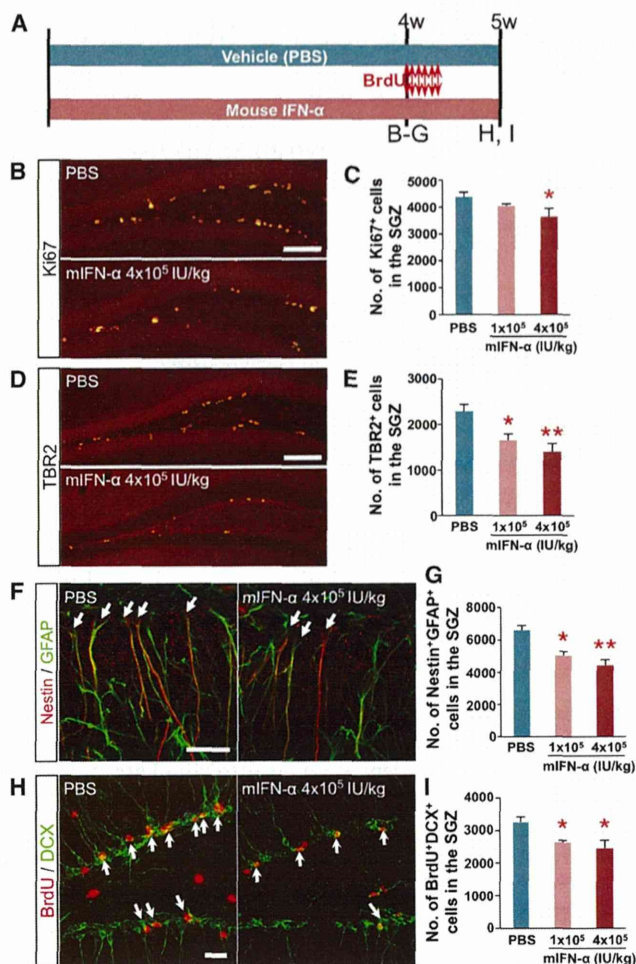


Figure 1. Chronic Treatment with mIFN- α Affects Neurogenesis in the DG of Adult Mice

(A) Experimental design. (B–E) Effect of 4-week mIFN- α treatment on SGZ proliferative activity. The numbers of Ki67⁺ cells (B and C) and TBR2⁺ cells (D and E) in the SGZ were significantly reduced in mIFN- α -treated groups compared with the PBS-treated group. $n = 7$ mice per group. (F and G) Effect of 4-week mIFN- α treatment on NSCs in the DG. The number of Nestin⁺ (red) and GFAP⁺ (green) putative NSCs in the DG (F, arrows) was significantly reduced by mIFN- α treatment (G) in a dose-dependent manner. $n = 5$ mice per group. (H and I) Effect of mIFN- α treatment on neurogenesis in the DG. During mIFN- α treatment, BrdU was injected at the beginning of the fifth week, six times every 8 hr. The number of BrdU⁺ (red) and DCX⁺ (green) cells (H, arrows) was significantly reduced in mIFN- α -treated groups (I). $n = 5$ mice per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus PBS-treated group; error bars: means \pm SEM; scale bars, 100 μ m: (B and D), 25 μ m: (F and H). See also Figure S1.

Hadziyannis, 2008; Papatheodoridis et al., 2008; Tagliaferri et al., 2005). However, long-term IFN- α treatment frequently triggers a variety of neuropsychiatric symptoms

(Dieperink et al., 2000). Depression is the most common and serious side effect, affecting approximately 30%–45% of patients receiving IFN- α treatment, resulting in occasional discontinuation of the therapy (Bonaccorso et al., 2001; Lieb et al., 2006). Despite its clinical importance, the mechanism underlying IFN- α -induced depression is still not well understood.

We previously reported that repeated IFN- α treatment suppresses cell proliferation in the SGZ of adult rats (Kaneko et al., 2006). However, little is known about how peripheral IFN- α affects brain function. Because a small fraction of peripheral IFN- α gains access to the brain (Greig et al., 1988; Smith et al., 1985), hippocampal neurogenesis can be directly affected by the increased IFN- α signaling in the brain (Wang et al., 2008). However, it is also possible that IFN- α affects brain function via secondary effectors such as humoral or cellular components of the peripheral immune system (Hayley et al., 2013; Orsal et al., 2008).

Here, we analyzed the effects of IFN- α treatment on neurogenesis and depressive behaviors using two types of interferon- α receptor (IFNAR) knockout (KO) mouse lines: a systemic KO (IFNAR^{−/−}; Müller et al., 1994) and a conditional KO in NSCs and their progenies (IFNAR^{f/f}:Nes-Cre; Detje et al., 2009). Our findings suggest that peripherally administered IFN- α directly suppresses the neurogenic function of NSCs and increases depression-like behaviors.

RESULTS

Chronic mIFN- α Treatment Reduces Cell Proliferation and Neurogenesis in the DG of Adult Mice

To investigate the effects of chronic mouse IFN- α (mIFN- α) treatment on cell proliferation in the DG, mice were intraperitoneally injected with PBS or mIFN- α daily for 2 or 4 weeks (Figures S1A–S1E available online and Figure 1A). The numbers of SGZ cells that were positive for the proliferation marker Ki67 (Figures 1B and 1C) and the neuronal progenitor marker TBR2 (Figures 1D and 1E) were significantly reduced by the 4-week, but not the 2-week, mIFN- α treatment (Figures S1A–S1C). The 4-week mIFN- α treatment also reduced the number of cells with radial glia-like morphology expressing the NSC markers Nestin and GFAP (Figures 1F and 1G). To quantify neurogenesis, the mice were injected with BrdU six times at 4 weeks of treatment and fixed at 5 weeks of mIFN- α treatment (Figure 1A). The number of BrdU⁺DCX⁺ new neurons in the DG was also significantly reduced in mIFN- α -treated mice compared with PBS-treated controls (Figures 1H and 1I).

To examine the effect of mIFN- α treatment on the survival and fate of the newly generated cells in the DG, we labeled the new neurons with bromodeoxyuridine (BrdU) just before the treatment and quantified the number of