

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び

治療法の開発等に関する研究

(H24 - 肝炎 - 一般 - 006)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小池 和彦

東京大学医学部消化器内科 教授

平成26(2013)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
肝炎等克服緊急対策研究事業  
「C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究」  
班

平成25年度 班の構成

小池 和彦	東京大学医学部消化器内科学・教授
岡上 武	大阪府済生会吹田病院・院長
西原利治 科・教授	高知大学教育研究部医療学系医学部門臨床医学系消化器内
橋本悦子	東京女子医科大学消化器内科・教授
田中真二	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・准教授
植木浩二郎	東京大学医学部糖尿病・代謝内科・准教授
芥田憲夫	虎の門病院肝臓センター・医長
川口 巧	久留米大学医学部消化器疾患情報講座・講師
松浦善治	大阪大学微生物病研究所分子ウイルス分野・教授
勝二郁夫	神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野・准教授
森屋恭爾	東京大学医学部感染制御学・教授
建石良介	東京大学医学部消化器内科学・特任講師

## 目 次

### I. 総括研究報告

- C 型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究-----5  
小池 和彦

### II. 分担研究報告

1. C 型肝炎の病態・進展に及ぼす PNPLA3 遺伝子多型-----31  
岡上 武
2. 肝発癌における PPAR- の役割に関する研究-----37  
西原 利治
3. 非アルコール性脂肪性肝障害を基盤とした肝細胞癌に関する病理組織学的検討-----41  
橋本 悦子
4. HCV および NASH による代謝パスウェイ異常と肝細胞癌の関連解析研究-----47  
田中 真二
5. インスリン抵抗性と NASH 病態の分子機構の解明に関する研究-----51  
植木浩二郎
6. C 型肝炎肝発癌における代謝要因・ウイルス要因の影響-----54  
芥田 憲夫
7. 非アルコール性脂肪性肝炎マウスモデルにおける消化管ホルモンと肝脂肪酸組成に関する研究-----58  
川口 巧
8. 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-----65  
松浦 善治
9. C 型肝炎ウイルス感染培養系による C 型肝炎関連肝がんと代謝因子に関する研究-----68  
勝二 郁夫

10. 胆汁酸による代謝変化に関する研究-----	72
森屋 恭爾	
11. 我が国における非 B 非 C 肝癌の背景因子の検討（共同研究）-----	75
建石 良介	
III. 研究成果に関連した刊行物（総説抜粋）-----	78

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
総括研究報告書

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び  
治療法の開発等に関する研究

研究代表者： 小池 和彦 東京大学消化器内科学 教授

## 研究要旨

肝細胞癌へ進展する慢性肝疾患は、我が国の保健行政、医療の最大の問題であり、現在でもなお年間3万4千人が肝癌で死亡している。C型、B型肝炎に関連した肝癌が多くを占めるが、最近では、C型、B型肝炎ともに陰性である『非B非C型肝癌』の増加傾向が見られ、対策確立が急務である。非B非C型肝癌の中では、アルコール性肝硬変(ASH)合併肝癌に加え、肥満、代謝異常と関連とする非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)合併肝癌の増加が著しい。また、糖尿病患者では肝癌が多いが、高リスク患者は不明である。アルコール摂取量からはASHとNASHのどちらにも属さない非B非C型肝癌の存在と増加も大きな問題である(非ASH非NASH非B非C型肝癌)。また、C型肝炎関連肝癌においては、肥満、糖・脂質代謝異常という代謝関連異常が肝癌発生の促進因子であることが示されてきている。そこで、C型肝炎、NASH、非ASH非NASHの非B非C型肝疾患に関連する肝癌を、「代謝関連肝癌(Metabolism-associated liver cancer, MALC)」として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝発癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝発癌制御を試みた。具体的には、1) C型肝炎肝発癌における代謝因子の重要性の解明と肝発癌抑制法の確立、2) NASHの実態解明、病態解析と肝発癌抑制法の確立、3) NASH、ASHの診断基準を満たさない非ASH非NASH非B非C型肝癌の実態解明、病態解析、高リスク群の設定、4) 糖尿病患者に発生する肝癌の病態解明と高リスク群の設定、を中心として臨床と基礎の両面からの検討を開始した。班全体研究として、日本における非B非C型肝癌の実態調査を行なった。固有の慢性肝疾患を除き、データの欠損のない2,166例を対象に16の臨床データを用いた階層別クラスタリングを行い、非B非C型肝癌は5つのカテゴリーに分別できた。近年の増加はカテゴリー1(高齢中等度飲酒男性)、5(非飲酒メタボリック男性)によるものであった。すなわち、従来考えられてきた「高度飲酒」群や「NASH」とは異なったカテゴリーの、より一般的といえる「軽度肥満、軽度～中等度飲酒」の男性が肝癌のリスクに曝されていることが初めて明らかとなった。

研究分担者（所属施設名・職名）

岡上 武（大阪府済生会吹田病院・院長）

西原利治（高知大学教育研究部医療学系  
医学部門臨床医学系消化器内科・教授）

橋本悦子（東京女子医科大学消化器内科・  
教授）

田中真二（東京医科歯科大学大学院  
医歯学総合研究科・准教授）

植木浩二郎（東京大学医学部附属病院  
糖尿病・代謝内科・准教授）

芥田憲夫（虎の門病院肝臓センター・医長）

川口 巧（久留米大学医学部消化器疾患  
情報講座・講師）

松浦善治（大阪大学微生物病研究所  
分子ウイルス分野・教授）

勝二郁夫（神戸大学大学院医学系研究科  
微生物学分野・准教授）

森屋恭爾（東京大学医学部感染制御学・  
教授）

建石良介（東京大学医学部消化器内科・  
特任講師）

#### A. 研究目的

肝細胞癌へ進展する慢性肝疾患は、我が国の保健行政、医療の最大の問題であり、なお年間3万4千人が死亡する。C型、B型肝炎に関連した癌が多くを占めるが、両者陰性の「非B非C型肝炎」の増加傾向があり対策確立が急務である。非B非C型肝炎の中では、アルコール性肝硬変(ASH)合併肝癌に加え、肥満、代謝異常と関連とする非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）合併肝癌の増加が著しい(Yasui, 2011)。糖尿病では肝

癌が多いが高リスク患者は不明である。飲酒量ではASHとNASHのどちらにも属さない非B非C型肝炎の増加も問題である(非ASH非NASH非B非C型肝炎)。一方、C型関連肝癌においては、肥満、糖・脂質代謝異常という代謝関連異常が肝癌発生の促進因子である(Koike K, 2010)。そこで、C型肝炎、NASH、非ASH非NASHの非B非C型肝炎疾患に関連する肝癌を、代謝関連肝癌(Metabolism-associated liver cancer, M ALC)として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝発癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝発癌制御を試みる。具体的には、1) C型肝炎における代謝因子解明と発癌抑制法確立、2) NASHの実態解明、病態解析と発癌抑制法確立、3) 非ASH非NASH非B非C型肝炎の実態解明、病態解析、高リスク群の設定、4) 糖尿病に発生する肝癌の病態解明と高リスク群設定、を臨床と基礎の両面から検討を行なう。

研究代表者小池は、H23年度まで『肝炎ウイルスと代謝・免疫系の相互作用に関する包括的研究』班でウイルス肝炎における代謝性変化の発生機序と肝発癌に対する影響を検討した。その結果、C型肝炎では、インスリン抵抗性や肝脂肪化が慢性肝炎進行を促進することを明らかにした。一方、小池が分担研究者であった『非アルコール性脂肪性肝疾患の病態解明と診断法、治療法の開発に関する研究』班（H20～H22年度、研究代表者岡上武）では、日本にNASHが多く存在し、肝癌の原因であることを明らかにした。これらの先駆的な研究班の成果を受けて、本研究班においてはC型肝炎

肝発癌における代謝要因の解析、NASHの病態解析、非ASH非NASH非B非C型肝炎の解析を行ない、これらの肝癌発生の抑制を図る。

## B.方法

1) 対象は済生会吹田病院と京都府立医科大学消化器内科で肝生検を施行したC型肝炎414例で、TaqMan PCRでPNPLA3のrs738409のSNPを解析し、403例(97.3%)でrs738409の遺伝子型(SNP)を解析しえた。解析対象の内訳は肝機能持続正常HCV carrier (PNALT) 36例、慢性肝炎273例、肝硬変27例、肝癌67例である。肝細胞への脂肪蓄積の程度は1%以下、1~10%, 11~33%, 34%以上の4群に分け、線維化の程度はF0(線維化なし), F1(線維化軽度), F2(線維化中等度), F3(小葉改築傾向あり), F4(肝硬変)に分類した。(岡上 武)

2) 蓄積した脂肪酸は転写因子であるPPAR- $\alpha$ の内因性ligandであることから、PPAR- $\alpha$ の慢性的活性化をもたらす、肝細胞は常時高濃度のフリーラジカルに曝されることになる。実際、PPAR- $\alpha$ のligandを長期間投与すると、マウスのみならずヒトでも肝細胞の癌化が促進(promotion)されることが知られている。そこで、今回、我々はPPAR- $\alpha$ の慢性的活性化が脂肪肝に伴う肝障害、ことにNASHの発症に重要な働きをし、肝線維化の進行、さらには肝発癌の促進に繋がるのではないかと想定し、ヒト遺伝性NASHのモデル動物(4型メラノコルチン受容体遺伝子KOマウス:MC4RKO)

とMC4R/PPAR- $\alpha$  double KOマウスを用いて、我々の仮説を検証したので報告する。雄性MC4RKOとMC4R/PPAR- $\alpha$  double KOマウス各群10匹を高脂肪食で12ヶ月間飼育し、肝臓への炎症性細胞浸潤や線維化、肝発癌の有無を比較検討した。(西原利治)

3) 1990年から2013年までに当科で経験したNAFLD 677(男58%)例中、HCCを合併し癌部および非癌部肝組織を採取したNAFLD-HCC 34例(肝切除30例、RFA時針生検2例、剖検2例) NAFLD-HCCと同時期に経験し年齢・性・組織採取方法をマッチさせたHCV-HCC34例を臨床病理学的に比較検討した。HCCの主腫瘍径・肉眼分類・分化度は34例で、組織型は肝切除例30例で評価した。SH-HCCに関しては、癌部のsteatosis, Ballooning, Mallory体、pericellular fibrosis いずれも中等度以上の所見を3項目以上認めるものと定義し、各所見の出現率を検討した。免疫組織学的検討は肝切除した30例で、早期HCC関連マーカー(HSP70, Glypican3, CD34)、肝前駆細胞マーカー(CK7,CK19)、癌幹細胞自己増殖促進分子Nanog、細胞分化・増殖抑制因子(リン酸化・非リン酸化LKB1)、酸化的DNA傷害マーカー8-OHdGに関して、癌部での染色性を評価した。統計は、数値はMann-Whitney U検定、比率はカイ2乗検定で解析し、P値0.05未満を有意差ありとした。(橋本悦子)

4) 肝癌切除検体の癌部・非癌部組織の網羅的遺伝子発現解析から、肥満度や糖尿病

歴などの代謝関連臨床因子のクラスタ解析を行い、さらに遺伝子機能 (gene ontology) 解析を行って代謝関連肝癌に特異的な遺伝子パスウェイを同定し、代謝関連肝癌の発癌及び再発リスクに対する臨床病理学的、分子生物学的意義を検証する。2000 年から 2012 年までに当科で初回肝切除を施行した肝癌 555 例を対象として、背景肝疾患別に代謝関連因子などの臨床病理学因子の検討を行った。また当教室にて保有する 153 例の肝癌切除検体の癌部・非癌部組織の網羅的遺伝子発現解析結果を、肥満度や糖尿病歴などの代謝関連臨床因子でクラスタ解析を行い、発現と相関のある遺伝子を抽出する。続いて遺伝子機能 (gene ontology) 解析を行って遺伝子パスウェイ異常を同定し、代謝関連肝癌特異的な臨床病理学的因子との相関を解明する。(田中真二)

- 5) 常法により Sdf2l1 flox マウスを樹立した。これにアデノウイルスによって Cre リコンビナーゼを発現させることによって、肝臓特異的 Sdf2l1 ノックアウトマウスを作成した。LacZ アデノウイルスを投与したマウスをコントロールとして、肝臓特異的 Sdf2l1 ノックアウトマウスの糖代謝・肝臓での ER ストレス・脂肪蓄積などを検討した。消化器内科入院中の患者において、OGTT、肝生検を施行し、生検サンプルにおいて ER ストレス関連遺伝子の発現を解析した。(植木浩二郎)
- 6) (検討 1) IFN 関連療法施行後に SVR に至った 2,660 例を対象として代謝・宿主・ウイルス要因の影響を検討した。代謝要

因からは総コレステロール・HDL コレステロール・LDL コレステロール・中性脂肪・Body mass index、宿主要因からは IL28B 遺伝子多型、ウイルス要因からは HCV-1b Core アミノ酸置換を含む 15 個の因子を検討項目として多変量解析を施行した。(検討 2) HCV-1b Core aa70 Mutant 定量系 (Q-Invader assay 法, BML) (Invader 法) を用いて抗ウイルス効果、肝発癌への影響を検討した。抗ウイルス効果に関しては HCV-1b・高ウイルス量の前治療無効 72 例を対象に、Telaprevir/PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果を評価した。更に、肝発癌に関しては RNA 持続陽性の連続 44 例を対象に、発癌前後の aa70 Mutant 頻度の経時変化を評価した。(芥田憲夫)

- 7) 本研究の目的は、GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 が NASH マウスモデルの肝障害と肝組織中の脂肪酸組成におよぼす影響を検討することである。実験動物: NASH は 6 週齢の糖尿病モデルマウス (db/db mouse) をメチオニン・コリン欠乏食で飼育することにより誘導した。プロトコール: NASH モデルマウスに対し、exendin-4 (n = 4) (20 µg/kg; AnaSpec Inc. Fremont, CA) もしくは生食 (n = 4) を腹腔内に 8 週間連日投与した。14 週目で屠殺し、摘出した肝臓をホルマリン固定もしくは、液体窒素にて凍結した。ホルマリン固定した肝臓は、hematoxylin-eosin 染色および Sudan IV 染色により、それぞれ nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity

score と肝組織中の中性脂肪含量を評価した。

脂肪酸分画：凍結肝組織より

chloroform-methanol を用いて総脂肪酸を抽出し、ガスクロマトグラフィーにより 24 の脂肪酸を測定した。脂肪酸分類：脂肪酸分画の結果より脂肪酸を分類した。  
(川口 巧)

- 8) 人工ヌクレアーゼをコードする mRNA を導入した細胞をクローニングし、ApoB あるいは ApoE のノックアウト Huh7 細胞株を樹立した。また、ApoB と ApoE のダブルノックアウト(DKO)細胞株も樹立した。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 の粒子産生に及ぼす影響を検討した。アポリポ蛋白質の 2 次構造は CLC Genomics Workbench により予測した。ApoC1 あるいは ApoE の欠損変異体を発現する DKO 細胞株を作製し、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。HCV 粒子を超遠心法で精製し、アポリポ蛋白質とウイルス粒子の結合を検討した。(松浦善治)
- 9) HCV 感染による JNK 経路と Itch 活性および脂肪滴結合蛋白の解析:HCV J6/JFH1 をヒト肝癌細胞株 Huh-7.5 細胞に感染させ 1-7 日まで細胞を回収した。ウエスタンブロット法にて JNK, c-Jun, p-c-Jun (Ser63), Itch, p-Itch (pT222), adipophilin, TIP47 の各抗体で発現レベルを比較した。2) HCV 感染による脂肪滴形成の変化:HCV J6/JFH1 を Huh-7.5

細胞に感染させ、脂肪滴を BODIPY で染色した。陰性対照の mock 細胞と脂肪滴形成の違いを解析した。3)HCV 感染による Spartin のプロセッシング:HCV J6/JFH1 を Huh-7.5 細胞に感染させ、Spartin の泳動度の変化をウエスタンブロット法で解析した。4)Spartin 内の NS3/4A プロテアーゼ切断モチーフの検索:Spartin のアミノ酸配列内に NS3/4A プロテアーゼ切断モチーフが存在するか、既知のモチーフと比較検討を行った。(勝二郁夫)

- 10) 3 ヶ月齢 C57/b16 オスに対し通常食及び高カロリー食、また高カロリー食に (UDCA0.05%)、および DPP-4 阻害薬 (0.0015%) 配合食を 3 ヶ月間投与 6 ヶ月齢時に sacrifice し体重、肝臓/体重比、血清脂質、AST/ALT 血糖 インスリン 肝臓 膵臓脂肪細胞 膵臓について mRNA 発現変化を含め検討した。(森屋恭爾)
- 11) 班共同研究：近年増加傾向にある非 B 非 C 肝癌の背景には生活習慣病の影響が大きいと考えられているが、その詳細はこれまで明らかになっていない。また、飲酒や肥満を含む多数のリスク因子が関与する非 B 非 C 肝癌はウイルス性肝癌に比べて多様性が高いとも考えられる。本研究は、大規模コホートをを用いて非 B 非 C 肝癌の背景因子からカテゴリー化を行うことを目的とした。

全国 55 の第 3 次医療機関において 1991 年～2010 年までに診断された非 B 非 C 型肝細胞癌 5633 症例を収集した。そのうち、PBC や自己免疫性肝炎などの

固有の慢性肝疾患を除き、データの欠損のない2166例を対象に16の臨床データを用いた階層別クラスタリングを行った。使用したデータは、以下のとおり:年齢、性別、飲酒量、糖尿病、高血圧、脂質代謝異常症、脂肪肝の有無、身長体重比(BMI)、アルブミン値、総ビリルビン値、AST、ALT、GGT、ALP、プロトロンビン活性、血小板数。それぞれのデータは、正規化した上で解析に用いた。

(倫理面の配慮)本研究は、東京大学大学院医学系研究科倫理委員会で審査され、承認された(承認番号3710)。患者登録に際して氏名・生年月日等の個人情報登録されず、個々のデータは、本研究独自の登録番号を割り当てた上で管理された。本研究にあたっては、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報を厳格に管理、保存する。(建石良介)

## C.結果

1) 済生会吹田病院と京都府立医科大学の症例の比較と各病型間における PNPLA3 の rs738409 の遺伝子型(CC, CG, GG)の分布に有意な差はなかった(表2)。rs738409 の遺伝子型 CC, CG, GG の3群間で血液生化学所見、肝組織所見で有意差を検討したが、血液生化学所見には

有意差は無く、脂肪肝の有無(1%未満 vs 1%以上)と肝線維化の程度(F0,F1,F2 vs F3,F4)に有意な差を認めなかった(表3)。慢性肝炎のみを対象として同様の検討を行ったが、結果は全症例を対象とした解析結果とほぼ同様であった(表4)。すなわち、rs738409 がリスクアレル G を有する CG,GG の症例では脂肪蓄積が起きやすく、肝線維化も進展しやすいことを示す結果が得られた。(岡上 武)

2) MC4R はレプチンの下流にあってインスリンの分泌抑制に加えて、食欲抑制を担う。従って、MC4RKO と MC4R/PPAR-double KO マウスは高インスリン血症とともに過食を生じ、高度肥満を呈する。MC4RKO マウスでは脂肪肝の進展と共に、炎症性細胞浸潤に加えて肝線維化が生じ、やがて全例で肝細胞癌の合併が観察された。他方、MC4R/PPAR-double KO マウスではMC4RKO マウスと同様に高度の脂肪肝を生じるものの、炎症性細胞浸潤や肝線維化は観察されず、肝発癌を生じることもなかった。(西原利治)

3) 1. 臨床背景:(BMI、肥満(BMI 25)・II型糖尿病(DM)・脂質異常症(DL)の合併率はいずれも NAFLD-HCC で高かった。高血圧(HTN)では両群に差がなかった。2. HCCの主腫瘍径・肉眼所見・分化度・組織型:主腫瘍径は、中央値40mmに対し20mmと、NAFLD-HCCでHCV-HCCより高値であった。分化度は両群とも中分化が約70%と最多であった。高分化型のうち、内部に中分化結節を含む nodule in nodule 型を呈した症例

が7例含まれ、HCV-HCCの3例に対し高率であった。組織型は、両群とも索状型が最も多く約70%程度であった。3. SH-HCCの頻度、癌部の steatohepatic features 各特徴所見の出現頻度：SH-HCCの頻度は50%に対し20%とNAFLD-HCCで高率であった。各特徴的所見の出現頻度も、steatosis, ballooning, Mallory 体、pericellular fibrosisの全項目でNAFLD-HCCで有意に高い出現率を呈した。4. 免疫組織染色：早期HCC関連マーカーと肝前駆細胞関連マーカーに関しては、NAFLD-HCCとHCV-HCC両群間に差は無かった。癌幹細胞・細胞分化増殖関連因子に関しては、癌部での陽性率でNAFLD-HCCとHCV-HCC群間に差を認めたのはNanogのみで、NAFLD-HCCで陽性率が高く、結節内の全癌細胞の50%以上が陽性となった6例はいずれもNAFLD-HCCで、全例がSH-HCCであった。(橋本悦子)

4) 症例はB型肝炎101例、C型肝炎286例、重複感染4例、NBNC164例であった。NBNC肝癌はC型肝炎に比べて有意に男性に多く、B型肝炎に比べて高齢発症であり、背景肝は肝硬変が少なかった。腫瘍因子では有意にAFPが低く、vp2以上の割合も少なかったが、腫瘍径はB型肝炎と同程度に大きかった。NBNC肝癌の予後は、B型肝炎・C型肝炎に比べて無再発生存期間、全生存期間とも有意に良好であった( $p < 0.005$ )。またB型肝炎、C型肝炎、NBNC肝癌の代謝関連因子の割合は、肥満(BMI30以上)は1%、2.3%、8.3%、糖尿病合併は

13.3%、17.2%、49.4%、高血圧合併は20%、45.5%、61%、高脂血症合併は11.4%、17.2%、25.6%、アルコール多飲(70g/day以上)は30.5%、33.8%、49.4%とすべてNBNC肝癌で多かった。遺伝子機能解析では、NBNC肝癌の癌部において糖尿病と高血圧に正相関する群では84遺伝子で発現異常を認め、細胞周期関連遺伝子群に有意な発現異常を認めた( $p=0.002$ )。非癌部において糖尿病と肥満に正相関する群では90遺伝子で発現異常を認め、細胞接着関連遺伝子群に有意な発現異常を認めた( $p < 0.001$ )。これらの遺伝子群はC型肝炎における解析では有意差を認めず、NBNC肝癌で特徴的な遺伝子発現異常と考えられた。また年齢及び脂質代謝異常症と逆相関し、肥満度と正相関する群では、非癌部10遺伝子に有意な発現異常を認め、エンドサイトーシス関連遺伝子群に異常が認められた。さらに、そのうちいくつかの遺伝子では、遺伝子発現と術後無再発生存期間とに有意な相関が認められた。(田中真二)

5) 肝臓特異的 Sdf2l1 ノックアウトマウスは、耐糖能障害を呈しており、肝臓の脂肪蓄積も増加していた。また、ノックアウトマウスの初代幹細胞では、ツニカマイシン刺激によるERストレス反応が亢進・遷延していることが分かった。ヒト生検サンプルを用いて、XBP-1, BIP, CHOP, Sdf2l1 などERストレスの終息シグナルの発現を測定した。これらの発現が低下しているほど、耐糖能の低下やNASHの進展が認められた。(植木浩二郎)

6) (検討 1) SVR 後肝発癌に寄与する要因を多変量解析(Cox proportional hazard model)で検討すると、年齢(50 歳以上)、性別(男性)、肝線維化(F2 以上)、HCV subgroup(HCV-1b Core aa70 Mutant)が独立要因として抽出された(P<0.01)。脂質要因では、総コレステロール(190 mg/dl 未満)、HDL コレステロール(50 mg/dl 未満)、中性脂肪(150 mg/dl 以上)が単変量解析では肝発癌に影響していたが(P<0.05)、何れも多変量解析では独立要因として抽出されず。(検討 2) 前治療無効例の Telaprevir 併用療法における抗ウイルス効果の検討では、Invader 法で aa70 Mutant 頻度が 1.0%未満の症例の SVR 率は 67%(16/24 例)、前治療無効かつ IL28B nonTT で Mutant 1.0%未満の症例の SVR 率も 67%(4/6 例)と何れも高い SVR 率が得られた。前治療 Partial responder で Mutant 1.0%未満の症例の SVR 率が 100%(2/2 例)であるのに対して、前治療 Null responder で Mutant 99.0%以上の症例の SVR 率は 20%(2/10 例)と低い SVR 率であった。この様に、前治療無効例に対する Telaprevir 併用療法では aa70 Mutant 頻度が低い症例で治療感受性を示すことが確認された。肝発癌の検討で aa70 Mutant 頻度の経過は、経過持続的に低頻度を推移(持続 Low)、持続的に高頻度を推移(持続 High)、中頻度を推移(変動)、低頻度から高頻度に移行(Low-High)、高頻度から低頻度に移行(High-Low)の 5 グループに分けられることが確認された。全症例で各経時的な aa70 Mutant 頻度の中央値(10 例以上の

data が存在するポイントのみ)を評価すると、肝発癌の 15 年前の Mutant 頻度 6%、10 年前 58%、5 年前 67%、肝発癌時 74%と経時的に増加することが確認された。この様に、肝発癌前後で、aa70 Mutant は様々な変動パターンを呈したが、全体で評価すると肝発癌前より既に Mutant の頻度は増加傾向を示した。(芥田憲夫)

7) Exendin-4 による体重と肝の肉眼所見の変化：コントロール群の体重は徐々に増加し、14 週齢で約 50 g となった。一方、Exendin-4 群は 7 週齢より体重はほぼ増加せず、14 週齢で約 40 g とコントロール群と比較し有意に低値であった。Exendin-4 群の肝臓は、コントロール群の肝臓と比較して、褐色調であった。

Exendin-4 による肝組織所見、肝組織中の中性脂肪含量、および NAFLD activity score の変化：両群ともに著明な肝線維化は認めなかったが、Exendin-4 群における肝小葉内の炎症、肝細胞内の脂肪蓄積や肝細胞風船様変化は、コントロール群と比較して抑制されていた。Exendin-4 群における NAFLD activity score はコントロール群と比較して有意に低値であった。

Exendin-4 が肝組織中飽和脂肪酸におよぼす影響

Exendin-4 群における肝組織中の飽和脂肪酸値はコントロール群と比較し有意な変化は認めなかった。また、アテローム性飽和脂肪酸値、血栓形成性飽和脂肪酸値、中鎖飽和脂肪酸値、および長鎖飽和脂肪酸濃度値も両群間において

有意差は認めなかった。

肝組織中の長鎖飽和脂肪酸の分画を検討したところ、パルミチン酸値、ステアリン酸値、ベヘン酸値、およびリグノセリン酸値は両群間において有意差を認めなかったが、Exendin-4 群におけるアラキジン酸値とリグノセリン酸値はコントロール群と比較して、有意に高値であった。

Exendin-4 が肝組織中不飽和脂肪酸におよぼす影響

Exendin-4 群における肝組織中の一価不飽和脂肪酸値はコントロール群と比較して有意な変化は認めなかった。一方、Exendin-4 群の肝組織中多価不飽和脂肪酸値はコントロール群と比較して有意に高値であった。また、Exendin-4 群の肝組織中 n-6 系多価不飽和脂肪酸値および n-3/n-6 系多価不飽和脂肪酸比もコントロール群と比較して有意に高値であった。

肝組織中 n-6 系多価不飽和脂肪酸の分画を検討したところ、アラキドン酸値は両群間において有意差を認めなかったが、Exendin-4 群におけるリノール酸値、 $\gamma$  リノレン酸値、およびジホモ- $\gamma$  リノレン酸値は、コントロール群と比較して有意に高値であった。一方、Exendin-4 群における肝組織中の  $\Delta^5$  デサチュラーゼ index はコントロール群と比較して有意に低値であった。(川口巧)

8) これまでの本研究班の研究で、HCV の完全な増殖を許容する新規細胞株、JHH4 と FU97 細胞を同定した。また、

ApoE の欠損細胞を樹立することによって、HCV の粒子産生には、ApoE の機能を ApoB が代償することが明らかとなった。ApoE と ApoB 遺伝子の両方を欠損させた DKO 細胞株では粒子産生能が顕著に抑制されていたことから、ApoB と ApoE が相補的に HCV の粒子産生に参与していることが示唆された。一方、cDNA マイクロアレイによる解析で、ヒト肝組織では全ての肝臓特異的なアポリポ蛋白質が高く発現しているのに対し、Huh7 細胞では ApoB と ApoE の発現は高いものの、ApoA や ApoC の発現が低かった。そこで、DKO 細胞に、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 だけでなく、ApoA1、ApoA2、ApoC1、ApoC2、および ApoC3 の発現によっても感染性粒子の産生が認められた。次に、DKO 細胞に発現することで、HCV の感染性粒子産生を回復できるアポリポ蛋白質の共通性を 2 次構造で予測したところ、これらのアポリポ蛋白質には共通して両親媒性  $\alpha$  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 と ApoE から、単一の  $\alpha$  ヘリックスだけを DKO 細胞に発現させるだけで、HCV の粒子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 の感染性粒子産生に参与していることが示唆された。さらに、HCV 粒子を超遠心で濃縮すると、アポリポ蛋白質も濃縮されることから、HCV 粒子にアポリポ蛋白質が結合してい

ることが示唆された。(松浦善治)

9) 1.HCV J6/JFH1 感染に伴い JNK が活性化され、細胞内のユビキチンリガーゼ Itch が T222 でリン酸化され、活性化された。また、Itch の活性化に伴い Adipophilin の蛋白質量が減少したが、TIP47 の量は変化しなかった。2. HCV 感染に伴い、BODPY で染色される脂肪滴の大きさが mock 細胞と比較して増大傾向にあった。3. HCV J6/JFH1 を Huh-7.5 細胞に感染にさせ、経時的に観察したところ、Spartin の全長のバンドが減少し、2本のバンドに分かれ、低分子量のバンドの比が増加した。4. Spartin 内に NS3/4A プロテアーゼの切断モチーフと類似のアミノ酸配列が存在した。(勝二郁夫)

10) 体重、肝臓内中性脂肪量、血中インスリン量は、高脂肪食群で薬剤投与の有無に関係なく増加を認めるとともに薬剤間の有意差認めなかった。一方、肝臓内総コレステロール量は高脂肪食で増加を認め、DPP4-inhibitor では有意な変化認めなかったが、UDCA 投与群では低下を認めた。一方、血糖値は高脂肪食投与で上昇傾向認めるが、有意差は認めなかった。高脂肪食で発現増加した FAS SREBP1 などの肝臓内脂質代謝関連酵素は、2種類の薬剤投与によっても有意な低下は認めないが、UDCA のみが SCDmRNA を有意に低下させた。一方、TGR5mRNA は DPP-4inhibitor 群で増加を認めた。また、膵臓においては GLP1-RmRNA が UDCA によって発現増加を認めた。脂肪組織においては、

**DPP-4inhibitor が、高脂肪食によって増加した TNFalpha mRNA を減少させた。**(森屋恭爾)

11) 階層クラスタリングによって、対象者は、以下の 5 つの群に大別できた：  
C1 高齢男性、中等度飲酒、肝機能正常、  
C2 高齢男性、肥満、中等度飲酒、肝硬変、  
C3 比較的若年男性、大量飲酒、肝機能不良、  
C4 肥満男性、非飲酒、生活習慣病、  
C5 高齢女性、肥満、非飲酒、肝硬変。  
年代別の各グループの割りあいを検討したところ、C1 と C5 の増加が近年の非 B 非 C 肝癌の増加に寄与している可能性が示唆された。(建石良介：班共同研究)

#### D. 考察

我々は以前肝生検で非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD)と診断した 529 例を Matteoni 分類に従い組織分類し、GWAS を行い、PNPLA3 の rs738409 の遺伝多型が NASH 発症・進展の感受性遺伝子であることを報告したが(PLoS One 7(6): e38322, 2012)、今回 NASH と病態が類似する C 型肝炎でも類似する結果が得られた。すなわち C 型肝炎においては脂肪蓄積と線維化進展に PNPLA3 の遺伝子多型が関与していることが明らかになった。PNPLA3 は中性脂肪の代謝に関与しているがその役割は十分に明らかにされておらず、今後さらなる検討が必要であるが、今回の結果は C 型肝炎の予後、特に PNALT 症例の予後の検討に重要な意味を持つ可能性がある。

MC4R 遺伝子に異常を有する症例は幼児期より高度肥満を呈する。日本人では劣性遺伝形式を取ることが知られている。他方、フランス人では優性遺伝形式を示し、高度肥満者の 1% に MC4R 遺伝子異常を認める。MC4R 遺伝子変異を持つこれらの症例は遺伝性 NASH を発症し、しばしば肝硬変で死亡することが知られている。従って、この遺伝性疾患を研究すれば非遺伝性 NASH で観察される代謝異常に近い病態を知ることができるのではないかと考えられる。

MC4RKO マウスでも高度肥満に伴う脂肪肝を背景に典型的な NASH の発症が観察されたことから予想に違わずヒト NASH の病態を反映する優れた NASH モデルと考えられた。

MC4RKO マウスでは炎症細胞浸潤と著明な肝線維化の進展、肝細胞癌の合併が全例で観察され、MC4R/PPAR- double KO マウスでは炎症細胞浸潤は軽微で、肝線維化や肝細胞癌の合併を認めなかったとの成績がヒトに外挿可能であれば、NASH 治療に新たな breakthrough をもたらす可能性がある。

NAFLD-HCC は、HCV-HCC と比較し肥満・生活習慣病合併率が高く、主腫瘍径が大きく、SH-HCC の頻度が高く、癌部の Nanog 陽性率が高く、癌部 Nanog 強陽性例は全例 NAFLD-HCC の SH-HCC 例であった。

NAFLD の年齢・性の分布には特徴があり、50 程度を境に若年層では男性例が多く、高齢層では女性例が多い。当科における NAFLD 全体の症例分布は 50 歳以下では男性が多く、50 歳以上では女性が多いが、年

齢中央値男女とも約 71 歳の NAFLD-HCC は男性が 65% を占めた。この原因として、NAFLD における HCC 合併の危険因子とされる肥満・DM の合併率が男性で高いこと、男性で女性より高頻度に合併する喫煙・少量飲酒の影響などの関与が推測されているが、未だ明らかではない。

NAFLD-HCC では高分化型 HCC が多いという複数の報告があるが、当科の検討では HCV-HCC と差が無かった。

しかし、HCV-HCC に比し主腫瘍径が大きいにもかかわらず分化度が同等ということは、主腫瘍径のわりに高分化型が多いといえる。また、高分化型の中に中分化型の成分を含む症例は NAFLD-HCC に高頻度であったという事実も考慮を要する。

癌部 steatohepatitic features に関しては、前述のように 2010 年に初報告の論文において、対象疾患が HCV-HCC であり、その後複数の論文で、基盤となる肝疾患は様々であるが、癌部の steatohepatitic features は非癌部の脂肪沈着の有無と関連し、基盤となる疾患の中で最も重要なものは NAFLD と報告された。当科の検討でも、NAFLD-HCC は HCV-HCC に比較し SH-HCC の頻度が高く、また癌部 steatohepatitic features の各特徴的所見の出現頻度も高率であった。SH-HCC の生物学的特徴や NAFLD 自体あるいは HCC 病態との関連については今まで全く報告が無く、発癌メカニズムとの関連を含め、今後の重要な検討課題と考えられる。

今回検討した免疫染色の染色性の評価で、NAFLD-HCC と HCV-HCC で差異を認めたのは、Nanog のみであった。Nanog は癌

幹細胞の自己増殖促進分子であり、その染色性の両群における差異が、非癌部の線維化の程度を含め発癌メカニズムや発癌危険因子の差異に繋がる可能性がある。今後、非癌部での発現との関連や動物モデルでの検証など更なる検討を要する。

今回の検討では、当院における今回検討した期間の肝切除施行数は HCV-HCC が NAFLD-HCC の約 20 倍程度と非常に差が大きく、統計解析とその解釈に困難があることが最大の問題点と考える。今後、多施設共同研究などを通し更なる症例集積を目指す。検討項目としては、今回の報告で検討しえなかった HCC 関連マーカー(Bmi-1, glutamine-synthetase, adenylyate cyclase-associated protein2 など)、慢性炎症関連分子(Cox2 など)、マロリー体関連分子(抗コビキチン抗体, p62, CK18 など)、幹細胞関連分子(Oct4, Sox9, GLP-1, CK18/8 など)、細胞分化・再生関連分子(hepassocin など)、細胞周期・アポトーシス・DNA 修復関連分子(Fox-O など)などについて、主としての免疫組織学的手法により解析していく。また、最近 NAFLD に関連する腫瘍性病変で前癌病変としての意味合いから注目される肝細胞腺腫や過形成性結節などについても検討を加えていきたい。

非ウイルス性肝癌は代謝関連因子との関連が強く、それら代謝関連肝癌は、ウイルス性肝癌とは別の特異的な遺伝子機能異常を内包している。その発癌及び悪性化メカニズムの解明が、代謝関連肝癌に対する新たな分子マーカーや分子標的の開発に寄与すると考えられる。

前年までの検討から、摂食により肝臓での ER ストレスが惹起され、Sdf2l1 等のシグナルの誘導によりそれが適切に終息すること、肥満ではその誘導が低下し、持続的な ER ストレスとそれによるインスリン抵抗性・肝脂肪蓄積が生じることを提唱した。今回の検討で、ER ストレス終息シグナルと考えられる Sdf2l1 を肝臓特的にノックアウトすると、確かに ER ストレスの遷延と耐糖能障害・肝脂肪蓄積の増大が起きていることが明らかとなった。ヒト生検サンプルの検討でも、ER ストレスシグナルの発現が低下しているほど、ER ストレスが遷延し、耐糖能障害・NASH の進展が生じていると考えられた。

トランスジェニック・マウスによる動物実験では HCV core 蛋白による肝細胞脂肪化・インスリン抵抗性といった脂質/糖代謝への影響やそれらを介した肝発癌への影響が報告されてきた。当施設の検討は、このような基礎的な検討を臨床面から支持する成績であるといえる。今回の検討では、ウイルス排除前の Core アミノ酸置換の状態が SVR 後肝発癌にまで影響することが確認された。これはイニシエーターとしての HCV が排除された状態にあっても、Core aa70 Mutant の症例ではウイルス排除前の段階で既に肝発癌の素地が出来上がっている可能性を示唆する所見と思われる。

本研究により、GLP-1 受容体刺激剤である exendin-4 は、NASH モデルマウスの肝障害を抑制することが明らかとなった。また、exendin-4 による脂肪酸代謝酵素の活性調節と脂肪酸組成の変化が NASH 改善の一機序である可能性が示唆された。

本研究において、exendin-4 は NASH モデルマウスの体重増加と NAFLD activity score の上昇を抑制した。これまでに、GLP-1 受容体の発現は NASH モデルマウスや NASH 患者において抑制されていることが報告されている。また、GLP-1 受容体作動薬投与により、高脂肪食飼育ラットや ApoE ノックアウトマウスの肝障害が抑制されることも報告されている。このように、本研究における exendin-4 の体重減少効果と NASH 改善効果は既報の結果と類似していた。

GLP-1 受容体作動薬による NASH 改善効果の機序として、インスリン感受性の亢進、peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  の活性亢進、および  $\beta$  酸化の亢進が報告されている。しかしながら、GLP-1 受容体作動薬が脂肪酸組成におよぼす影響について未だ不明である。

長鎖飽和脂肪酸は炎症促進性の脂肪酸であり、NASH の発症に促進的に作用することが報告されている。しかしながら、本研究において Exendin-4 群の肝組織中長鎖飽和脂肪酸値は上昇していた。本研究における長鎖飽和脂肪酸と肝障害の関連が既報と一致しない理由は明らかではないが、長鎖飽和脂肪酸のなかでもアラキジン酸は apoB の分泌を促進して、リグノセリン酸はセラミド代謝を調節して肝細胞への脂肪蓄積を抑制することが報告されている。本研究において、長鎖飽和脂肪酸値の増加に寄与する脂肪酸分画はアラキジン酸とリグノセリン酸であることから、exendin-4 は長鎖飽和脂肪酸の組成を変化させることで、NASH に対する抑制作用を発揮している可

能性が示唆された。

Exendin-4 群では、肝内の n-6 系多価不飽和脂肪酸、特にリノール酸値、 $\gamma$  リノレン酸値、およびジホモ- $\gamma$ -リノレン酸値が高値であった。これらの脂肪酸は炎症促進性エイコサノイドの前駆体であり、NASH の発症に関与することが報告されている。本研究における n-6 系多価不飽和脂肪酸の変化は既報と一致しないが、脂肪酸代謝経路の律速酵素である  $\Delta^5$  デサチュラーゼの変化がその一因と考えられる。 $\Delta^5$  デサチュラーゼはジホモ- $\gamma$ -リノレン酸より炎症促進性エイコサノイドの産生を促進する酵素で、NASH 患者においてその活性は亢進していることが報告されている。また、 $\Delta^5$  デサチュラーゼ活性阻害剤 (CP-24879) により、炎症が抑制され、肝細胞内脂肪含量が低下することが報告されている。本研究結果と、これら既報の研究結果は、exendin-4 が肝組織中  $\Delta^5$  デサチュラーゼの活性を阻害し、炎症促進性エイコサノイドの産生を抑制することで NASH を軽減している可能性が示唆される。

アポリポ蛋白質の両親媒性  $\alpha$  ヘリックスが HCV の感染性粒子産生に関与していることが明らかとなった。両親媒性の  $\alpha$  ヘリックスとウイルス粒子の結合を特異的に阻害するような薬剤やペプチドは新規抗 HCV 剤の創薬標的と考えられる。

UDCA は肝腫瘍マーカーである SCD mRNA の抑制ならびに膵臓において **GLP1-R mRNA 発現増加をもたらす肝発癌抑制とともにインクレチン signal 増強をもたらす可能性が示唆された。**一方 DPP4inhibitor は **TGR5 mRNA 増加ならび**

に脂肪組織抗炎症作用と異なるなら部位で補完的作用をもたらす可能性が示された。

近年、肥満人口の増加とともに非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の肝細胞癌発癌への関与が注目されているが、成人日本人男性では、20g/日以下の飲酒者はむしろ少数派であり、飲酒と肥満のリスクを併せ持つ集団(C2)の同定が必要である。また、中等度飲酒と加齢以外に特段の危険因子を擁しない集団(C1)が同定されたため、今後これらの集団に隠れた危険因子が存在しないか精査する必要があると思われる。

#### E. 自己評価

- 1) 達成度について：当初設定した目標について、ほぼ各項目について1年目の目標通りに研究が遂行されたと考える。
- 2) 研究成果の学術・国際・社会的意義について：全国的な非 B 非 C 型肝癌の増加の中、代謝関連肝癌として捉えて研究、診断、治療を行なうというコンセプトのもつ社会的な意義は大きいと考えられる。
- 3) 今後の展望について：代謝関連肝癌(MALC)に関して、臨床データ、基礎実験を通じて、発癌機序の解明、抗リスク群の設定等、早期発見、早期治療に向けた取り組みの成果が期待される。

#### F. 結論

非 B 非 C 型肝癌の階層化クラスタリング解析によって、従来言われている NASH やアルコール性肝硬変以外に肝機能正常高齢男性や肥満と飲酒のリスクを併せ持つ集団など新たな背景集団を抽出することができた。C 型肝炎、

NASH、非 ASH 非 NASH の非 B 非 C 型肝疾患に関連する肝癌を、「代謝関連肝癌 (Metabolism-associated liver cancer, MALC)」として捉えて解析を行ない、その病態を探り、高リスク群を設定し、さらに肝発癌抑制法を開発し適用していくことで、これらの疾患の病態・肝発癌制御が可能になると考えられた。このような認識をもって患者の管理・治療に当ることにより、患者の予後、QOL を大幅に改善することが期待される。

#### G. 健康危険情報

なし

#### H. 研究発表

##### 論文発表のみ

- 1) Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. *Int J Cancer* 2014 Jan 13. doi: 10.1002/ijc.28720. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24420733.
- 2) Nakagawa H, Hikiba Y, Hirata Y, Font-Burgada J, Sakamoto K, Hayakawa Y, Taniguchi K, Umemura A, Kinoshita H, Sakitani K, Nishikawa Y, Hirano K, Ikenoue T, Ijichi H, Dhar D, Shibata W, Akanuma M, Koike K, Karin M, Maeda S. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A 2014 Jan 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24395807.
- 3) Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. *J Gastroenterol* 2013 Nov 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID:24258409.
- 4) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. *Hepatol Res* 2013 Nov 14. doi:10.1111/hepr.12275. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24224477.
- 5) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. *Int J Cancer* 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24174293.
- 6) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. The impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus Infection. *Hepatol Res* 2013 Oct 11. doi: 10.1111/hepr.12258. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24125181.
- 7) Uchino R, Isayama H, Tsujino T, Sasahira N, Ito Y, Matsubara S, Takahara N, Arizumi T, Toda N, Mohri D, Togawa O, Yagioka H, Yanagihara Y, Nakajima K, Akiyama D, Hamada T, Miyabayashi K, Mizuno S, Kawakubo K, Kogure H, Sasaki T, Yamamoto N, Nakai Y, Hirano K, Tada M, Koike K. Results of the Tokyo Trial of Prevention of Post-ERCP Pancreatitis with Risperidone-2: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Gastrointest Endosc* 2013 Jul 30. doi:pii: S0016-5107(13)02093-2. 10.1016/j.gie.2013.06.028. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23910063.
- 8) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H. Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis C using multiple fibrosis markers. *Hepatol Res* 2013 Aug 14. doi: 10.1111/hepr.12221. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23941604.
- 9) Shibata C, Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Yoshida H, Koike K. Inhibition of microRNA122 decreases SREBP1 expression by modulating suppressor of cytokine signaling 3 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2013 Jul 23. doi:pii: S0006-291X(13)01224-2. 10.1016/j.bbrc.2013.07.064. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23891753.

- 10) Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K. Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2013 Jul 11. doi:10.1111/hepr.12203. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23841664.
- 11) Sato M, Tateishi R, Yasunaga H, Horiguchi H, Yoshida H, Matsuda S, Fushimi K, Koike K. Acute liver disease in Japan: a nationwide analysis of the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. *J Gastroenterol* 2013 Jun 20. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23783841.
- 12) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, Koike K. High levels of HBV after the onset lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2013 May 23. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23704123.
- 13) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2013 May 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23689989.
- 14) Mikoshiha N, Miyashita M, Sakai T, Tateishi R, Koike K. Depressive symptoms after treatment in hepatocellular carcinoma survivors: prevalence, determinants, and impact on health-related quality of life. *Psychooncology* 2013 May 19. doi:10.1002/pon.3300. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23686523.
- 15) Ohki T, Tateishi R, Akahane M, Mikami S, Sato M, Uchino K, Arano T, Enooku K, Kondo Y, Yamashiki N, Goto T, Shiina S, Yoshida H, Matsuyama Y, Omata M, Ohtomo K, Koike K. CT with hepatic arteriography as a pretreatment examination for hepatocellular carcinoma patients: a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* 2013 Apr 30. doi: 10.1038/ajg.2013.109. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23629602.
- 16) Inoue Y, Tomiya T, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Ikeda H, Koike K. Induction of p53-Dependent p21 Limits Proliferative Activity of Rat Hepatocytes in the Presence of Hepatocyte Growth Factor. *PLoS One* 2013;8(11):e78346. PubMed PMID: 24223793
- 17) Hikita H, Enooku K, Satoh Y, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Tateishi R, Soroida Y, Sato M, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatol Res* 2013;43(10):1005-1012. PubMed PMID: 23356977.

- 18) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalapour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell* 2013;155(2):384-396. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.031. PubMed PMID: 24120137.
- 19) Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Kondo Y, Akanuma M, Yoshida H, Koike K. Regulation of the expression of the liver cancer susceptibility gene MICA by microRNAs. *Sci Rep* 2013 Sep 24;3:2739. doi:10.1038/srep02739. PubMed PMID: 24061441.
- 20) Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;432(1):22-27. PMID: 23376718.
- 21) Koike K. The oncogenic role of hepatitis C virus. *Recent Results Cancer Res* 2014;193:97-111. PMID: 24008295.
- 22) Uchino K, Tateishi R, Nakagawa H, Shindoh J, Sugawara Y, Akahane M, Shibahara J, Yoshida H, Koike K. Uninodular combined hepatocellular and cholangiocarcinoma with multiple non-neoplastic hypervascular lesions appearing in the liver of a patient with HIV and HCV coinfection. *J Clin Virol* 2013;57(2):173-177. PMID: 23434197.
- 23) Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, Akanuma M, Kang YJ, Yoshida H, Otsuka M, Koike K. The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice. *Sci Rep* 2013 Aug 30;3:2553. doi: 10.1038/srep02553. PubMed PMID: 23989853.
- 24) Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H. Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. *Hepatology* 2013;43(6):596-604. PubMed PMID: 23131000.
- 25) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. *J Hepatol* 2013;58(5):875-882. PubMed PMID: 23321320.

- 26) Hikita H, Nakagawa H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Yoshida H, Omata M, Soroida Y, Sato M, Gotoh H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver cancer development in chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol* 2013;48(3):366-373. PMID: 22790352
- 27) Tateishi R, Shiina S, Akahane M, Sato J, Kondo Y, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y, Goto T, Otomo K, Omata M, Yoshida H, Koike K. Frequency, risk factors and survival associated with an intrasubsegmental recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2013 Apr 12;8(4):e59040. doi: 10.1371/journal.pone.0059040. Print 2013. PubMed PMID: 23593129; PubMed Central PMCID: PMC3625228.
- 28) Lo PH, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the mica promoter which regulates mica expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. *PLoS One* 2013 Apr 11;8(4):e61279. doi: 10.1371/journal.pone.0061279. Print 2013. PubMed PMID: 23593449; PubMed Central PMCID: PMC3623965.
- 29) Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, Koike K. Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2013;48(2):254-268. PMID: 22790350.
- 30) Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, Koike K, Yatomi Y. Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:417-418. PubMed PMID: 22707340.
- 31) Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, Koike K. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- $\kappa$ B activity via directly targeting Dnmt1 expression. *Hepatology* 2013;57:162-170. PMID: 22898998.
- 32) Nishimura T, Yamaguchi K, Fujii H, Okada Y, Yokomizo C, Niimi T, Sumida Y, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Umemura A, Shima T, Okanoue T, Itoh Y. Prediction of a favorable clinical course in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum alanine aminotransferase levels: A long-term follow-up study. *Hepatol Res* 2013; 43: 557-562
- 33) Okada Y, Yamaguchi I K, Nakajima T, Nishikawa T, Jo M, Mitsumoto Y, Kimura H, Nishimura T, Tochiki N, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y. Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Liv Int* 2013; 33: 301-311
- 34) Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H,

- Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T. Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2013;48: 515-525
- 35) Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, Saibara T, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anzai K, Fujimoto K, Okanoue T, Nakajima A. Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease(JSG-NAFLD). Noninvasive scoring systems in patients with nonalcoholic fatty liver disease with normal alanine aminotransferase. *J Gastroenterol* 2013;48: 1051-1060
- 36) Mitsuyoshi H, Yasui K, Yamaguchi K, Minami M, Okanoue T, Itoh Y. Pathogenic role of iron deposition in reticuloendothelial cells during the development of chronic hepatitis C. *Int J Hepatol* 2013;;3013;686420. doi: 10
- 37) Kondo Y, Hasegawa G, Okada H, Senmaru T, Fukui M, Nakamura N, Sawada M, Kitawaki J, Okanoue T, Kishimoto Y, Amano A, Maruyama N, Obayashi H, Ishigami A. Leprdb/db mice with senescence marker protein-30 knockout (Leprdb/dbSmp30Y/2) exhibit increases in small dense-LDL and severe fatty liver despite being fed a standard diet. *PLoS One* 2013;8(6):e65698
- 38) Sumida Y, Naito Y, Tanaka S, Inada Y, Taketani H, Kanemasa K, Yasui K, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Long-term (>2 yr) efficacy of vitamin E for non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology* 2013; 60: 1445-1450
- 39) Nakahara T, Hyogo H, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Imajo K, Akita H, Tanaka S, Kanemasa K, Fijimoto K, Anzai K, sainbara T, Nakajima A, Itoh Y, Chayama K, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease(JSG-NAFLD). Type 2 *J Gastroenterol* 2013 Nov 26 [Epub ahead print]
- 40) Osawa Y, Suetsugu A, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Seishima M, Kozawa O. Liver acid sphingomyelinase inhibits growth of metastatic colon cancer. *J Clin Invest* 2013; 123: 834-843.
- 41) Ue M, Ikebe N, Munekage K, Ochi T, Ono M, Saibara T. Hepatocyte destruction with enhanced collagen synthesis in the liver of chronic hepatitis C patients on hemodialysis. *J Viral Hepat* 2013; 20:350-357.
- 42) Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Kozawa O. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells. *PLoS ONE* 2013;8: e65251.

- 43) Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, Saibara T, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anzai K, Fujimoto K, Okanoue T, Nakajima A; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Noninvasive scoring systems in patients with nonalcoholic fatty liver disease with normal alanine aminotransferase levels. *J Gastroenterol* 2013;48:1051-60.
- 44) Saibara T, Enomoto N, Kaneko S, Chayama K, Sata M, Imawari M, Onishi S, Okita K. Clinical efficacy of combination therapy with ME3738 and pegylated interferon alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatol Res.* 2013 Apr 19. doi: 10.1111/hepr.12139.
- 45) Ono M, Ogasawara M, Hirose A, Mogami S, Ootake N, Aritake K, Higuchi T, Okamoto N, Sakamoto S, Yamamoto M, Urade Y, Saibara T, Oben JA. Bofutsushosan, a Japanese herbal (Kampo) medicine, attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *J Gastroenterol* doi 10.1007/s00535-013-0852-8
- 46) Hasegawa T, Yamao K, Hijioka S, Bhatia V, Mizuno N, Hara K, Imaoka H, Niwa Y, Tajika M, Kondo S, Tanaka T, Shimizu Y, Kinoshita T, Kohsaki T, Nishimori I, Iwasaki S, Saibara T, Hosoda W, Yatabe Y. Evaluation of Ki-67 index in EUS-FNA specimens for the assessment of malignancy risk in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endoscopy* 2014; 46: 32-38
- 47) 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, Saibara T, Fujimoto K, Nakajima A; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2013 Aug 22.
- 48) Hashiba M, Ono M, Hyogo H, Ikeda Y, Masuda K, Yoshioka R, Ishikawa Y, Nagata Y, Munekage K, Ochi T, Hirose A, Nozaki-Fujimura Y, Noguchi S, Okamoto N, Chayama K, Suganuma N, Saibara T. Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease. *PLoS One.* 2013;8:e76161.
- 49) Toda K, Hayashi Y, Yamashita A, Okabe M, Ono M, Saibara T. Aromatase-null mice expressing enhanced green fluorescent protein in germ cells provide a model system to assess estrogen-dependent ovulatory responses. *Transgenic Res.* 2013 Nov 22.
- 50) 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, Saibara T, 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*. 2013 Nov 26.
- 51) Hashimoto E, Tani M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 4:64-70
- 52) Tokushige K, Hashimoto E, Kodama K. Hepatocarcinogenesis in non-alcoholic fatty liver disease in Japan. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 4:88-92
- 53) Sato K, Tanaka S, Mitsunori Y, Mogushi K, Yasen M, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S. Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography for vascular imaging of hepatocellular carcinoma; clinical and biological significance. *Hepatology*, 2013;57(4):1436-1447
- 54) Muramatsu S, Tanaka S, Mogushi K, Adikrisna R, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Nakayama K, Tanaka H, Yamaoka S, Arii S. Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma enlightened in vivo significance of tumor-host interaction and clinical implication. *Hepatology*, 2013;58(1):218-228.
- 55) Furuta M, Kozaki KI, Tanimoto K, Tanaka S, Arii S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, Inazawa J. The Tumor-suppressive mir-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(3):e60155.
- 56) Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Tanabe M, Arii S. Age-related clinicopathological and molecular features of patients received curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *American Journal of Surgery*, in press
- 57) Kudo A, Tanaka S, Ban D, Matsumura S, Irie T, Ochiai T, Nakamura N, Arii S, Tanabe M. Alcohol consumption and recurrence of non-B or non-C hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a propensity score analysis. *Journal of Gastroenterology*, in press
- 58) Ogawa K, Tanaka S, Matsumura S, Murakata A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanabe M, Arii S. EpCAM-Targeted therapy for human hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, in press
- 59) Kudo A, Mogushi K, Takayama T, Matsumura S, Ban D, Irie T, Ochiai T, Tanaka H, Anzai N, Sakamoto M, Tanaka S, Arii S. Mitochondrial metabolism in the Noncancerous Liver Determine the Occurrence of Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study. *Journal of Gastroenterology*, in press
- 60) Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, *Ueki K*, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S,

- Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 2013;503:493-499
- 61) Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lynge J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, Ueki K, Ingwersen SH, Pedersen BK, Kadowaki T. Body Composition is Main Determinant for the Difference in Type 2 Diabetes Pathophysiology between Japanese and Caucasians. *Diabetes Care* 2013; Oct 15 (Epub ahead of print)
- 62) Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S and Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503:493-499, 2013
- 63) Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lynge J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, Ueki K, Ingwersen SH, Pedersen BK and Kadowaki T. Body Composition is Main Determinant for the Difference in Type 2 Diabetes Pathophysiology between Japanese and Caucasians. *Diabetes Care* 2013
- 64) Nakaya K, Kubota N, Takamoto I, Kubota T, Katsuyama H, Sato H, Tokuyama K, Hashimoto S, Goto M, Jomori T, Ueki K, Kadowaki T. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet. *Metabolism* 2013;62:939-951
- 65) Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Med Virol* 2013;85:1028-1036.
- 66) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Prediction of treatment efficacy and telaprevir-resistant variants after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Clin Microbiol* 2013;51:2862-2868.
- 67) Seko Y, Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C Virus core region and lipid metabolism are associated with hepatocarcinogenesis in nonresponders to interferon plus ribavirin combination therapy. *Intervirology* 2013;56:13-21.
- 68) Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kawamura Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013;57:964-973.
- 69) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, 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* 2014;52:193-200.
- 70) Yamada S, Kawaguchi A, Kawaguchi T, Fukushima N, Kuromatsu R, Sumie S, Takata A, Nakano M, Satani M, Tonan T, Fujimoto K, Shima H, Kakuma T, Torimura T, Charlton MR, Sata M. Serum albumin level is a notable profiling factor for non-B, non-C hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma: A data-mining analysis. *Hepatol Res*. 2014; in press.
- 71) Kawaguchi T, Nagao Y, Sata M. Independent factors associated with altered plasma active ghrelin levels in HCV-infected patients. *Liver Int*. 2013;33:1510-6.
- 72) Taniguchi E, Kawaguchi T, Sakata M, Itou M, Oriishi T, Sata M. Lipid profile is associated with the incidence of cognitive dysfunction in viral cirrhotic patients: A data-mining analysis. *Hepatol Res*. 2013;43:418-24.
- 73) Sakata M, Kawahara A, Kawaguchi T, Akiba J, Taira T, Taniguchi E, Abe M, Koga H, Kage M, Sata M. Decreased expression of insulin and increased expression of pancreatic transcription factor PDX-1 in islets in patients with liver cirrhosis: a comparative investigation using human autopsy specimens. *J Gastroenterol*. 2013;48:277-85.
- 74) 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
- 75) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog* 2013;(doi: 10.1371/journal.ppat.1003589)
- 76) Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, Akira S. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:12379-12384
- 77) 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
- 78) Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, Takeda K. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol* 2013;87:9997-10003

- 79) 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* 2013;12:2537-2551
- 80) 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*, doi: 10.1111/1348-0421.12133.
- 81) 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*, doi: 10.1111/1348-0421.12127.
- 82) Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I., Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling*, DOI: 10.1089/ars.2013.5381.
- 83) Mawatari S., Uto H., Ido A., Nakashima K., Suzuki T., Kanmura S., Kumagai K., Oda K., Tabu K., Tamai T., Moriuchi A., Oketani M., Shimada Y., Sudoh M., Shoji I., and Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4., *PLoS One*, 2013; 8 (12): e82094.
- 84) Wahyuni TS., Tumewu L., Permanasari AA., Apriani E., Adianti M., Rahman A., Widyawaruyanti A., Lusida MI., Fuad A., Soetjipto, Nasronudin, Fuchino H., Kawahara N., Shoji I., Deng L., Aoki C., and Hotta H. Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virology Journal*, 2013, 10 (1): 259, 1-9.
- 85) Ichimura, T., Taoka, M., Shoji, I., Kato, H., Hatakeyama, S., Isobe, T., and Hachiya, N. 14-3-3 Proteins sequester a pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation., *Journal of Cell Science*, 2013, 126 (Pt9): 2014-26.
- 86) El-Shamy, A., Shindo, M., Shoji, I., Deng, L., Okuno, T., and Hotta, H. Polymorphisms of the Core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 2013, 58 (2): 555-63.
- 87) 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. *Hepatology*. 2013 Nov 14. doi: 10.1111/hepr.12275. PMID: 24224477

88) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. *Int J Cancer*. 2013 Oct 15. doi:

10.1002/ijc.28547PMID:24174293

89) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, Koike K. High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. *Clin Infect Dis*. 2013 Oct;57(7):935-42. PMID:23704123

90) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of Liver Cancer Progenitors Whose Malignant Progression Depends on Autocrine Il-6 Signaling. *Cell* 2013;155(2): 384-96.

91) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. The Impact of Pnpla3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatol Res* 2013. [Epub ahead of

print]

I. 知的所有権の出願・取得状況  
なし

J. その他  
なし



厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

C型肝炎の病態・進展に及ぼす PNPLA3 遺伝子多型

研究分担者 岡上 武 大阪府済生会吹田病院 院長  
共同研究者

伊藤義人 京都府立医科大学 消化器内科 教授  
川口喬久 京都大学ゲノム秋学解析センター 助教  
松田文彦 京都大学ゲノム秋学解析センター 教授

研究要旨：C型肝炎ではインスリン抵抗性を呈し、組織学的には炎症と共に高率に脂肪肝が認められ、これらの病態は非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に類似している。我々は以前、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)を対象に網羅的遺伝子関連解析(GWAS)を行い、中性脂肪の代謝に関与し 22 番染色体近傍に存在する patatin-like phospholipase containing 3(PNPLA3)が NASH の発症・進展の感受性遺伝子であることを報告したが、今回 C 型肝炎の脂肪蓄積や線維化進展に PNPLA3 が関与しているか否か検討した。対象は肝生検を施行した C 型肝炎 414 例で TaqMan PCR で PNPLA3 の rs738409 の SNP を解析し、403 例(97.3%)で SNP を解析しえた。解析対象は C 型肝炎で、肝機能持続正常(PNALT) 36 例、慢性肝炎 273 例、肝硬変 27 例、肝癌 67 例である。脂肪蓄積の程度を 1%以下、1～10%、11～33%、34%以上の 4 群に分け、線維化の程度は F0,F1,F2,F3, F4 に分類した。PNPLA3 の rs738409 は、C 型肝炎患者群において、線維化・脂肪蓄積に関連した。すなわち線形な解析では、線維化ステージで  $p=0.02$ 、脂肪蓄積で  $p=0.002$  であった。線維化ステージ F0,F1,F2 と F3,F4 の比較では、リスクアレル G について、調整後オッズ比=1.6、 $p=0.05$  であった。脂肪蓄積 0 と 1-3 の比較では、リスクアレル G について、調整後オッズ比=2.7、 $p=0.0009$  であった。

A. 研究目的

C 型肝炎例では高率にインスリン抵抗性を呈し、組織学的には炎症と共に高率に脂肪肝が認められ、インスリン抵抗性や脂肪蓄積は病期の進展や発癌に関与していることが明らかになっており、これらの病態は非アルコール性脂肪肝炎(NASH)に類似している。我々は以前、網羅的遺伝子関連解析(GWAS)の結果、中性脂肪の代謝に関与し

22 番染色体近傍に存在する patatin-like phospholipase containing 3(PNPLA3) が NASH の発症・進展の感受性遺伝子であることを報告したが、NASH と類似の病態を示す C 型肝炎において、脂肪蓄積や線維化進展に PNPLA3 が関与しているか否かを明らかにすることとした。

B. 研究方法

対象は済生会吹田病院と京都府立医科大学消化器内科で肝生検を施行した C 型肝炎 414 例で、TaqMan PCR で PNPLA3 の rs738409 の SNP を解析し、403 例(97.3%) で rs738409 の遺伝子型(SNP)を解析しえた。解析対象の内訳は肝機能持続正常 HCV carrier (PNALT) 36 例、慢性肝炎 273 例、肝硬変 27 例、肝癌 67 例である。肝細胞への脂肪蓄積の程度は 1% 以下、1~10%、11~33%、34% 以上の 4 群に分け、線維化の程度は F0 (線維化なし)、F1 (線維化軽度)、F2 (線維化中等度)、F3 (小葉改築傾向あり)、F4 (肝硬変) に分類した。患者背景は表 1 に示す如くである。

#### (倫理面の配慮)

遺伝子解析を含む本臨床研究に関しては済生会吹田病院と京都府立医科大学の倫理委員会の承認を受けた。患者の同意を得たうえで、採血を行った。

#### C. 研究結果

済生会吹田病院と京都府立医科大学の症例の比較と各病型間における PNPLA3 の rs738409 の遺伝子型(CC, CG, GG)の分布に有意な差はなかった(表 2)。rs738409 の遺伝子型 CC, CG, GG の 3 群間で血液生化学所見、肝組織所見で有意差を検討したが、血液生化学所見には有意差は無く、脂肪肝の有無(1%未満 vs 1%以上)と肝線維化の程度(F0,F1,F2 vs F3,F4)に有意な差を認めた(表 3)。慢性肝炎のみを対象として同様の検討を行ったが、結果は全症例を対象とした解析結果とほぼ同様であった(表 4)。すなわち、rs738409 がリスクアレル G を有する CG,GG の症例では脂肪蓄積が起きやすく、肝線維化も進展しやすい

ことを示す結果が得られた。

#### D. 考察

我々は以前肝生検で非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) と診断した 529 例を Matteoni 分類に従い組織分類し、GWAS を行い、PNPLA3 の rs738409 の遺伝多型が NASH 発症・進展の感受性遺伝子であることを報告したが(PLoS One 7(6): e38322, 2012)、今回 NASH と病態が類似する C 型肝炎でも類似する結果が得られた。すなわち C 型肝炎においては脂肪蓄積と線維化進展に PNPLA3 の遺伝子多型が関与していることが明らかになった。PNPLA3 は中性脂肪の代謝に関与しているがその役割は十分に明らかにされておらず、今後さらなる検討が必要であるが、今回の結果は C 型肝炎の予後、特に PNALT 症例の予後の検討に重要な意味を持つ可能性がある。

#### E. 結論

中性脂肪の代謝に関与する patatin-like phospholipase containing 3(PNPLA3)の SNP が C 型肝炎における脂肪蓄積と肝線維化の進展に関与している。

#### F. 健康危険情報

C 型肝炎で肝硬変・肝癌に進展する例は 30% 前後と考えられており、今回の結果は C 型肝炎患者の予後推定に役立つ可能性がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nishimura T, Yamaguchi K, Fujii H, Okada Y, Yokomizo C, Niimi T, Sumida Y, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Umemura A, Shima T, Okanoue T, Itoh Y. Prediction of a favorable clinical course in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum alanine aminotransferase levels: A long-term follow-up study. *Hepatol Res* 2013; 43: 557-562
- 2) Okada Y, Yamaguchi K, Nakajima T, Nishikawa T, Jo M, Mitsumoto Y, Kimura H, Nishimura T, Tochiki N, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y. Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Liv Int* 2013; 33: 301-311
- 3) Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H, Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, Okanoue T. Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2013;48: 515-525
- 4) Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, Saibara T, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anzai K, Fujimoto K, Okanoue T, Nakajima A. Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease(JSG-NAFLD). Noninvasive scoring systems in patients with nonalcoholic fatty liver disease with normal alanine aminotransferase. *J Gastroenterol* 2013;48: 1051-1060
- 5) Mitsuyoshi H, Yasui K, Yamaguchi K, Minami M, Okanoue T, Itoh Y. Pathogenic role of iron deposition in reticuloendothelial cells during the development of chronic hepatitis C. *Int J Hepatol* 2013;3013;686420. doi: 10
- 6) Kondo Y, Hasegawa G, Okada H, Senmaru T, Fukui M, Nakamura N, Sawada M, Kitawaki J, Okanoue T, Kishimoto Y, Amano A, Maruyama N, Obayashi H, Ishigami A. Leprdb/db mice with senescence marker protein-30 knockout (Leprdb/dbSmp30Y/2) exhibit increases in small dense-LDL and severe fatty liver despite being fed a standard diet. *PLoS One* 2013;8(6):e65698
- 7) Sumida Y, Naito Y, Tanaka S, Inada Y, Taketani H, Kanemasa K, Yasui K, Itoh Y, Okanoue T, Yoshikawa T. Long-term (>2 yr) efficacy of vitamin E for non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology* 2013; 60: 1445-1450
- 8) Nakahara T, Hyogo H, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Imajo K, Akita H, Tanaka S, Kanemasa K, Fijimoto K, Anzai K, Saibara T, Nakajima A, Itoh Y, Chayama K, Okanoue T; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease(JSG-NAFLD). Type 2

J Gastroenterol 2013 Nov 26 [Epub ahead print]

## 2.学会発表

- 1) Yamaguchi K, Nishimura T, Seko Y, Ishiba H, Okajima A, Sumida Y, Mitsuyoshi H, Yasui K, Minami M, Okanoue T, Itoh Y. Mouse non-alcoholic steatohepatitis livers up-regulate expression of T-cell regulatory gene PD-1 and LAG3. 65<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2013 Nov 2; Washington DC, USA
- 2) Tateishi R, Okanoue T, Fujiwara N, Okita K, Kiyosawa K, Omata M, Kumada H,

Hayashi N, Koike K. Categorization of non-B non-C hepatocellular carcinoma patients using hierarchical clustering. 65<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2013 Nov 2; Washington DC, USA

## 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

特記事項なし

表 1. 対象患者の背景

Trait	PNALT	chronic hepatitis	cirrhosis	HCC	P-value
n	36	273	27	67	
Source (Suit/Kyoto Pref Univ)	36/0	165/108	27/0	67/0	
age	54.8±15.6	57.9±12.3	69.2±10.7	73.5±7.4	2.4×10 <sup>-22</sup>
sex (M/F)	8/28	123/144	9/18	30/37	0.04
BMI	21.5±2.7	23.7±3.6	22.4±3.4	23.1±3.9	5.3×10 <sup>-4</sup>
Drinking (<1/1-3/3-5/5合)	34/1/1/0	146/8/5/6	22/2/2/1	56/6/4/1	0.32
AST	24.9±9.3	60.9±43.9	69.3±51.3	62.6±39.0	2.0×10 <sup>-13</sup>
ALT	24.0±10.8	73.5±58.7	53.2±45.8	48.0±27.4	5.6×10 <sup>-13</sup>
γ-GTP	21.9±12.3	66.5±84.0	66.0±92.5	56.9±42.3	6.0×10 <sup>-8</sup>
Total Cholesterol	189.1±12.1	176.7±33.4	140.5±34.3	157.0±32.6	2.6×10 <sup>-10</sup>
FPG	21.5±2.7	23.7±3.6	22.4±3.4	23.1±3.9	5.3×10 <sup>-4</sup>
TG	81.1±30.2	113.2±66.1	85.0±39.7	99.6±38.6	0.01
Albumin	4.2±0.8	4.0±0.5	3.3±0.6	3.3±0.5	5.2×10 <sup>-23</sup>
Platelet	20.0±6.4	16.6±6.1	8.1±3.2	11.1±4.9	4.1×10 <sup>-23</sup>
Ferritin	78.5±73.7	201.9±187.0	123.0±124.3	218.1±623.5	3.7×10 <sup>-5</sup>
Fibrosis stage (0/1/2/3/4)	7/23/2/1/0	3/90/82/44/11	0/0/1/2/7	0/2/2/3/4	3.6×10 <sup>-13</sup>
Adiposity (<1/≤10/≤33/>33%)	11/13/0/2	45/104/21/5	3/1/0/0	0/1/0/0	0.08
Hepatitis Activity (0/1/2/3)	6/23/3/1	1/100/100/26	0/1/4/4	0/0/6/1	1.6×10 <sup>-8</sup>
Core 70aa (W,W<M,W=M,W<M,M)	14/0/0/1/3	22/5/1/6/17	2/3/1/0/2	3/0/0/2/3	0.12
HCV genotype(1a/1b/2a/2b)	0/20/6/7	2/126/36/19	0/11/2/1	0/21/3/3	0.76
HCV RNA	6.3±0.9	6.1±1.0	5.6±1.3	6.0±0.9	0.15

n=403

表 2. rs738409遺伝子型解析結果

済生会吹田病院と京都府立医大消化器内科の症例解析結果

施設名	CC	CG	GG	Total	Allele Frequency (C)
済生会吹田病院	87	142	66	295	0.53
京都府立医科大学	33	57	18	108	0.57

P=0.42

対象症例別遺伝子型の分布

病期分類	CC	CG	GG	Total	Allele Frequency (C)
PNALT	10	14	12	36	0.46
慢性肝炎	87	135	51	273	0.54
肝硬変	8	13	6	27	0.53
肝癌	15	37	15	67	0.50

P=0.32

表 3. rs738409の遺伝子型と病態との関連性

Trait	CC	CG	GG	P-value
n	120	199	84	
Source (Suita/Kyoto Pref Univ)	87/33	142/57	66/18	0.40
age	61.6±12.3	61.0±13.9	60.2±14.0	0.73
Sex (M/F)	50/67	81/116	39/44	0.60
BMI	23.0±3.5	23.7±3.8	22.7±3.3	0.91
Drinking (<1/1-3/3-5/5合)	75/8/3/1	125/7/5/5	58/2/4/2	0.90
AST	57.9±48.4	59.7±42.5	56.6±35.7	0.45
ALT	64.3±56.7	64.1±54.1	60.1±46.7	0.70
γ-GTP	62.7±85.7	59.4±67.9	62.3±81.2	0.56
Total Cholesterol	175.1±33.9	169.3±33.5	174.0±40.1	0.23
FPG	106.2±27.5	105.2±21.5	106.5±21.1	0.60
TG	100.4±47.2	102.4±54.9	121.0±76.2	0.22
Albumin	3.9±0.6	3.8±0.6	3.9±0.5	0.90
Platelet	15.7±7.1	15.5±6.5	14.8±6.1	0.45
Ferritin	194.0±205.7	201.5±346.8	144.3±151.0	0.18
Fibrosis stage (0/1/2/3/4)	3/43/27/11/5	4/56/45/25/9	3/16/15/14/8	0.01
Adiposity (<1/≤10/≤33/>33%)	29/26/8/1	23/67/7/3	7/26/6/3	0.006
Hepatitis Activity (0/1/2/3)	3/42/31/10	2/65/57/13	2/17/24/9	0.15
Core 70aa (W,W<M,W=M,W<M,M)	10/2/0/1/4	20/5/1/4/12	10/2/1/3/9	0.12
HCV genotype(1a/1b/2a/2b)	0/43/19/11	1/90/20/10	1/45/8/9	0.19
HCV RNA	5.9±1.1	6.1±0.93	6.1±1.1	0.18

n=403

表 4. rs738409の遺伝子型とc型慢性肝炎の背景因子病態との関連性

Trait	CC	CG	GG	P-value
n	78	129	47	
Source (Suita/Kyoto Pref Univ)	45/33	72/57	29/18	0.73
age	59.1±11.0	57.5±12.8	58.9±12.3	0.85
Sex (M/F)	33/42	54/73	25/21	0.34
BMI	23.4±3.4	23.9±3.7	23.3±3.0	0.93
Drinking (<1/1-3/3-5/5合)				
AST	60.0±45.2	58.8±37.7	56.0±34.6	0.86
ALT	73.8±60.6	58.9±37.7	67.8±52.0	0.95
γ-GTP	68.5±101.5	58.1±62.5	64.0±80.6	0.63
Total Cholesterol	179.6±29.5	174.8±32.1	175.7±41.0	0.27
FPG	105.0±28.4	101.6±15.8	109.7±25.2	0.44
TG	105.6±51.1	106.2±54.4	130.5±81.8	0.29
Albumin	4.1±0.6	4.0±0.5	4.0±0.3	0.99
Platelet	17.2±7.5	16.5±5.6	16.2±5.1	0.59
Ferritin	203.8±213.2	192.0±160.4	191.2±177.0	0.85
Fibrosis stage (0/1/2/3/4)	1/27/28/8/2	1/45/41/21/5	0/8/11/12/4	0.0009
Adiposity (<1/≤10/≤33/>33%)	18/23/8/1	22/56/7/2	2/20/6/1	0.05
Hepatitis Activity (0/1/2/3)	0/31/28/6	1/53/49/10	0/8/18/7	0.09
Core 70aa (W,W<M,W=M,W<M,M)	5/1/0/1/2	10/4/0/2/10	4/1/1/2/5	0.31
HCV genotype(1a/1b/2a/2b)	0/28/13/9	1/61/13/6	1/28/4/3	0.14
HCV RNA	6.1±1.0	6.1±0.93	6.2±1.3	0.24

n=254

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

肝発癌における PPAR- $\alpha$  の役割に関する研究

研究分担者 西原利治 高知大学 教授

研究要旨：

MC4R 遺伝子に異常を有する症例は幼児期より食欲の抑制が困難なために高度肥満を呈し、10代で NASH を発症し、30代で肝硬変、ないし肝細胞癌を発症する。MC4R KO マウスも同様に高度肥満から NASH を発症し、全例で肝細胞癌を合併するので、NASH における自然発癌の解析には最も適したモデル動物である。他方、実験肝発癌で最も有名なものは PPAR- $\alpha$  の ligand の投与によるもので、肝発癌の promotion の過程に作用すると考えられている。そこで、今回、MC4R KO マウスの PPAR- $\alpha$  を KO した double knockout マウスを作成し、肝発癌の抑制が可能か検討した結果、MC4R KO マウスでは 100%の肝発癌が観察されたのに対して、MC4R と PPAR- $\alpha$  の double knockout マウスでは肝発癌は認められなかった。このことから、NASH における肝発癌には PPAR- $\alpha$  の活性化が必須の過程であることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年の肥満人口の増加を背景に脂肪肝の有病率は3割を超えている。このような脂肪肝は脂質異常症や高血圧の誘因であるばかりでなく、糖尿病や非アルコール性脂肪肝肝炎(NASH)の誘因としても知られている。これは、脂肪肝では肝細胞に過剰な中性脂肪が貯まるため、インスリンに対する感受性が低下し、高インスリン血症を伴い易いからである。高インスリン血症は肝細胞における脂肪酸の合成を促進し、腎では Na の再吸収を促進し、上記の合併症の基盤となる代謝異常を惹起する。さらに、蓄積した脂肪酸は転写因子である PPAR- $\alpha$  の内因性 ligand であることから、PPAR- $\alpha$  の慢性

的活性化をもたらし、肝細胞は常時高濃度のフリーラジカルに曝されることになる。実際、PPAR- $\alpha$  の ligand を長期間投与すると、マウスのみならずヒトでも肝細胞の癌化が促進(promotion)されることが知られている。

そこで、今回、我々は PPAR- $\alpha$  の慢性的活性化が脂肪肝に伴う肝障害、ことに NASH の発症に重要な働きをし、肝線維化の進行、さらには肝発癌の促進に繋がるのではないかと想定し、ヒト遺伝性 NASH のモデル動物（4型メラノコルチン受容体遺伝子 KO マウス：MC4RK0）と MC4R/PPAR- $\alpha$  double KO マウスを用いて、我々の仮説を検証したので報告する。

## B. 研究方法

雄性 MC4RK0 と MC4R/PPAR- double KO マウス各群 10 匹を高脂肪食で 12 ヶ月間飼育し、肝臓への炎症性細胞浸潤や線維化、肝発癌の有無を比較検討した。

(倫理面の配慮)

本検討は高知大学医学部倫理委員会の指導と承認のもとに、実験動物の苦痛が最少となるように配慮して行われた。

## C. 研究結果

MC4R はレプチンの下流にあってインスリンの分泌抑制に加えて、食欲抑制を担う。従って、MC4RK0 と MC4R/PPAR- double KO マウスは高インスリン血症とともに過食を生じ、高度肥満を呈する。

MC4RK0 マウスでは脂肪肝の進展と共に、炎症性細胞浸潤に加えて肝線維化が生じ、やがて全例で肝細胞癌の合併が観察された。他方、MC4R/PPAR- double KO マウスでは MC4RK0 マウスと同様に高度の脂肪肝を生じるものの、炎症性細胞浸潤や肝線維化は観察されず、肝発癌を生じることもなかった。

## D. 考察

MC4R 遺伝子に異常を有する症例は幼児期より高度肥満を呈する。日本人では劣性遺伝形式を取ることが知られている。他方、フランス人では優性遺伝形式を示し、高度肥満者の 1% に MC4R 遺伝子異常を認める。MC4R 遺伝子変異を持つこれらの症例は遺伝性 NASH を発症し、しばしば肝硬変で死亡することが知られている。従って、この遺

伝性疾患を研究すれば非遺伝性 NASH で観察される代謝異常に近い病態を知ることができるのではないかと考えられる。

MC4RK0 マウスでも高度肥満に伴う脂肪肝を背景に典型的な NASH の発症が観察されたことから予想に違わずヒト NASH の病態を反映する優れた NASH モデルと考えられた。

MC4RK0 マウスでは炎症細胞浸潤と著明な肝線維化の進展、肝細胞癌の合併が全例で観察され、MC4R/PPAR- double KO マウスでは炎症細胞浸潤は軽微で、肝線維化や肝細胞癌の合併を認めなかったとの成績がヒトに外挿可能であれば、NASH 治療に新たな breakthrough をもたらす可能性がある。

## E. 結論

MC4RK0 マウスはヒト遺伝性 NASH の病態を忠実に再現できるモデル動物である。MC4R/PPAR- double KO マウスでは NASH に特徴的な病理学的所見は認められなかったことから、PPAR- agonist による NASH の治療という新たなストラテジーに期待を抱かせるに十分な成績と考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Osawa Y, Suetsugu A, Matsushima-Nishiwaki R, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Seishima M, Kozawa O. Liver acid sphingomyelinase inhibits growth

- of metastatic colon cancer. *J Clin Invest* 2013; 123: 834-843
- 2) Ue M, Ikebe N, Munekage K, Ochi T, Ono M, Saibara T. Hepatocyte destruction with enhanced collagen synthesis in the liver of chronic hepatitis C patients on hemodialysis. *J Viral Hepat* 2013; 20:350-357.
  - 3) Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, Saibara T, Moriwaki H, Kozawa O. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells. *PLoS ONE* 2013;8: e65251.
  - 4) Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, Saibara T, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anzai K, Fujimoto K, Okanoue T, Nakajima A; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease (JSG-NAFLD). Noninvasive scoring systems in patients with nonalcoholic fatty liver disease with normal alanine aminotransferase levels. *J Gastroenterol* 2013;48:1051-60.
  - 5) Saibara T, Enomoto N, Kaneko S, Chayama K, Sata M, Imawari M, Onishi S, Okita K. Clinical efficacy of combination therapy with ME3738 and pegylated interferon alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatol Res.* 2013 Apr 19. doi: 10.1111/hepr.12139.
  - 6) Ono M, Ogasawara M, Hirose A, Mogami S, Ootake N, Aritake K, Higuchi T, Okamoto N, Sakamoto S, Yamamoto M, Urade Y, Saibara T, Oben JA. Bofutsushosan, a Japanese herbal (Kampo) medicine, attenuates progression of nonalcoholic steatohepatitis in mice. *J Gastroenterol* doi: 10.1007/s00535-013-0852-8
  - 7) Hasegawa T, Yamao K, Hijioka S, Bhatia V, Mizuno N, Hara K, Imaoka H, Niwa Y, Tajika M, Kondo S, Tanaka T, Shimizu Y, Kinoshita T, Kohsaki T, Nishimori I, Iwasaki S, Saibara T, Hosoda W, Yatabe Y. Evaluation of Ki-67 index in EUS-FNA specimens for the assessment of malignancy risk in pancreatic neuroendocrine tumors. *Endoscopy* 2014; 46: 32-38
  - 8) 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, Saibara T, Fujimoto K, Nakajima A; Japan Study Group of NAFLD (JSG-NAFLD). The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol.* 2013 Aug 22.
  - 9) Hashiba M, Ono M, Hyogo H, Ikeda Y, Masuda K, Yoshioka R, Ishikawa Y, Nagata Y, Munekage K, Ochi T, Hirose A, Nozaki-Fujimura Y, Noguchi S, Okamoto N, Chayama K, Suganuma N, Saibara T. Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease. *PLoS One.* 2013;8:e76161.
  - 10) Toda K, Hayashi Y, Yamashita A, Okabe M, Ono M, Saibara T. Aromatase-null mice

expressing enhanced green fluorescent protein in germ cells provide a model system to assess estrogen-dependent ovulatory responses. Transgenic Res. 2013 Nov 22.

11) 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, Saibara T, 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. 2013 Nov 26.

12) 越智経浩、宗景玄祐、小野正文、西原利治：非アルコール性脂肪肝(NASH)の診療 臨床と研究 90:183-187, 2013

13) 西原利治 非アルコール性脂肪性肝疾患(NASH/NAFLD)日本臨床内科医会誌 28:11-17, 2013

14) 西原利治、羽柴基、小野正文：特集 糖尿病と脂質代謝異常の病態リンク 糖尿病と脂肪肝 . Diabetes Frontier 24 : 408-411 , 2013

15) 徳光 敬太、小野正文、西原利治 NAFLD/NASH の疫学 28:403-407, 2013

16) 宮本敬子、小野正文、西原利治：非アルコール性脂肪性肝疾患の疾患関連遺伝

子 日本消化器病学会雑誌 110:1597-1601, 2013

17) 西原利治：肥満症と脂肪肝、NASH 内分泌代謝学 中尾一和編 449-450 頁、診断と治療社、東京、2013

18) 腰山裕一、湯川晋弘、西原利治：メタボ肝癌の高危険群 メタボ肝癌 小俣政男編 97-101 頁、アークメディア、東京、2013

## 2. 学会発表

1) 小野正文、羽柴基、西原利治：NASH 肝線維化に影響を及ぼす耐糖能異常の病態解析、第 99 回日本消化器病学会総会 シンポジウム 3 「NAFLD/NASH の病態解明と治療への展開」 東京 2013

## 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

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

非アルコール性脂肪性肝障害を基盤とした肝細胞癌に関する病理組織学的検討

研究分担者 橋本悦子 東京女子医科大学消化器内科 教授

研究要旨；わが国において急増している非アルコール性脂肪性肝障害を基盤とする肝細胞癌(NAFLD-HCC)の病理学的特徴を明らかにすることを目的とした。癌部・非癌部の組織を得たNAFLD-HCC34例において、臨床背景、主腫瘍径、分化度・組織型、癌部の早期肝細胞癌マーカー、肝前駆細胞マーカー、癌幹細胞関連因子、細胞分化・増殖制御因子の発現に関して、年齢・性をマッチさせたC型肝炎ウイルス関連のHCV-HCC34例と比較検討した。HCV-HCCと比較しNAFLD-HCCは主腫瘍径が大きく、癌部での脂肪性肝炎様所見を高率に認め、癌幹細胞関連分子Nanogを強く発現していた。

#### A. 研究目的

飽食の時代を迎えた我が国では、肥満・糖尿病などの生活習慣病に基づくメタボリックの急増に伴い、生活習慣病の肝病変である非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)が増加しており、日本人一般成人の約20%がNAFLDを合併していると考えられる。このような現況を受け肝細胞癌(HCC)の原因疾患としてNAFLDが注目されている。NAFLDを基盤とするHCC(NAFLD-HCC)は、絶対数・HCC全例中に占める割合ともに増加していることが複数の報告から明らかであり、今後さらなる増加が予想される。しかし、NAFLD-HCCの疫学的実態や肝発癌メカニズムなどは必ずしも明らかにされておらず、HCC発生高リスク群の囲い込みが成されていないのが現状である。

最近、HCCに関連する新たな病理学

的知見として、Salomaoらにより、癌部にsteatohepatic features (steatosis, Ballooning, Mallory 体、pericellular fibrosis)を認めるsteatohepatic HCC (SH-HCC)が発表された。SH-HCCの初報はC型肝炎ウイルス関連HCC(HCV-HCC)例であるが、その後の検討では、SH-HCCの基盤となる病変として最も重要なのはNAFLDとされている。しかしNAFLD-HCCとSH-HCCの関連やSH-HCCの生物学的特徴などは明らかでない。

SH-HCCとの関連を含め、NAFLD-HCCの病理学的特徴を明らかにすることは、NAFLDにおける発癌メカニズム解明の一助となる。発癌メカニズムの解明により、多数のNAFLD患者の中からHCC発生高リスク群の設定や臨床現場での効果的な症例囲い込みと能率的な外来フォローアップ体制の確立が可能となる。結果

として、HCC の早期発見と治療、さらには発癌抑止による HCC 発生率低減が可能となり、NAFLD 患者の予後改善と国民医療費全体の削減が期待される。そこで、今回 SH-HCC を含め NAFLD-HCC の病理学的・生物学的特徴を明らかにすることを目的として検討を行った。

## B．研究方法

1990 年から 2013 年までに当科で経験した NAFLD 677(男 58%)例中、HCC を合併し癌部および非癌部肝組織を採取した NAFLD-HCC 34 例(肝切除 30 例、RFA 時針生検 2 例、剖検 2 例) NAFLD-HCC と同時期に経験し年齢・性・組織採取方法をマッチさせた HCV-HCC 34 例を臨床病理学的に比較検討した。HCC の主腫瘍径・肉眼分類・分化度は 34 例で、組織型は肝切除例 30 例で評価した。

SH-HCC に関しては、癌部の steatosis, Ballooning, Mallory 体、pericellular fibrosis いずれも中等度以上の所見を 3 項目以上認めるものと定義し、各所見の出現率を検討した。

免疫組織学的検討は肝切除した 30 例で、早期 HCC 関連マーカー (HSP70, Glypican3, CD34)、肝前駆細胞マーカー (CK7,CK19)、癌幹細胞自己増殖促進分子 Nanog、細胞分化・増殖抑制因子 (リン酸化・非リン酸化 LKB1)、酸化的 DNA 傷害マーカー 8-OHdG に関して、癌部での染色性を評価した。統計は、数値は Mann-Whitney U 検定、比率はカイ 2 乗検定で解析し、P 値 0.05 未満を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究は医療情報と病理組織標本を用いた後ろ向き研究である。研究内容は東京女子医科大学倫理委員会の承認を受け同大学ホームページに収載されており、これをもって研究参加患者へのインフォームドコンセントとした。本研究ではヒトゲノム・遺伝子情報は取り扱わない。全データは症例番号のみで管理され個人を特定する情報は収集していない。解析用データファイルはアクセスにパスワードを設け、管理責任者(東京女子医科大学 消化器内科 谷合麻紀子)を決め管理した。

## C．研究結果

### 1．臨床背景(表 1)

BMI、肥満(BMI >25)・II 型糖尿病(DM)・脂質異常症(DL)の合併率はいずれも NAFLD-HCC で高かった。高血圧(HTN)では両群に差が無かった。

### 2．HCC の主腫瘍径・肉眼所見・分化度・組織型(表 2)

主腫瘍径は、中央値 40mm に対し 20mm と、NAFLD-HCC で HCV-HCC より高値であった。分化度は両群とも中分化が約 70%と最多であった。高分化型のうち、内部に中分化結節を含む nodule in nodule 型を呈した症例が 7 例含まれ、HCV-HCC の 3 例に対し高率であった。組織型は、両群とも索状型が最も多く約 70%程度であった。

### 3．SH-HCC の頻度、癌部の steatohepatic features 各特徴所見の出現頻度(表 3)

SH-HCC の頻度は 50%に対し 20%と NAFLD-HCC で高率であった。各特徴的所見の出現頻度も、steatosis,

ballooning, Mallory 体、pericellular fibrosis の全項目で NAFLD-HCC で有意に高い出現率を呈した。

#### 4. 免疫組織染色 (表 4)

早期 HCC 関連マーカーと肝前駆細胞関連マーカーに関しては、NAFLD-HCC と HCV-HCC 両群間に差は無かった。癌幹細胞・細胞分化増殖関連因子に関しては、癌部での陽性率で NAFLD-HCC と HCV-HCC 群間に差を認めたのは Nanog のみで、NAFLD-HCC で陽性率が高く、結節内の全癌細胞の 50%以上が陽性となった 6 例はいずれも NAFLD-HCC で、全例が SH-HCC であった。

#### D. 考察

NAFLD-HCC は、HCV-HCC と比較し肥満・生活習慣病合併率が高く、主腫瘍径が大きく、SH-HCC の頻度が高く、癌部の Nanog 陽性率が高く、癌部 Nanog 強陽性例は全例 NAFLD-HCC の SH-HCC 例であった。

NAFLD の年齢・性の分布には特徴があり、50 程度を境に若年層では男性例が多く、高齢層では女性例が多い。当科における NAFLD 全体の症例分布は 50 歳以下では男性が多く、50 歳以上では女性が多いが、年齢中央値男女とも約 71 歳の NAFLD-HCC は男性が 65% を占めた。この原因として、NAFLD における HCC 合併の危険因子とされる肥満・DM の合併率が男性で高いこと、男性で女性より高頻度に合併する喫煙・少量飲酒の影響などの関与が推測されているが、未だ明らかではない。

NAFLD-HCC では高分化型 HCC が

多いという複数の報告があるが、当科の検討では HCV-HCC と差が無かった。しかし、HCV-HCC に比し主腫瘍径が大きいにもかかわらず分化度が同等ということは、主腫瘍径のわりに高分化型が多いといえる。また、高分化型の中に中分化型の成分を含む症例は NAFLD-HCC に高頻度であったという事実も考慮を要する。

癌部 steatohepatitic features に関しては、前述のように 2010 年に初報告の論文において、対象疾患が HCV-HCC であり、その後複数の論文で、基盤となる肝疾患は様々であるが、癌部の steatohepatitic features は非癌部の脂肪沈着の有無と関連し、基盤となる疾患の中で最も重要なのは NAFLD と報告された。当科の検討でも、NAFLD-HCC は HCV-HCC に比較し SH-HCC の頻度が高く、また癌部 steatohepatitic features の各特徴的所見の出現頻度も高率であった。SH-HCC の生物学的特徴や NAFLD 自体あるいは HCC 病態との関連については今まで全く報告が無く、発癌メカニズムとの関連を含め、今後の重要な検討課題と考えられる。

今回検討した免疫染色の染色性の評価で、NAFLD-HCC と HCV-HCC で差異を認めたのは、Nanog のみであった。Nanog は癌幹細胞の自己増殖促進分子であり、その染色性の両群における差異が、非癌部の線維化の程度を含め発癌メカニズムや発癌危険因子の差異に繋がる可能性がある。今後、非癌部での発現との関連や動物モデルでの検証など更なる検討を要する。今回の検討では、当院における今回検討した期間の肝切除施行数は

HCV-HCC が NAFLD-HCC の約 20 倍程度と非常に差が大きく、統計解析とその解釈に困難があることが最大の問題点と考える。今後、多施設共同研究などを通し更なる症例集積を目指す。検討項目としては、今回の報告で検討しえなかった HCC 関連マーカー (Bmi-1, glutamine-synthetase, adenylate cyclase-associated protein2 など)、慢性炎症関連分子 (Cox2 など)、マロリー体関連分子 (抗コピキチン抗体, p62, CK18 など)、幹細胞関連分子 (Oct4, Sox9, GLP-1, CK18/8 など)、細胞分化・再生関連分子 (hepassocin など)、細胞周期・アポトーシス・DNA 修復関連分子 (Foxo など) などについて、主としての免疫組織学的手法により解析していく。また、最近 NAFLD に関連する腫瘍性病変で前癌病変としての意味合いから注目される肝細胞腺腫や過形成性結節などについても検討を加えていきたい。

#### E . 結論

NAFLD-HCC は HCV-HCC と比較し、SH-HCC と癌部 Nanog 強発現例を高率に認めた。

F . 健康危機情報  
なし

#### G . 研究発表

##### 1 . 論文発表

- 1) Hashimoto E, Taniai M, Tokushige K. Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH. J Gastroenterol Hepatol. 2013;28 Suppl 4:64-70
- 2) TokushigeK, HashimotoE, Kodama K. Hepatocarcinogenesis in

non-alcoholic fatty liver disease in Japan. J Gastroenterol Hepatol. 2013;28 Suppl 4:88-92

##### 2 . 学会発表

- 1) Kogiso M, Hashimoto E, Kodama K, Tobar M, Matsushita N, Torii N, Taniai M, Tokushige K, Shiratori K. Clinicopathological features of HCC derived from steatohepatitis. Hepatology アメリカ肝臓学会年次総会 Washington DC. 2013
- 2) Taniai M, Kodama K, Kogiso T, Torii N, Tokushige K, Hashimoto E. Comparison of Histopathological Features of Hepatocellular Carcinoma Rising from Nonalcoholic Fatty Liver Disease with Those of Hepatocellular Carcinoma Rising from Hepatitis C Virus-Related Chronic Liver Disease. ヨーロッパ肝臓学会年次総会 アムステルダム 2013
- 3) 小木曾 智美, 谷合 麻紀子, 橋本悦子. 非アルコール性脂肪性肝炎を基盤とした肝細胞癌の病理組織学的検討. 日本消化器病関連学会週間 東京 2013

#### 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

表1 NAFLD-HCCとHCV-HCC 臨床背景

	NAFLD-HCC n=34	HCV-HCC n=34	p値
<b>BMI</b>	<b>26.5</b> (22.4-35.6) kg/m <sup>2</sup>	<b>22.5</b> (20.7-30.3) kg/m <sup>2</sup>	<b>0.02</b>
<b>肥満合併</b>	<b>56%</b>	<b>29%</b>	<b>0.02</b>
<b>糖尿病合併</b>	<b>62%</b>	<b>44%</b>	<b>0.03</b>
<b>脂質異常症合併</b>	<b>53%</b>	<b>26%</b>	<b>0.02</b>
<b>高血圧合併</b>	<b>65%</b>	<b>56%</b>	<b>ns</b>

比率以外は中央値(range)で表示

表2 NAFLD-HCCとHCV-HCC 肉眼・組織所見

	NAFLD-HCC n=34	HCV-HCC n=34	p値
<b>発癌時主腫瘍径</b>	<b>40</b> (10-150)mm	<b>20</b> (8-45)mm	<b>0.03</b>
<b>発癌時単発</b>	<b>79%</b>	<b>74%</b>	<b>ns</b>
<b>肉眼所見 単結節型</b>	<b>65%</b>	<b>59%</b>	<b>ns</b>
<b>単結節周囲増殖型</b>	<b>20%</b>	<b>26%</b>	<b>ns</b>
<b>多結節融合型</b>	<b>12%</b>	<b>15%</b>	<b>ns</b>
<b>分化度*</b> 高分化	<b>38%</b>	<b>20%</b>	<b>ns</b>
中分化	<b>68%</b>	<b>71%</b>	<b>ns</b>
低分化	<b>9%</b>	<b>13%</b>	<b>ns</b>
<b>組織型**</b> 索状	<b>68%</b>	<b>73%</b>	<b>ns</b>
偽腺管	<b>17%</b>	<b>17%</b>	<b>ns</b>
充実	<b>3%</b>	<b>5%</b>	<b>ns</b>

\*結節内の主たる分化度 \*\* NAFLD-HCC30例、HCV-HCC30例で評価

表3 NAFLD-HCCとHCV-HCC steatohepatic HCC所見

	NAFLD-HCC n=34	HCV-HCC n=34	p値
<b>Steatohepatic HCC</b>	<b>50 %</b>	<b>24 %</b>	<b>0.01</b>
Steatosis なし	50 %	81 %	0.005
軽度	14 %	9 %	ns
中等度	33 %	9 %	0.001
高度	3 %	0 %	ns
Mallory体あり	59 %	15 %	0.002
癌細胞ballooningあり	56 %	9 %	<0.001
pericellular fibrosis なし	47 %	76 %	0.01
軽度	24 %	12 %	ns
中等度	29 %	12 %	ns

表4 NAFLD-HCCとHCV-HCC 免疫染色陽性率

	NAFLD-HCC n=30	HCV-HCC n=30	p値
Hep-1	100 %	97 %	ns
HSP-70	60 %	57 %	ns
Glypican-3	77 %	73 %	ns
CD34	63 %	70 %	ns
CK7	3 %	7 %	ns
CK19	13 %	17 %	ns
Nanog	50 %	17 %	0.02
リン酸化LKB-1	86 %	83 %	ns
非リン酸化LKB-1	100 %	100 %	ns
8-OHdG	73 %	77 %	ns

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）

C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

HCV および NASH による代謝パスウェイ異常と肝細胞癌の関連解析

研究分担者 田中真二 東京医科歯科大学肝胆膵外科 准教授

研究要旨：生活習慣病などに伴う、C型肝炎及び非ウイルス性肝癌の肝切除検体を用いた網羅的遺伝子発現解析から遺伝子機能(gene ontology)解析を行い、代謝関連肝癌に特異的な遺伝子パスウェイを同定し、代謝関連肝癌の発癌及び再発リスクに対する臨床病理学的、分子生物学的意義を検証する。

A. 研究目的

肝癌切除検体の癌部・非癌部組織の網羅的遺伝子発現解析から、肥満度や糖尿病歴などの代謝関連臨床因子のクラスタ解析を行い、さらに遺伝子機能(gene ontology)解析を行って代謝関連肝癌に特異的な遺伝子パスウェイを同定し、代謝関連肝癌の発癌及び再発リスクに対する臨床病理学的、分子生物学的意義を検証する。

B. 研究方法

2000年から2012年までに当科で初回肝切除を施行した肝癌555例を対象として、背景肝疾患別に代謝関連因子などの臨床病理学因子の検討を行った。また当教室にて保有する153例の肝癌切除検体の癌部・非癌部組織の網羅的遺伝子発現解析結果を、肥満度や糖尿病歴などの代謝関連臨床因子でクラスタ解析を行い、発現と相関のある遺伝子を抽出する。続いて遺伝子機能(gene ontology)解析を行って遺伝子パスウェイ異常を同定し、代謝関連肝癌特異的な臨床病

理的因子との相関を解明する。

（倫理面の配慮）

【ヒトゲノム・遺伝子解析研究】：「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の定める細則に従って、倫理審査委員会の審査を経る手続きを行う。

C. 研究結果

症例はB型肝炎101例、C型肝炎286例、重複感染4例、NBNC164例であった。NBNC肝癌はC型肝炎に比べて有意に男性に多く、B型肝炎に比べて高齢発症であり、背景肝は肝硬変が少なかった。腫瘍因子では有意にAFPが低く、vp2以上の割合も少なかったが、腫瘍径はB型肝炎と同程度に大きかった。NBNC肝癌の予後は、B型肝炎・C型肝炎に比べて無再発生存期間、全生存期間とも有意に良好であった( $p < 0.005$ )。またB型肝炎、C型肝炎、NBNC肝癌の代謝関連因子の割合は、肥満(BMI30以上)は1%、2.3%、8.3%、糖尿病合併は13.3%、17.2%、

49.4%、高血圧合併は 20%、45.5%、61%、高脂血症合併は 11.4%、17.2%、25.6%、アルコール多飲(70g/day 以上)は 30.5%、33.8%、49.4%とすべて NBNC 肝癌で多かった。遺伝子機能解析では、NBNC 肝癌の癌部において糖尿病と高血圧に正相関する群では 84 遺伝子で発現異常を認め、細胞周期関連遺伝子群に有意な発現異常を認めた ( $p=0.002$ )。非癌部において糖尿病と肥満に正相関する群では 90 遺伝子で発現異常を認め、細胞接着関連遺伝子群に有意な発現異常を認めた ( $p < 0.001$ )。これらの遺伝子群は C 型肝癌における解析では有意差を認めず、NBNC 肝癌で特徴的な遺伝子発現異常と考えられた。また年齢及び脂質代謝異常症と逆相関し、肥満度と正相関する群では、非癌部 10 遺伝子に有意な発現異常を認め、エンドサイトーシス関連遺伝子群に異常が認められた。さらに、そのうちいくつかの遺伝子では、遺伝子発現と術後無再発生存期間とに有意な相関が認められた。

#### D. 考察

非ウイルス性肝癌は代謝関連因子との関連が強く、それら代謝関連肝癌は、ウイルス性肝癌とは別の特異的な遺伝子機能異常を内包している。その発癌及び悪性化メカニズムの解明が、代謝関連肝癌に対する新たな分子マーカーや分子標的の開発に寄与すると考えられる。

#### E. 結論

臨床検体の網羅的遺伝子発現解析の結果、代謝関連肝癌に特異的な遺伝子発現異常を認め、予後との相関が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

- 19) Sato K, Tanaka S, Mitsunori Y, Mogushi K, Yasen M, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S. Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography for vascular imaging of hepatocellular carcinoma; clinical and biological significance. *Hepatology*, 2013;57(4):1436-1447
- 20) Muramatsu S, Tanaka S, Mogushi K, Adikrisna R, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Nakayama K, Tanaka H, Yamaoka S, Arii S. Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma enlightened in vivo significance of tumor-host interaction and clinical implication. *Hepatology*, 2013;58(1):218-228.
- 21) Furuta M, Kozaki KI, Tanimoto K, Tanaka S, Arii S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, Inazawa J. The Tumor-suppressive mir-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(3):e60155.
- 22) Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Tanabe M, Arii S. Age-related clinicopathological and molecular features of patients received curative hepatectomy for hepatocellular

carcinoma. American Journal of Surgery, in press

23) Kudo A, Tanaka S, Ban D, Matsumura S, Irie T, Ochiai T, Nakamura N, Arii S, Tanabe M. Alcohol consumption and recurrence of non-B or non-C hepatocellular carcinoma after hepatectomy: a propensity score analysis. Journal of Gastroenterology, in press

24) Ogawa K, Tanaka S, Matsumura S, Murakata A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanabe M, Arii S. EpCAM-Targeted therapy for human hepatocellular carcinoma. Annals of Surgical Oncology, in press

25) Kudo A, Mogushi K, Takayama T, Matsumura S, Ban D, Irie T, Ochiai T, Tanaka H, Anzai N, Sakamoto M, Tanaka S, Arii S. Mitochondrial metabolism in the Noncancerous Liver Determine the Occurrence of Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study. Journal of Gastroenterology, in press

## 2.学会発表

1) 田中真二、茂櫛薫、藍原有弘、村松俊輔、Rama Adikrisna、三浦智也、中尾圭介、松永浩子、勝田絵里子、松村聡、伴大輔、入江工、落合高德、工藤篤、中村典明、田中博、有井滋樹．肝細胞癌の再発様式に基づく新規分子標的治療の開発．第113回日本外科学会定期学術集会、福岡、2013（パネルディスカッション）

2) 松村聡、田中真二、茂櫛薫、伴大輔、落

合高德、入江工、工藤篤、中村典明、田中博、有井滋樹．遺伝子機能解析を用いた非ウイルス性肝癌発生メカニズムの解明．第113回日本外科学会定期学術集会、福岡、2013

3) 田中真二、Rama Adikrisna、村松俊輔、松村聡、伴大輔、落合高德、入江工、工藤篤、中村典明、有井滋樹．癌幹細胞のリアルタイムイメージングに基づいた標的治療の開発．第25回日本肝胆膵外科学会学術集会、宇都宮、2013（ミニシンポジウム）

4) 工藤篤、田中真二、伴大輔、松村聡、中村典明、入江工、落合高德、有井滋樹．肝切除後多中心性再発のバイオマーカー：背景肝のSLC22A7発現低下．第49回日本肝癌研究会、東京、2013（ワークショップ）

5) 田中真二、松村聡、茂櫛薫、伴大輔、落合高德、入江工、工藤篤、中村典明、田中博、有井滋樹．切除症例における非B非C肝細胞癌の臨床病理学的特徴と遺伝子発現解析．第49回日本肝癌研究会、東京、2013（パネルディスカッション 追加発言）

6) 小川康介、田中真二、松村聡、伴大輔、落合高德、入江工、工藤篤、中村典明．EpCAMを標的とした新規肝癌治療と幹細胞性に対する特異的効果．第68回日本消化器外科学会総会、宮崎、2013（ワークショップ）

7) Tanaka S, Adikrisna R, Mogushi K, Matsumura S, Aihara A, Ochiai T, Tanaka H, Yamaoka S, Arii S. English Oral Sessions E11-2: Characteristics of cancer stem cell (2).

Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma and tumor-host interaction. 第72回日本癌学会総会、横浜、2013

- 8) 田中真二、小川康介、有井滋樹．腫瘍形態に基づく肝細胞癌の遺伝子解析と特異的分子標的による治療戦略．第11回日本消化器外科学会大会、第21回日本消化器関連学会週間、東京、2013（シンポジウム）
- 9) 田中真二、伊藤浩光、有井滋樹．可視化癌幹細胞に基づいた分子生物学的特徴の解明と治療開発への展開．第11回日本消化器外科学会大会、第21回日本消化器関連学会週間、東京、2013（ワークショップ）
- 10) 松村聡、田中真二、有井滋樹．NASH及びメタボリックシンドローム関連肝癌を含む非ウイルス性肝癌切除症例の解析．第17回日本肝臓学会大会、第21回日本消化器関連学会週間、東京、2013（シンポジウム）
- 11) 田中真二、藍原有弘、松永浩子、茂櫛薫、中尾圭介、三浦智也、松村聡、伴大輔、入江工、落合高德、工藤篤、中村典明、田中博、田邊稔、有井滋樹．臨床検体に基づく肝細胞癌再発機序の解明と新規分子標的治療への応用展開．第51回日

本癌治療学会学術集会、京都、2013（臓器別シンポジウム）

- 12) Tanaka S, Muramatsu S, Adikrisna R, Mogushi K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Nakayama K, Tanaka H, Yamaoka S, Tanabe M, Arai S. Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma; tumor-host Interaction and clinical impact. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver diseases, Washington DC, USA, 2013
- 13) 田中真二、勝田絵里子、藍原有弘、松永浩子、中尾圭介、松村聡、伴大輔、落合高德、入江工、工藤篤、中村典明、有井滋樹、田邊稔．肝癌の再発治療の解析と再発パターンに基づく新規治療法の開発．第75回日本臨床外科学会総会、名古屋、2013（パネルディスカッション）

#### H.知的所有権の出願・取得状況

##### 1.特許取得

特記なし

##### 2.実用新案登録

特記なし

##### 3.その他

特記なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

インスリン抵抗性と NASH 病態の分子機構の解明に関する研究

研究分担者 植木浩二郎 東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科 准教授

研究要旨：肥満・インスリン抵抗性によって引き起こされる NAFLD/NASH の病態形成において、ER ストレスが関与することを見いだした。ER ストレスは、食事によっても惹起されるが、シャペロン分子の誘導によって適切に終息する。本研究では、正常状態で摂食により誘導される機能未知分子 Sdf211 がコシャペロン分子であること、肥満動物モデルでは肝臓での Sdf211 の発現が低下しており、その補充によって血糖値や脂肪肝が改善することを見いだした。また、肝臓特異的 Sdf211 ノックアウトマウスでは、耐糖能異常と肝脂肪蓄積増加が認められた。さらに、ヒト肝生検サンプルを用いた解析では、Sdf211 など ER ストレス終息シグナル分子の発現が低下しているほど、NASH 病変が進行することが明らかとなった。

A. 研究目的

肥満等のインスリン抵抗性状態においては、インスリン抵抗性・過栄養による脂肪沈着という 1st hit と肝臓における慢性炎症や ER ストレスなどの細胞ストレスという 2nd hit があってはじめて NASH の病態が確立するといわれているが、その相互作用の分子メカニズムを明らかにすることによって、治療への応用の可能性を探究する。また、この関連を実際に肝機能障害患者の生検サンプルを用いて検証する。

B. 研究方法

常法により Sdf211 flox マウスを樹立した。これにアデノウイルスによって Cre リコンビナーゼを発現させることによって、肝臓特異的 Sdf211 ノックアウトマウスを作成した。LacZ アデノウイルスを投与したマウス

をコントロールとして、肝臓特異的 Sdf211 ノックアウトマウスの糖代謝・肝臓での ER ストレス・脂肪蓄積などを検討した。消化器内科入院中の患者において、OGTT、肝生検を施行し、生検サンプルにおいて ER ストレス関連遺伝子の発現を解析した。

（倫理面の配慮）

， で行う動物実験に関しては、東京大学医学部組み換え DNA 実験安全委員会において承認されている。 のヒトにおける検証については、医学部倫理委員会の承認されており、データは匿名化された上で解析されるため、個人情報保護される。

C. 研究結果

肝臓特異的 Sdf211 ノックアウトマウスは、耐糖能障害を呈しており、肝臓の脂肪蓄積

も増加していた。また、ノックアウトマウスの初代幹細胞では、ツニカマイシン刺激による ER ストレス反応が亢進・遷延していることが分かった。ヒト生検サンプルを用いて、XBP-1, BIP, CHOP, Sdf2l1 など ER ストレスの終息シグナルの発現を測定した。これらの発現が低下しているほど、耐糖能の低下や NASH の進展が認められた。

#### D. 考察

前年までの検討から、摂食により肝臓での ER ストレスが惹起され、Sdf2l1 等のシグナルの誘導によりそれが適切に終息すること、肥満ではその誘導が低下し、持続的な ER ストレスとそれによるインスリン抵抗性・肝脂肪蓄積が生じることを提唱した。今回の検討で、ER ストレス終息シグナルと考えられる Sdf2l1 を肝臓特的にノックアウトすると、確かに ER ストレスの遷延と耐糖能障害・肝脂肪蓄積の増大が起きていることが明らかとなった。ヒト生検サンプルの検討でも、ER ストレスシグナルの発現が低下しているほど、ER ストレスが遷延し、耐糖能障害・NASH の進展が生じていると考えられた。

#### E. 結論

Sdf2l1 をはじめとする肝臓での ER ストレス終息シグナルは、肝臓の糖脂質代謝を正常に維持するために必須であり、その障害はインスリン抵抗性・肝脂肪蓄積などを進行させて、NASH 病態を進展させる。

#### F. 健康危険情報

特に無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S, Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 2013;503:493-499
- 2) Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lyng J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, Ueki K, Ingwersen SH, Pedersen BK, Kadowaki T. Body Composition is Main Determinant for the Difference in Type 2 Diabetes Pathophysiology between Japanese and Caucasians. *Diabetes Care* 2013; Oct 15 (Epub ahead of print)
- 3) Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S and Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503:493-499, 2013
- 4) Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lyng J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, Ueki K, Ingwersen SH, Pedersen BK and Kadowaki T. Body Composition is Main Determinant for the Difference in Type 2 Diabetes Pathophysiology between

Japanese and Caucasians. *Diabetes Care*  
2013

3.その他  
無し

- 5) Nakaya K, Kubota N, Takamoto I, Kubota T, Katsuyama H, Sato H, Tokuyama K, Hashimoto S, Goto M, Jomori T, Ueki K, Kadowaki T. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet. *Metabolism* 2013;62:939-951

## 2.学会発表

- 14) 植木浩二郎 肥満症治療の課題と展望  
第 63 回日本体質医学会総会 2013 年  
久留米 (シンポジウム)
- 15) 植木浩二郎 肥満症とがん 第 34 回日本肥満学会 2013 年 東京 (教育講演)
- 16) Kohjiro Ueki Potential effects of treatment for diabetes on the cancer risk 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 横浜 (シンポジウム)
- 17) 植木浩二郎 PI3K とインスリン作用  
第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会  
2013 年 熊本 (特別シンポジウム)

## H. 知的所有権の出願・取得状況

### 1.特許取得

無し

### 2.実用新案登録

無し

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

C型肝炎肝発癌における代謝要因・ウイルス要因の影響

研究分担者 芥田憲夫 国家公務員共済組合連合会 虎の門病院 肝臓内科 医長

研究要旨：C型肝炎 SVR 後発癌における代謝・宿主・ウイルス要因の影響を検討した。肝発癌に寄与する独立要因は、多変量解析で年齢・性別・肝線維化以外にウイルス要因(HCV-1b Core aa70 Mutant)が抽出された。代謝要因も単変量解析では肝発癌率に影響していた。更に、Core aa70 Mutant 定量系(Q-Invader assay 法)を用いて抗ウイルス効果、肝発癌への影響を検討した。前治療無効例に対する Telaprevir 併用療法では aa70 Mutant 頻度が低い症例で治療感受性を示すことが確認された。また、肝発癌の検討で、肝発癌前より aa70 Mutant 頻度は増加傾向を示し、*IL28B* 遺伝子多型の影響を受けながら Mutant の頻度が経時的に変化する可能性も示唆された。今後は、非発癌例の経過とも比較していく必要がある。

A. 研究目的

C型肝炎病態進行には代謝要因が関与している。我々は、新規の肝発癌抑制療法の手掛りを見出すことを目的としてC型肝炎肝発癌症例における代謝・宿主・ウイルス要因の影響を検討してきた。本年度は、ウイルス排除後のSVR後肝発癌に影響する要因を検討した。更に、HCV-1b Core aa70 Mutant 定量系を用いて最新治療における抗ウイルス効果、肝発癌へのウイルス要因の影響を検討した。

B. 研究方法

(検討1) IFN 関連療法施行後にSVRに至った2,660例を対象として代謝・宿主・ウイルス要因の影響を検討した。代謝要因からは総コレステロール・HDL コレステロール・LDL コレステロール・中性脂肪・Body mass index、宿主要因からは *IL28B* 遺伝子

多型、ウイルス要因からはHCV-1b Core アミノ酸置換を含む15個の因子を検討項目として多変量解析を施行した。

(検討2) HCV-1b Core aa70 Mutant 定量系(Q-Invader assay 法, BML) (Invader 法)を用いて抗ウイルス効果、肝発癌への影響を検討した。抗ウイルス効果に関してはHCV-1b・高ウイルス量の前治療無効72例を対象に、Telaprevir/PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果を評価した。更に、肝発癌に関してはRNA持続陽性の連続44例を対象に、発癌前後のaa70 Mutant 頻度の経時変化を評価した。

(倫理面の配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者

が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した(新GCPに遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

### C. 研究結果

(検討1) SVR後肝発癌に寄与する要因を多変量解析(Cox proportional hazard model)で検討すると、年齢(50歳以上)、性別(男性)、肝線維化(F2以上)、HCV subgroup(HCV-1b Core aa70 Mutant)が独立要因として抽出された( $P < 0.01$ )。脂質要因では、総コレステロール(190 mg/dl未満)、HDLコレステロール(50 mg/dl未満)、中性脂肪(150 mg/dl以上)が単変量解析では肝発癌に影響していたが( $P < 0.05$ )、何れも多変量解析では独立要因として抽出されず。

(検討2) 前治療無効例のTelaprevir併用療法における抗ウイルス効果の検討では、Invader法でaa70 Mutant頻度が1.0%未満の症例のSVR率は67%(16/24例)、前治療無効かつIL28B nonTTでMutant 1.0%未満の症例のSVR率も67%(4/6例)と何れも高いSVR率が得られた。前治療Partial responderでMutant 1.0%未満の症例のSVR率が100%(2/2例)であるのに対して、前治療Null responderでMutant 99.0%以上の症例のSVR率は20%(2/10例)と低いSVR率であった。この様に、前治療無効例に対するTelaprevir併用療法ではaa70 Mutant頻度が低い症例で治療感受性を示すことが確認された。

肝発癌の検討でaa70 Mutant頻度の経過は、経過持続的に低頻度を推移(持続Low)、

持続的に高頻度を推移(持続High)、中頻度を推移(変動)、低頻度から高頻度に移行(Low-High)、高頻度から低頻度に移行(High-Low)の5グループに分けられることが確認された。全症例で各経時的なaa70 Mutant頻度の中央値(10例以上のdataが存在するポイントのみ)を評価すると、肝発癌の15年前のMutant頻度6%、10年前58%、5年前67%、肝発癌時74%と経時的に増加することが確認された。この様に、肝発癌前後で、aa70 Mutantは様々な変動パターンを呈したが、全体で評価すると肝発癌前より既にMutantの頻度は増加傾向を示した。

更にIL28B別に各経時的なaa70 Mutant頻度の中央値(5例以上のdataが存在するポイントのみ)を評価すると、TT群(21例)では肝発癌の5年前に7%が肝発癌時13%と6%の増加に留まったのに対して、nonTT群(7例)では肝発癌の5年前に47%が肝発癌時93%と46%も増加していた。この様に、宿主要因の影響も受けながらMutantの頻度が経時的に変化する可能性が示された。

### D. 考察

トランスジェニック・マウスによる動物実験ではHCV core蛋白による肝細胞脂肪化・インスリン抵抗性といった脂質/糖代謝への影響やそれらを介した肝発癌への影響が報告されてきた。当施設の検討は、このような基礎的な検討を臨床面から支持する成績であるといえる。

今回の検討では、ウイルス排除前のCoreアミノ酸置換の状態がSVR後肝発癌にまで影響することが確認された。これはイニシエーターとしてのHCVが排除された状態に

あっても、Core aa70 Mutant の症例ではウイルス排除前の段階で既に肝発癌の素地が出来上がっている可能性を示唆する所見と思われる。

プロテアーゼ阻害剤併用療法で治癒しない症例からは NS3 領域の薬剤耐性ウイルスの出現が懸念される。Core aa70 Mutant 定量系を用いることで前治療無効例に対する第一世代プロテアーゼ阻害剤の Telaprevir 併用療法における治療効果予測の精度を更に改善出来る可能性が示唆された。今後は、第二世代の Simeprevir 併用療法でもその有用性を検討していく必要がある。

今回の肝発癌例のみの検討では、肝発癌の10年前より既に aa70 Mutant 頻度が増加傾向を示し、*IL28B* の様な宿主要因の影響も受けながら Mutant 頻度が経時的に変化する可能性も示唆された。今後は、その他の肝発癌危険因子である、年齢・性別・肝組織の影響も加味しながら総合的に Mutant 頻度の経時的な推移を評価していく必要がある。更に、今回の検討はあくまで肝発癌例のみの検討であるため、今後は非発癌例における Mutant 頻度の経時変化の経過とも比較していく必要がある。

#### E. 結論

(検討 1) ウイルス要因は年齢・性別・肝線維化から独立して SVR 後肝発癌に影響していた。

(検討 2) 前治療無効例に対する Telaprevir 併用療法では aa70 Mutant 頻度が低い症例で治療感受性を示すことが確認された。肝発癌例では、発癌前より aa70

Mutant 頻度が既に増加傾向を示し、宿主要因の影響も受けながら Mutant の頻度が経時的に変化する可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

今回の研究内容については特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 26) Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Med Virol* 2013;85:1028-1036.
- 27) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Prediction of treatment efficacy and telaprevir-resistant variants after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1. *J Clin Microbiol* 2013;51:2862-2868.
- 28) Seko Y, Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C Virus core region and lipid metabolism are associated with hepatocarcinogenesis in nonresponders to interferon plus ribavirin combination therapy. *Intervirology* 2013;56:13-21.
- 29) Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y,

Kawamura Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013;57:964-973.

30) Akuta N, Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, 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* 2014;52:193-200.

## 2. 学会発表

1) Akuta N, Suzuki F, Hara T, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Pretreatment prediction of sustained virological response and telaprevir-resistant variants by ultra-deep sequencing in HCV genotype 1 patients treated with triple therapy. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington, DC. 2013.

## H. 知的所有権の出願・取得状況

### 1. 特許取得

今回の研究内容については特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

非アルコール性脂肪性肝炎マウスモデルにおける消化管ホルモンと  
肝脂肪酸組成に関する研究

研究分担者 川口 巧 久留米大学医学部 消化器疾患情報講座 講師

研究要旨：消化管ホルモンである glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、糖・脂質代謝に関与することが報告されているが、GLP-1 の非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) におよぼす影響は未だ不明である。本研究の目的は、GLP-1 が NASH マウスモデルにおよぼす影響を検討することである。NASH モデルマウスに対し、GLP-1 受容体作動薬 exendin-4 (n = 4) もしくは生食 (n = 4) を 8 週間連日投与し、non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score、肝組織中の脂肪酸組成、および  $\Delta^5$  デサチュラーゼ index を評価した。Exendin-4 投与群はコントロール群と比較し、有意な体重増加の抑制と NAFLD activity score の低下を認めた。Exendin-4 投与群の肝組織中の長鎖脂肪酸値および n-6 系不飽和脂肪酸値は、コントロール群と比較して有意に高値であった ( $23240 \pm 955$  vs.  $31710 \pm 8436$   $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{liver}$ ,  $P < 0.05$ ;  $16166 \pm 943$  vs.  $23937 \pm 7845$   $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{liver}$ ,  $P < 0.05$ )。一方、Exendin-4 投与群の肝組織中  $\Delta^5$  デサチュラーゼ index は、コントロール群と比較して有意に低値であった ( $31.1 \pm 12.4$  vs.  $10.5 \pm 3.1$ ,  $P < 0.05$ )。本研究により、exendin-4 は NASH モデルマウスの肝障害を抑制することが明らかとなった。また、肝臓における脂肪酸代謝酵素の活性調節と脂肪酸組成の変化が exendin-4 による NASH 改善の一機序である可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) は欧米諸国だけでなく、本邦においても急速に増加している肝疾患である。他方、消化管は、門脈を介して肝臓と臓器相関を形成しており、様々な肝疾患の発症に関わる。

消化管は、栄養素の消化・吸収を司るとともに、消化管ホルモンにより全身の代謝調節に関与する。なかでも、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、糖・脂質代謝に深

く関わる消化管ホルモンである。GLP-1 受容体は膵  $\beta$  細胞や心筋細胞だけでなく、肝細胞にも同定されており、これまでに GLP-1 は、protein kinase C 活性化や peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  の活性化を介して肝癌細胞内の中性脂肪含量を減少することが報告されている。

中性脂肪を構成する多価不飽和脂肪酸の一部は、律速酵素であるデサチュラーゼにより代謝され、炎症反応を制御するエイコサノイドの前駆体となる。n-3 系多価不飽

和脂肪酸はロイコトリエン B5 を含む炎症抑制性エイコサノイドの前駆体である。一方、n-6 系多価不飽和脂肪酸は、プロスタグランジン E2 を含む炎症促進性エイコサノイドの前駆体である。このように脂肪酸組成は炎症と密接に関係するが、NASH における GLP-1 と脂肪酸組成の関連未だ不明である。

本研究の目的は、GLP-1 受容体作動薬である exendin-4 が NASH マウスモデルの肝障害と肝組織中の脂肪酸組成におよぼす影響を検討することである。

## B. 研究方法

### 実験動物

NASH は 6 週齢の糖尿病モデルマウス (db/db mouse) をメチオニン・コリン欠乏食で飼育することにより誘導した。

### プロトコール

NASH モデルマウスに対し、exendin-4 (n = 4) (20 µg/kg; AnaSpec Inc. Fremont, CA) もしくは生食 (n = 4) を腹腔内に 8 週間連日投与した。14 週目で屠殺し、摘出した肝臓をホルマリン固定もしくは、液体窒素にて凍結した。

ホルマリン固定した肝臓は、hematoxylin-eosin 染色および Sudan IV 染色により、それぞれ nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score と肝組織中の中性脂肪含量を評価した。

### 脂肪酸分画

凍結肝組織より chloroform-methanol を用いて総脂肪酸を抽出し、ガスクロマトグラフィにより下記 24 の脂肪酸を測定した。

ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 $\gamma$  リノレン酸、リノレン酸、アラキジン酸、イコセン酸、イコサジエン酸、5,8,11-エイコサトリエン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘニン酸、エルカ酸、ドコサテトラエン酸、ドコサペンタエン酸、リグノセリン酸、ドコサヘキサエン酸、ネルボン酸

### 脂肪酸分類

脂肪酸分画の結果より、下記に従い脂肪酸を分類した。

アテローム性飽和脂肪酸：ラウリン酸、ミリスチン酸、およびパルミチン酸の総和

血栓形成性飽和脂肪酸：ミリスチン酸、パルミチン酸、およびステアリン酸の総和

中鎖飽和脂肪酸：ラウリン酸、ミリスチン酸、およびパルミチン酸の総和

長鎖飽和脂肪酸：ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘニン酸、およびリグノセリン酸の総和

n-3 系多価不飽和脂肪酸：リノレン酸、ドコサペンタエン酸、およびドコサヘキサエン酸の総和

n-6 系多価不飽和脂肪酸：リノール酸、 $\gamma$  リノレン酸、エイコサジエン酸、ジホモ  $\gamma$  リノレン酸、アラキドン酸、およびドコサテトラエン酸の総和

$\Delta^5$  デサチュラーゼ index：アラキドン酸/ $\gamma$  リノレン酸

データは実数もしくは平均 ± SD にて記載した。体重の経時変化は、two-factor repeated measures ANOVA にて検定した。2群間の比較は Wilcoxon rank sum test を用いて検定した。P 値が 0.05 以下の場合を統計学的に有意と判断した。

### (倫理面の配慮)

本研究は、本学倫理委員会および動物倫理委員会の承認を得て開始した。本研究では、「動物の愛護および管理に関する法律」、「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および日本学術会議策定の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に基づき実験を遂行した。屠殺は「動物の殺処分方法に関する指針」準拠して、可能な限り処分動物に苦痛を与えない方法を用いた。

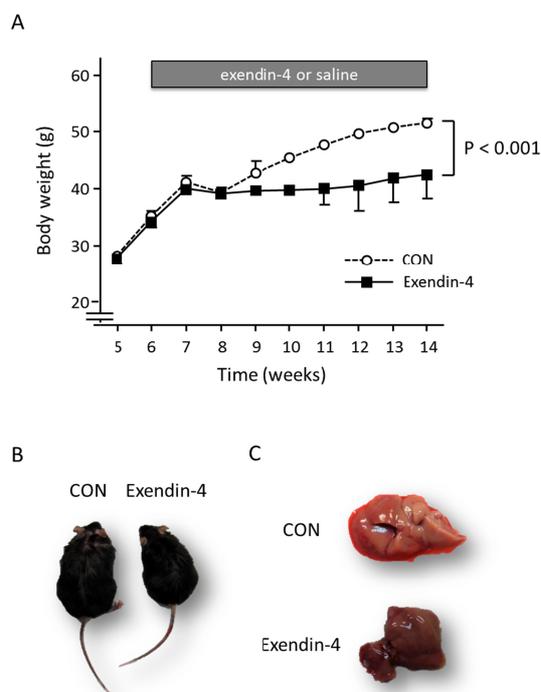
### C. 研究結果

Exendin-4 による体重と肝の肉眼所見の変化

コントロール群の体重は徐々に増加し、14 週齢で約 50 g となった。一方、Exendin-4 群は 7 週齢より体重はほぼ増加せず、14 週齢で約 40 g とコントロール群と比較し有意に低値であった (図 1A,  $P < 0.001$ , 図 1B)

Exendin-4 群の肝臓は、コントロール群の肝臓と比較して、褐色調であった (図 1C)。

図1



Exendin-4 による肝組織所見、肝組織中の中性脂肪含量、および NAFLD activity score の変化

両群ともに著明な肝線維化は認めなかったが、Exendin-4 群における肝小葉内の炎症、肝細胞内の脂肪蓄積や肝細胞風船様変化は、コントロール群と比較して抑制されていた (図 2A)。Exendin-4 群における NAFLD activity score はコントロール群と比較して有意に低値であった (図 2B)。

Exendin-4 が肝組織中飽和脂肪酸におよぼす影響

Exendin-4 群における肝組織中の飽和脂肪酸値はコントロール群と比較し有意な変化は認めなかった (表 1)。また、アテローム性飽和脂肪酸値、血栓形成性飽和脂肪酸値、中鎖飽和脂肪酸値、および長鎖飽和脂肪酸濃度値も両群間において有意差は認め

なかった（表 1）。

図2

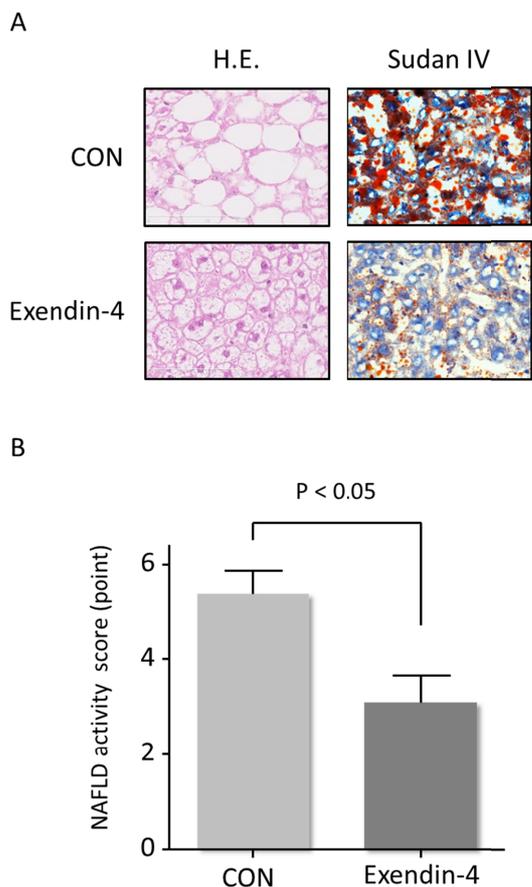
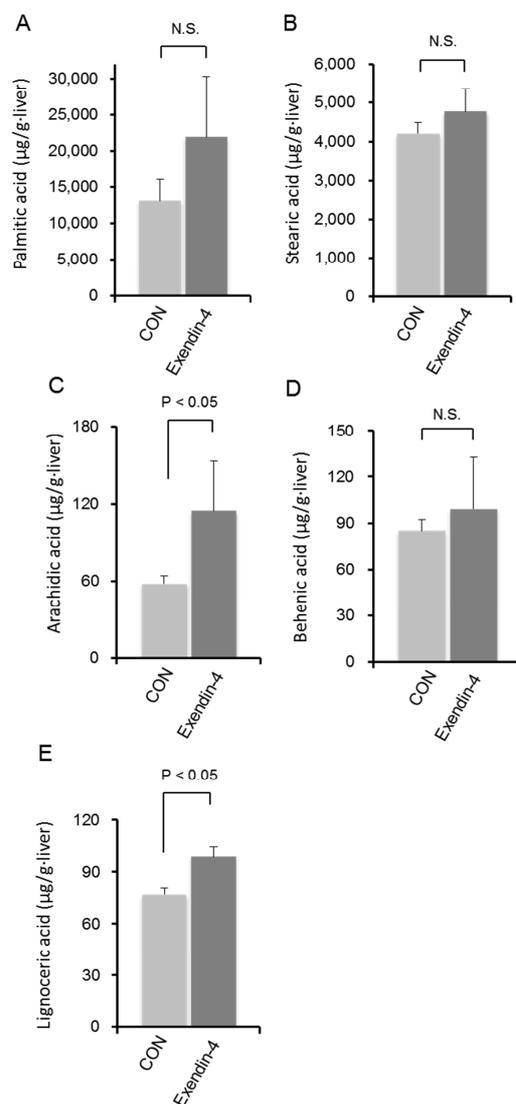


表 1. Exendin-4 が肝内飽和脂肪酸におよぼす影響

	Control ( $\mu\text{g/g-liver}$ )	Exendin-4 ( $\mu\text{g/g-liver}$ )	P
飽和脂肪酸	17838 $\pm$ 3248	27541 $\pm$ 9273	N.S.
アテローム性飽和脂肪酸	13414 $\pm$ 2981	22457 $\pm$ 8670	N.S.
血栓形成性飽和脂肪酸	17605 $\pm$ 3244	27210 $\pm$ 9260	N.S.
中鎖飽和脂肪酸	15233 $\pm$ 3554	25186 $\pm$ 9799	N.S.
長鎖飽和脂肪酸	23240 $\pm$ 955	31710 $\pm$ 8436	< .05

肝組織中の長鎖飽和脂肪酸の分画を検討したところ、パルミチン酸値、ステアリン酸値、ベヘン酸値、およびリグノセリン酸値は両群間において有意差を認めなかったが、Exendin-4 群におけるアラキジン酸値とリグノセリン酸値はコントロール群と比較して、有意に高値であった（図 3A-E）。

図3



Exendin-4 が肝組織中不飽和脂肪酸におよぼす影響

Exendin-4 群における肝組織中の一価不飽和脂肪酸値はコントロール群と比較し

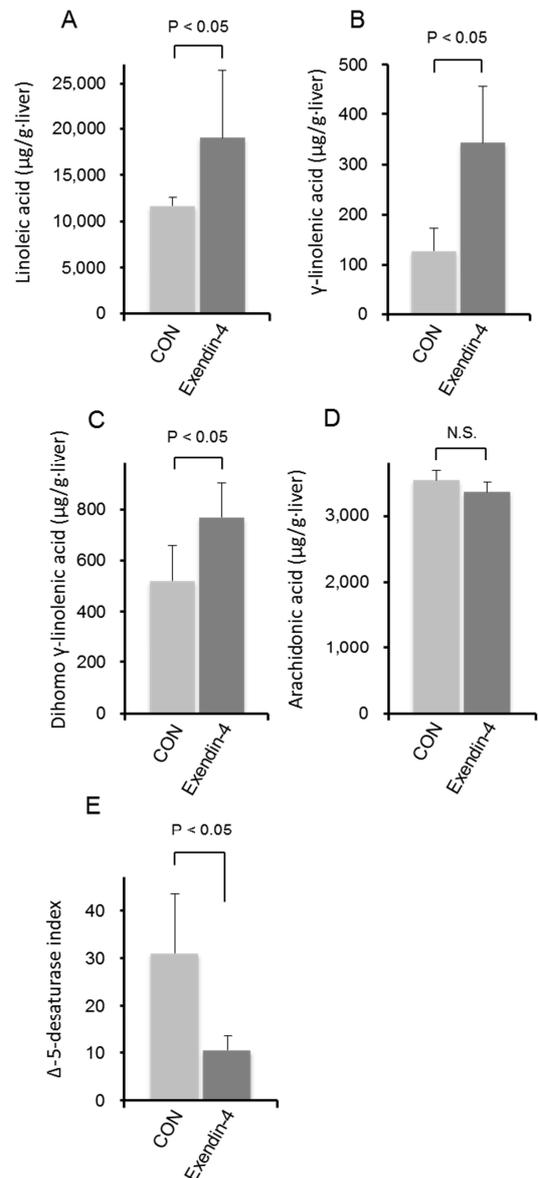
て有意な変化は認めなかった(表2)。一方、Exendin-4 群の肝組織中多価不飽和脂肪酸値はコントロール群と比較して有意に高値であった(表2)。また、Exendin-4 群の肝組織中 n-6 系多価不飽和脂肪酸値および n-3/n-6 系多価不飽和脂肪酸比もコントロール群と比較して有意に高値であった(表2)。

表 2. Exendin-4 が肝内不飽和脂肪酸におよぼす影響

	Control ( $\mu\text{g/g}\cdot\text{liver}$ )	Exendin-4 ( $\mu\text{g/g}\cdot\text{liver}$ )	P
一価不飽和脂肪酸	20355 $\pm$ 6701	34965 $\pm$ 14485	N.S.
多価不飽和脂肪酸	18410 $\pm$ 791	25986 $\pm$ 8050	< .05
n-3系多価不飽和脂肪酸	2218.5 $\pm$ 415.8	1992.4 $\pm$ 288.7	N.S.
n-6系多価不飽和脂肪酸	16166 $\pm$ 943	23937 $\pm$ 7845	< .05
n-3/n-6 多価不飽和脂肪酸	13.83 $\pm$ 3.15	8.73 $\pm$ 1.95	< .05

肝組織中 n-6 系多価不飽和脂肪酸の分画を検討したところ、アラキドン酸値は両群間において有意差を認めなかったが、Exendin-4 群におけるリノール酸値、 $\gamma$  リノレン酸値、およびジホモ- $\gamma$ -リノレン酸値は、コントロール群と比較して有意に高値であった(図 4A-D)。一方、Exendin-4 群における肝組織中の  $\Delta^5$  デサチュラーゼ index はコントロール群と比較して有意に低値であった(図 4E)。

図4



#### D. 考察

本研究により、GLP-1 受容体刺激剤である exendin-4 は、NASH モデルマウスの肝障害を抑制することが明らかとなった。また、exendin-4 による脂肪酸代謝酵素の活性調節と脂肪酸組成の変化が NASH 改善の一機序である可能性が示唆された。

本研究において、exendin-4 は NASH モデルマウスの体重増加と NAFLD activity score の上昇を抑制した。これまでに、GLP-1

受容体の発現は NASH モデルマウスや NASH 患者において抑制されていることが報告されている。また、GLP-1 受容体作動薬投与により、高脂肪食飼育ラットや ApoE ノックアウトマウスの肝障害が抑制されることも報告されている。このように、本研究における exendin-4 の体重減少効果と NASH 改善効果は既報の結果と類似していた。

GLP-1 受容体作動薬による NASH 改善効果の機序として、インスリン感受性の亢進、peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  の活性亢進、および  $\beta$  酸化の亢進が報告されている。しかしながら、GLP-1 受容体作動薬が脂肪酸組成におよぼす影響について未だ不明である。

長鎖飽和脂肪酸は炎症促進性の脂肪酸であり、NASH の発症に促進的に作用することが報告されている。しかしながら、本研究において Exendin-4 群の肝組織中長鎖飽和脂肪酸値は上昇していた。本研究における長鎖飽和脂肪酸と肝障害の関連が既報と一致しない理由は明らかではないが、長鎖飽和脂肪酸のなかでもアラキジン酸は apoB の分泌を促進して、リグノセリン酸はセラミド代謝を調節して肝細胞への脂肪蓄積を抑制することが報告されている。本研究において、長鎖飽和脂肪酸値の増加に寄与する脂肪酸分画はアラキジン酸とリグノセリン酸であることから、exendin-4 は長鎖飽和脂肪酸の組成を変化させることで、NASH に対する抑制作用を発揮している可能性が示唆された。

Exendin-4 群では、肝内の n-6 系多価不飽

和脂肪酸、特にリノール酸値、 $\gamma$  リノレン酸値、およびジホモ- $\gamma$ -リノレン酸値が高値であった。これらの脂肪酸は炎症促進性エイコサノイドの前駆体であり、NASH の発症に關与することが報告されている。本研究における n-6 系多価不飽和脂肪酸の変化は既報と一致しないが、脂肪酸代謝経路の律速酵素である  $\Delta^5$  デサチュラーゼの変化がその一因と考えられる。 $\Delta^5$  デサチュラーゼはジホモ- $\gamma$ -リノレン酸より炎症促進性エイコサノイドの産生を促進する酵素で、NASH 患者においてその活性は亢進していることが報告されている。また、 $\Delta^5$  デサチュラーゼ活性阻害剤 (CP-24879) により、炎症が抑制され、肝細胞内脂肪含量が低下することが報告されている。本研究結果と、これら既報の研究結果は、exendin-4 が肝組織中  $\Delta^5$  デサチュラーゼの活性を阻害し、炎症促進性エイコサノイドの産生を抑制することで NASH を軽減している可能性が示唆される。

## E. 結論

本研究により、GLP-1 受容体刺激剤である exendin-4 は、NASH モデルマウスの肝障害を抑制することが明らかとなった。また、exendin-4 による脂肪酸代謝酵素の活性調節と脂肪酸組成の変化が NASH 改善の一機序と考えられた。これらの研究結果より、GLP-1/GLP-1 受容体の制御は NASH の治療ストラテジーとなる可能性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 31) Yamada S, Kawaguchi A, Kawaguchi T, Fukushima N, Kuromatsu R, Sumie S, Takata A, Nakano M, Satani M, Tonan T, Fujimoto K, Shima H, Kakuma T, Torimura T, Charlton MR, Sata M. Serum albumin level is a notable profiling factor for non-B, non-C hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma: A data-mining analysis. *Hepatology Res.* 2014; in press.
- 32) Kawaguchi T, Nagao Y, Sata M. Independent factors associated with altered plasma active ghrelin levels in HCV-infected patients. *Liver Int.* 2013;33:1510-6.
- 33) Taniguchi E, Kawaguchi T, Sakata M, Itou M, Oriishi T, Sata M. Lipid profile is associated with the incidence of cognitive dysfunction in viral cirrhotic patients: A data-mining analysis. *Hepatology Res.* 2013;43:418-24.
- 34) Sakata M, Kawahara A, Kawaguchi T, Akiba J, Taira T, Taniguchi E, Abe M, Koga H, Kage M, Sata M. Decreased expression of insulin and increased expression of pancreatic transcription factor PDX-1 in islets in patients with liver cirrhosis: a comparative investigation using human autopsy specimens. *J Gastroenterol.* 2013;48:277-85.

### 2. 学会発表

- 18) 谷口英太郎、川口巧、佐田通夫. 肝硬変患者における潜在性肝性脳症関連因子の包括的検討：データマイニング解析、第40回 日本肝臓学会西部会、岐阜、2013.
- 19) 川口巧、長尾由実子、佐田通夫. C型慢性肝疾患患者における活性化グレリンの変化および代謝異常との関連、第50回 日本臨床分子医学会学術集会、東京、2013.
- 20) 大津山樹理、伊藤実、末継拓郎、今永美波、石井久美子、緒方奨、谷口英太郎、川口巧、居石哲治、大塚百香、後藤恵美子、佐田通夫、三浦比呂子. 持続血糖モニタリングシステムと遊離脂肪酸によるC型肝硬変患者の就寝中栄養評価の有用性、第28回 日本静脈経腸栄養学会学術集会、金沢、2013.

## 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

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

**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、アポリポ蛋白質 A (ApoB)や ApoE 等の VLDL 産生に關与する肝臟特異的因子が HCV の粒子産生に重要であ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 と ApoE 遺伝子を欠損させたダブルノックアウト Huh7 細胞を作製したところ、HCV の感染性粒子産生が顕著に抑制された。肝組織と Huh7 細胞でアポリポ蛋白質の発現を比較すると、Huh7 細胞では ApoB と ApoE 以外のアポリポ蛋白質の発現が肝組織よりも低いことが明らかになった。さらに、ダブルノックアウト細胞に ApoA や ApoC を発現させると HCV 粒子の産生を回復できることから、ApoA や ApoC も粒子産生に關与す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て、両親媒性の  $\alpha$ ヘリックスが繰り返し存在しており、これだけを発現させても 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。

**A. 研究目的**

HCV に感染すると肝硬変を経て高率に肝細胞癌を発症する。我が国には 2 百万人もの HCV 感染者が存在すると推定され、既感染者に対する有効な肝癌進展阻止法の開発が急務である。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。過去の報告で VLDL 産生に關わる 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、かつ非肝臟系の細胞株では、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 の粒子産生に關与しているにおいて感染指向性を規定していることが予想された。本研究は HCV 粒子の産生におけるアポリポ蛋白質の意義を検討し、新しい C 型肝炎治療法の開発の可能性を探ることを目的とした。

**B. 研究方法**

人工ヌクレアーゼをコードする mRNA を導入した細胞をクローニングし、ApoB あるいは ApoE のノックアウト Huh7 細胞株を樹立した。

また、ApoB と ApoE のダブルノックアウト (DKO) 細胞株も樹立した。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 の粒子産生に及ぼす影響を検討した。アポリポ蛋白質の 2 次構造は CLC Genomics Workbench により予測した。ApoC1 あるいは ApoE の欠損変異体を発現する DKO 細胞株を作製し、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。HCV 粒子を超遠心法で精製し、アポリポ蛋白質とウイルス粒子の結合を検討した。

（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、個人情報を厳格に管理、保存する。

### C. 研究結果

これまでの本研究班の研究で、HCV の完全な増殖を許容する新規細胞株、JHH4 と FU97 細胞を同定した。また、ApoE の欠損細胞を樹立することによって、HCV の粒子産生には、ApoE の機能を ApoB が代償することが明らかとなった。

ApoE と ApoB 遺伝子の両方を欠損させた DKO 細胞株では粒子産生能が顕著に抑制されていたことから、ApoB と ApoE が相補的に HCV の粒子産生に関与していることが示唆された。一方、cDNA マイクロアレイによる解析で、ヒト肝組織では全ての肝臓特異的なアポリポ蛋白質が高く発現しているのに対し、Huh7 細胞では ApoB と ApoE の発現は高いものの、ApoA や ApoC の発現が低かった。そこで、DKO 細胞に、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 だけでなく、ApoA1、ApoA2、ApoC1、ApoC2、および ApoC3 の発現によっても感染性粒子の産生が認められた。次に、DKO 細胞に発現することで、HCV の感染性粒子産生を回復できるアポリポ蛋白質の共通性を 2 次構造で予測したところ、これらのアポリポ蛋白質には共通して両親媒性  $\alpha$  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 と ApoE から、単一の  $\alpha$  ヘリックスだけを DKO 細胞に発現させるだけで、HCV の粒子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 の感染性粒子産生に関与していることが示唆された。さらに、HCV 粒子を超遠心で濃縮すると、アポリポ蛋白質も濃縮されることから、HCV 粒子にアポリポ蛋白質が結合していることが示唆された。

### D. 考察

アポリポ蛋白質の両親媒性  $\alpha$  ヘリックスが HCV の感染性粒子産生に関与していることが明らかとなった。両親媒性の  $\alpha$  ヘリックスとウイルス粒子の結合を特異的に阻害するような薬剤やペプチドは新規抗 HCV 剤の創薬標的と考えられる。

### E. 結論

HCV の感染粒子産生にはアポリポ蛋白質の両親媒性  $\alpha$  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) 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) Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog* 2013;(doi: 10.1371/journal.ppat.1003589)
- 3) Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, Matsuura Y, Saitoh T, Akira S. Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:12379-12384
- 4) 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
- 5) Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, Matsuura Y, Yamamoto M, Takeda K. Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA. *J Virol* 2013;87:9997-10003
- 6) 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* 2013;12:2537-2551

## 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) **Okamoto T, Taguwa S, Moriishi K, Matsuura Y. Co-chaperones involved in the replication of hepatitis C virus. Protein Homeostasis & Viral Infection: Mechanisms to Therapeutics. Bethesda, 2013**
- 3) Matsuura Y. Host factors involved in HCV propagation. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop “Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma : molecular basis and clinical links”. Marsala, 2013
- 4) Matsuura Y. Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. Infectious Diseases in Elderly Symposium. Izmir, 2013
- 5) Matsuura Y. Host factors involved in the propagation and pathogenesis of hepatitis C virus. The 3<sup>rd</sup> International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction and Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation. Tainan, 2013
- 6) 松浦善治、C型肝炎ウイルスの複製と病原性発現に關与する宿主因子の解析と創薬の可能性、第42回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー、東京、2013
- 7) Fukuhara F, 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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

## H. 知的所有権の出願・登録状況 特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

HCV感染培養系によるC型肝炎関連肝がんと代謝因子に関する研究

研究分担者 勝二郁夫 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野 准教授

研究要旨：C型肝炎ウイルス(HCV)感染培養系を用い、肝細胞内の脂肪滴の大きさを調節する宿主因子の発現変化を解析した。HCV J6/JFH1をHuh-7.5細胞に感染させるとJNKが活性化され、細胞内のユビキチンリガーゼItchがリン酸化を受け活性化された。Itchの活性化に伴いAdipophilinの蛋白質量が減少したが、TIP47の量は変化しなかった。また、脂肪滴に結合し、Itchなどのユビキチンリガーゼを脂肪滴に引き寄せる足場蛋白のSpartinの量が2本のバンドに分かれ、経時的に見ると全長が減り、低分子量のバンドが増加したため、蛋白質分解酵素により切断される可能性が考えられた。Itchの活性化、およびSpartinの切断と脂肪滴増大化への影響について、さらに解析を進めている。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は慢性肝炎、肝硬変を引き起こす。さらに代謝障害を引き起こし、肝がんの発症に深く関与する。また、肝細胞内の脂肪滴周囲の膜上でHCV複製がおこることが報告されている。しかし、HCV感染による脂肪滴形成機構は未だ不明な点が多く、その対策も確立していない。そこで、HCV感染培養系を用い、HCV感染に伴う脂肪滴増大化の分子機序を解析した。

B. 研究方法

1) HCV感染によるJNK経路とItch活性および脂肪滴結合蛋白の解析

HCV J6/JFH1をヒト肝癌細胞株Huh-7.5細胞に感染させ1-7日まで細胞を回収した。ウエスタンブロット法にてJNK, c-Jun, p-c-Jun (Ser63), Itch, p-Itch (pT222),

adipophilin, TIP47の各抗体で発現レベルを比較した。

2) HCV感染による脂肪滴形成の変化

HCV J6/JFH1をHuh-7.5細胞に感染させ、脂肪滴をBODIPYで染色した。陰性対照のmock細胞と脂肪滴形成の違いを解析した。

3) HCV感染によるSpartinのプロセッシング

HCV J6/JFH1をHuh-7.5細胞に感染させ、Spartinの泳動度の変化をウエスタンブロット法で解析した。

4) Spartin内のNS3/4Aプロテアーゼ切断モチーフの検索

Spartinのアミノ酸配列内にNS3/4Aプロテアーゼ切断モチーフが存在するか、既知のモチーフと比較検討を行った。

(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。ヒトの遺伝子解析はおこなっておらず、倫理面に抵触する研究は行っていない。

#### C. 研究結果

1. HCV J6/JFH1 感染に伴い JNK が活性化され、細胞内のユビキチンリガーゼ Itch が T222 でリン酸化され、活性化された。また、Itch の活性化に伴い Adipophilin の蛋白質量が減少したが、TIP47 の量は変化しなかった。

2. HCV 感染に伴い、BODPY で染色される脂肪滴の大きさが mock 細胞と比較して増大傾向にあった。

3. HCV J6/JFH1 を Huh-7.5 細胞に感染にさせ、経時的に観察したところ、Spartin の全長のバンドが減少し、2本のバンドに分かれ、低分子量のバンドの比が増加した。

4. Spartin 内に NS3/4A プロテアーゼの切断モチーフと類似のアミノ酸配列が存在した。

#### D. 考察

1. HCV J6/JFH1 感染に伴い JNK が活性化され、細胞内のユビキチンリガーゼ Itch が活性化されており、Itch の基質の量に影響する可能性が考えられた。実際に Adipophilin の量が減少しており、Itch 活性化による影響が示唆された。

2. Spartin は脂肪滴にユビキチンリガーゼ (WWP1, WWP2, Itch など) を引き寄せ、Adipophilin をユビキチン依存性に分解して脂肪滴の大きさを制御することが知られており、Spartin の泳動度の変化が脂肪滴

形成に影響する可能性が考えられた。

3. Spartin のプロセシングに HCV NS3/4A プロテアーゼ, NS2 プロテアーゼ, または宿主由来のプロテアーゼが関与しているか今後明らかにする必要がある。

4. Spartin 内に NS3/4A プロテアーゼの切断モチーフに類似した配列が認められ、その部位に変異を導入して Spartin のプロセシングに影響があるか解析する必要がある。また、HCV 感染による脂肪滴形成機構への影響と生理学的意義を明らかにする必要がある。

#### E. 結論

1. HCV J6/JFH1 感染に伴い JNK が活性化され、細胞内のユビキチンリガーゼ Itch が T222 でリン酸化を受け活性化された。それに伴い Adipophilin の量が減少した。

2. HCV J6/JFH1 感染に伴い Spartin の全長のバンドが減少し、2本のバンドに分かれ、経時的に低分子量のバンドの比が増加し、プロテアーゼによる切断が示唆され、脂肪滴の増大に関与する可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

35) 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*, doi: 10.1111/1348-0421.12133.
- 36) 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*, doi: 10.1111/1348-0421.12127.
- 37) Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, Shoji I., Wilcox CS, Lai EY, Han F. Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo. *Antioxidants & Redox Signaling*, DOI: 10.1089/ars.2013.5381.
- 38) Mawatari S., Uto H., Ido A., Nakashima K., Suzuki T., Kanmura S., Kumagai K., Oda K., Tabu K., Tamai T., Moriuchi A., Oketani M., Shimada Y., Sudoh M., Shoji I., and Tsubouchi H. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4., *PLoS One*, 2013; 8 (12): e82094.
- 39) Wahyuni TS., Tumewu L., Permanasari AA., Apriani E., Adianti M., Rahman A., Widyawaruyanti A., Lusida MI., Fuad A., Soetjipto, Nasronudin, Fuchino H., Kawahara N., Shoji I., Deng L., Aoki C., and Hotta H. Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus. *Virology Journal*, 2013, 10 (1): 259, 1-9.
- 40) Ichimura, T., Taoka, M., Shoji, I., Kato, H., Hatakeyama, S., Isobe, T., and Hachiya, N. 14-3-3 Proteins sequester a pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation., *Journal of Cell Science*, 2013, 126 (Pt9): 2014-26.
- 41) El-Shamy, A., Shindo, M., Shoji, I., Deng, L., Okuno, T., and Hotta, H. Polymorphisms of the Core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 2013, 58 (2): 555-63.
2. 学会発表
- 21) Chen M, Gan X, Deng L, Shoji I., Hotta H. HCV NS5A interacts with SMYD3 and upregulates SMYD3-mediated expression of AGR3 mRNA. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 22) Deng L, Chen M, Shoji I., Hotta H. HCV upregulates Bim through ROS/JNK signaling pathway leading to Bax-mediated apoptosis. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 23) Ratnoglik SL, Jiang DP, Aoki C, Sudarmono P, Deng L, Shoji I., Hotta H. Development of a prophylactic and therapeutic vaccine against Hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 24) Matsui C, Shoji I., Minami N, Sianipar I R, Deng L,

- Hotta H. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$  by hepatitis C virus NS5A protein. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 25) Hotta H, Aoki C, Ratnoglik SL, Sudarmono P, Komoto M, Deng L, Shoji I, Fuchino H, Kawahara N. Antiviral activity of chlorophyll derivatives, pheophorbide a, chlorin e6 and mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6), against hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia, October 6-10, 2013.
- 26) Shoji I. Molecular Mechanisms of HCV-induced glucose metabolism disorder. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop. Trapani, Italy, October 20-21, 2013.
- 27) 勝二郁夫, DENG Lin, 松井千絵子, 堀田博. HCV 感染による糖代謝障害の分子機序. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. シンポジウム, 神戸, 2013 年 11 月.
- 28) DENG Lin, 陳 明, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染による Bax 活性化の分子機序の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 29) Suratno Lulut Ratnoglik, 青木千恵, 河本真理, Pratiwi Sudarmono, Lin Deng, 勝二郁夫, 淵野裕之, 川原信夫, 堀田博. Chlorophyll 分解産物 Pheophorbide a、Chlorin e6 及び半合成誘導体 Mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) は C 型肝炎ウイルス増殖を阻害する. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月.
- 30) 松井千絵子, 勝二郁夫, 南奈苗, Sianipar Imelda Rosalyn, DENG Lin, 堀田博. HCV NS5A と Hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 $\alpha$  の相互作用と病態生理. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 31) 松岡陽子, 朝日朱美, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. C 型肝炎ウイルス感染による Smad1/Smad5 経路の脱制御とその分子機序について. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- 32) 竹内健司, 孫 雪東, 千原一泰, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博, 定清直. C 型肝炎ウイルス非構造蛋白質 NS5A における Fyn-SH2 ドメインとの結合に重要なチロシン残基同定の試み. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会. 神戸, 2013 年 11 月.
- H. 知的所有権の出願・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

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

胆汁酸による代謝変化に関する研究

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。今回胆汁酸代謝に代表される腸肝代謝ネットワークおよび腸管分泌ホルモンインクレチンについてそれぞれのび発癌抑制作用についてデータを得ることを目的とし高脂肪食投与マウスに対する投与比較検討を行い、UDCA は肝腫瘍マーカーである SCD mRNA の抑制ならびに膵臓において GLP1-RmRNA **発現増加をもたらす肝発癌抑制とともにインクレチン signal 増強をもたらす可能性が示唆された。**一方 DPP4inhibitor は TGR5mRNA 増加ならびに脂肪組織抗炎症作用と補完的作用をもたらす可能性が示された。

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。肝臓で精製される一次胆汁酸は Cholesterol 代謝経路の一部をなすとともに、腸肝代謝ネットワークを形成するとともに近年腸管内細菌により生成された二次胆汁酸による発癌促進も報告されている。インクレチンも腸管分泌ホルモンであるが膵臓を介しインスリンが肝臓代謝に直接作用する一方、胆汁酸が TGR5 を介し直接インクレチン分泌を促進するという報告もなされている ( Thomas.Cell Metab. 2009 TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis ) がその詳しい機序については不明である。今回 UDCA (ウルソ) DPP-4inhibitor それぞれの肝臓、膵臓、筋肉各臓器に対する代謝変化のデータを得ることによってウルソイン代表される日本が

古くから有する薬剤による新たな脂肪肝、糖尿病、肝発癌抑制標的の探索を目指す。

本年度は、腸管肝臓代謝ネットワークに着目し胆汁酸、および GLP-1 について検討を行った。

B. 研究方法

3ヶ月齢 C57/b16 オスに対し通常食及び高カロリー食、また高カロリー食に ( UDCA0.05% )、および DPP-4 阻害薬 ( 0.0015% ) 配合食を3ヶ月間投与6ヶ月齢時に sacrifice し体重、肝臓/体重比、血清脂質、AST/ALT 血糖 インスリン 肝臓膵臓脂肪細胞 膵臓について mRNA 発現変化を含め検討した。

(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

**体重 肝臓内中性脂肪量 血中インス**

リン量は 高脂肪食群で薬剤投与の有無に関係なく増加を認めるとともに薬剤間の有意差認めなかった。

一方肝臓内総コレステロール量は高脂肪食で増加を認め、DPP4-inhibitor では有意な変化認めなかったが UDCA 投与群では低下を認めたる。一方血糖値は高脂肪食投与で上昇傾向認めるが有意差認めず薬剤投認めなかった。高脂肪食で発現増加した FAS SREBP1 などの肝臓内脂質代謝関連酵素は 2 種類の薬剤投与によっても有意な低下は認めないが UDCA のみ SCDmRNA を有意に低下させた。一方 TGR5mRNA は DPP-4inhibitor

群で増加を認めた。また膵臓において GLP1-RmRNA が UDCA によって発現増加を認めた。脂肪組織においては DPP-4inhibitor が高脂肪食で増加した TNFalpha mRNA を減少させた。

#### D. 考察

UDCA は肝腫瘍マーカーである SCD mRNA の抑制ならびに膵臓において GLP1-RmRNA 発現増加をもたらす肝発癌抑制とともにインクレチン signal 増強をもたらす可能性が示唆された。一方 DPP4inhibitor は TGR5mRNA 増加ならびに脂肪組織抗炎症作用と異なるなら部位で補完的作用をもたらす可能性が示された。

#### E. 結論

ウルソは TGR5 agonist としての糖質、脂質の代謝にも関与し 腸管循環のほかに膵臓に対しインクレチン作用を増強する可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

- 1) Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, Moriya K, Tsutsumi T, Koike K, Akatsuka T. The effect of the infectious dose and the presence of HCV core gene on mouse intrahepatic CD8 T-cells. **Hepato Res.** 2013 Nov 14. doi: 10.1111/hepr.12275. PMID: 24224477
- 2) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Shinzawa S, Moriya K, Ohtomo N, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H. High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential. **Int J Cancer.** 2013 Oct 15. doi: 10.1002/ijc.28547 PMID: 24174293
- 3) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, Mizokami M, Miyakawa Y, Koike K. High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. **Clin Infect Dis.** 2013 Oct;57(7):935-42. PMID: 23704123

##### 学会発表

- 1) Moriya K. BCAA, steatosis and hepatocarcinogenesis in HCV infection. The 2013 Italy-Japan Liver Workshop Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links. Trapani, 2013.

集団生活の場における肝炎ウイルス感染予  
防ガイドラインの作成(厚生労働省作成中)

3. その他  
なし

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

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）  
C型肝炎を含む代謝関連肝がんの病態解明及び治療法の開発等に関する研究  
分担研究報告書

我が国における非B非C肝癌の背景因子の検討

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:急速に増加する非ウイルス性肝細胞癌の背景を探るために全国55の第3次医療機関において1991年～2010年までに診断された非B非C型肝細胞癌5633症例を収集した。そのうち、PBCや自己免疫性肝炎などの固有の慢性肝疾患を除き、データの欠損のない2166例を対象に16の臨床データを用いた階層別クラスタリングを行い、5つのカテゴリーに分別できた。近年の増加はカテゴリー1(高齢中等度飲酒男性)、5(非飲酒メタボリック男性)によるものであった。

A. 研究目的

近年増加傾向にある非B非C肝癌の背景には生活習慣病の影響が大きいと考えられているが、その詳細はこれまで明らかになっていない。また、飲酒や肥満を含む多数のリスク因子が関与する非B非C肝癌はウイルス性肝癌に比べて多様性が高いとも考えられる。本研究は、大規模コホートを用いて非B非C肝癌の背景因子からカテゴリー化を行うことを目的とした。

B. 研究方法

全国55の第3次医療機関において1991年～2010年までに診断された非B非C型肝細胞癌5633症例を収集した。そのうち、PBCや自己免疫性肝炎などの固有の慢性肝疾患を除き、データの欠損のない2166例を対象に16の臨床データを用いた階層別クラスタリングを行った。使用したデータは、以下のとおり:年齢、性別、飲酒量、糖尿病、高血圧、脂質代謝異常症、脂肪肝の有無、身長体重比(BMI)、アルブミン値、

総ビリルビン値、AST、ALT、GGT、ALP、プロトロンビン活性、血小板数。それぞれのデータは、正規化した上で解析に用いた。(倫理面の配慮)

本研究は、東京大学大学院医学系研究科倫理委員会で審査され、承認された(承認番号3710)。患者登録に際して氏名・生年月日等の個人情報登録されず、個々のデータは、本研究独自の登録番号を割り当てた上で管理された。

C. 研究結果

階層クラスタリングによって、対象者は、以下の5つの群に大別できた:C1 高齢男性、中等度飲酒、肝機能正常、C2 高齢男性、肥満、中等度飲酒、肝硬変、C3 比較的若年男性、大量飲酒、肝機能不良、C4 肥満男性、非飲酒、生活習慣病、C5 高齢女性、肥満、非飲酒、肝硬変。年代別の各グループの割りあいを検討したところ、C1とC5の増加が近年の非B非C肝癌の増加

に寄与している可能性が示唆された。

#### D. 考察

近年、肥満人口の増加とともに非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の肝細胞癌発癌への関与が注目されているが、成人日本人男性では、20g/日以下の飲酒者はむしろ少数派であり、飲酒と肥満のリスクを併せ持つ集団(C2)の同定が必要である。また、中等度飲酒と加齢以外に特段の危険因子を擁しない集団(C1)が同定されたため、今後これらの集団に隠れた危険因子が存在しないか精査する必要があると思われる。

#### E. 結論

階層化クラスタリングを用いることによって、従来言われている NASH やアルコール性肝硬変以外に肝機能正常高齢男性や肥満と飲酒のリスクを併せ持つ集団など新たな背景集団を抽出することができた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

42) He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of Liver Cancer Progenitors Whose Malignant Progression Depends on Autocrine Il-6 Signaling. *Cell* 2013;155(2): 384-96.

43) Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R,

Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K. The Impact of Pnpla3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology Res* 2013. [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

33) 柏木真太郎、建石良介、榎奥健一郎、藤原直人、佐藤雅哉、南達也、三神信太郎、内野康志、椎名秀一朗、吉田晴彦、小池和彦、慢性肝疾患における肝発癌への糖尿病の関与、第 49 回日本肝臓学会総会、東京、2013

34) 建石良介、岡上武、小池和彦、非 B 非 C 肝細胞癌の現況と問題点、第 49 回日本肝臓学会、東京、2013

35) 榎奥健一郎、建石良介、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、吉田晴彦、小池和彦、NAFLD/NASH の肝病理組織像と肝および全身のインスリン抵抗性、第 34 回日本肥満学会、東京、2013

36) 藤原直人、建石良介、榎奥健一郎、近藤真由子、佐藤雅哉、南達也、三神信太郎、内野康志、浅岡良成、近藤祐嗣、吉田晴彦、小池和彦、NAFLD/NASH、および NASH-HCC における酸化ストレスマーカー d-ROMs の意義、第 17 回日本肝臓学会大会、東京、2013

37) 建石良介、増崎亮太、小池和彦、病態別に見た肝予備能評価の新展開 肝発癌リスク・肝予備能評価における肝弾性度

- |  |                                 |
|--|---------------------------------|
| 測定の意義、第 17 回日本肝臓学会大会、<br>東京、2013   | なし                              |
| 38) 榎奥健一郎、 <u>建石良介</u> 、小池和彦、<br>NAFLD/NASH における高インスリン血<br>症は肝炎症と関連している、第 17 回日本<br>肝臓学会大会、東京、2013   | 2. 実用新案登録<br>なし<br>3. その他<br>なし |
| 39) 榎奥健一郎、 <u>建石良介</u> 、小池和彦、非 B<br>非 C 肝炎において肝脂肪は発癌の危険性<br>を低下させる、第 55 回日本消化器病学会<br>大会、東京、2013  |                                 |
| 40) <u>Ryosuke Tateishi</u> , Takeshi Okanoue, Naoto<br>Fujiwara, Kiwamu Okita, Kendo Kiyosawa,<br>Masao Omata, Hiromitu Kumada, Norio<br>Hayashi, and Kazuhiko Koike for the<br>INUYAMA NOBLESSE Study Group,<br>Categorization of non-B, non-C<br>hepatocellular carcinoma patients using<br>hierarchical clustering, The annual meeting<br>of American Association for the Study of the<br>Liver Diseases, Washington, USA, 2013  |                                 |
| 41) <u>Ryosuke Tateishi</u> , Takeshi Okanoue, Naoto<br>Fujiwara, Kiwamu Okita, Kendo Kiyosawa,<br>Masao Omata, Hiromitu Kumada, Norio<br>Hayashi, and Kazuhiko Koike for the<br>INUYAMA NOBLESSE Study<br>Group, Clinical characteristics, treatment and<br>prognosis of non-B non-C hepatocellular<br>carcinoma: a large retrospective multicenter<br>cohort study, The annual meeting of<br>European Association for the Study of the<br>Liver, Amsterdam, Netherland, 2013 |                                 |

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

##### 1. 特許取得



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
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]
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>Gastrointest 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>Biochem Biophys 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>Psychooncolog y</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 arteriportography 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
Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Kondo Y, Akanuma M, Yoshida H, <u>Koike K.</u>	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, <u>Koike K.</u> 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	<b>Biochem Biophys Res Commun</b>	432(1)	22-27	2013

	hypoxia-inducible factor-1.				
<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, <u>Koike K.</u>	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	2013
Ohno M, Shibata C, Kishikawa T, Yoshikawa T, Takata A, Kojima K, Akanuma M, Kang YJ, Yoshida H, Otsuka M, <u>Koike K.</u>	The flavonoid apigenin improves glucose tolerance through inhibition of microRNA maturation in miRNA103 transgenic mice.	<b>Sci Rep</b>	3	2553	2013
Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, <u>Koike K.</u> , Hayashi N, Kumada H.	Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B.	<b>Hepatol 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, Omata M, <u>Koike K.</u> , Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K.	A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region.	<b>J Hepatol</b>	58(5)	875-882	2013

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
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	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-κB activity via directly targeting Dnmt1 expression.	<b>Hepatology</b>	57	162-170	2013
Nishimura T, Yamaguchi K, Fujii H, Okada Y, Yokomizo C, Niimi T, Sumida Y, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Umemura A, Shima T, <u>Okanoue T</u> , Itoh Y	Prediction of favorable clinical course in hepatitis C virus carriers with persistently normal serum alanine aminotransferase levels: A long-term follow-up study	Hepatol Res	43	557-562	2013

Okada Y, Yamaguchi K, Nakajima T, Nishikawa T, Jo M, Mitsumoto Y, Kimura H, Nishimura T, Tochiki N, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Kagawa K, <u>Okanoue T</u> , Itoh Y	Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats	Liver Int	33	301-311	2013
Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, Saibara T, Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anza I K, Fujimoto K, <u>Okanoue T</u> , Nakajima A	Noninvasive scoring systems in patients with nonalcoholic fatty liver disease with normal alanine aminotransferase levels	J Gastroenterol	48	1051-1060	2013
Sumida Y, Naito Y, Tanaka S, Sakai K, Inada Y, Taketani H, Kanemasa K, Yasui K, Itoh Y, <u>Okanoue T</u> , Yoshikawa T	Long-term (>2 Yr) efficacy of vitamin E for non-alcoholic steatohepatitis	Hepato-Gastroenterology	60	1445-1450	2013
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, Saibara T, Sata M, Nakajima A, Itoh Y, Chayama K, <u>Okanoue T</u>	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 Gastronterol	online 26 November		2013
Kondo Y, Hasegawa G, Okada H, Senmaru T, Fukui M, Nakamura N, Sawada M, Kitawaki J, <u>Okanoue T</u> , Kishimoto Y, Amano A, Maruyama N,	<i>Leprdb/db</i> mice with senescence marker protein-30 knockout ( <i>Leprdb/db Smp30Y<sup>-/-</sup></i> ) exhibit increase in small dense -LDL severe fatty	PLoS One	8(6)	e65698	2013

Obayashi H, Ishigami A	liver despite being fed a standard diet				
Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, Yasui K, Park H, Nakamura N, Nakatou T, Tanaka N, Umemura A, Mizuno M, Tanaka J, <u>Okanoue T</u>	Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver disease with or without type 2 diabetes mellitus	J Gastroenterol	48	515-525	2013
Ue M, Ikebe N, Munekage K, Ochi T, Ono M, <u>Saibara T.</u>	Hepatocyte destruction with enhanced collagen synthesis in the liver of chronic hepatitis C patients on hemodialysis.	J Viral Hepat	20	350-357	2013
Osawa Y, Hoshi M, Yasuda I, <u>Saibara T.</u> Moriwaki H, Kozawa O.	Tumor necrosis factor- $\alpha$ promotes cholestasis-induced liver fibrosis in the mouse through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production in hepatic stellate cells.	PLoS ONE	8	e65251	2013
Yoneda M, Imajo K, Eguchi Y, Fujii H, Sumida Y, Hyogo H, Ono M, Suzuki Y, Kawaguchi T, Aoki N, Sata M, Kanemasa K, Kohgo Y, <u>Saibara T.</u> Chayama K, Itoh Y, Yoshikawa T, Anzai K, Fujimoto K, Okanoue T, Nakajima A; Japan Study Group of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.	Noninvasive scoring systems in patients with nonalcoholic fatty liver disease with normal alanine aminotransferase levels.	J Gastroenterol	48	1051-1060.	2013

<u>Saibara T</u> , Enomoto N, Kaneko S, Chayama K, Sata M, Imawari M, Onishi S, Okita K.	Clinical efficacy of combination therapy with ME3738 and pegylated interferon alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1.	Hepatol Res		doi: 10.1111/hepr .12139.	2013
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		DOI 10.1007/s00 535-013-085 2-8	
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; Japan Study Group of NAFLD	The association of insomnia with gastroesophageal reflux symptoms in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease.	J Gastroenterol.		Aug 22	2013
Hashiba M, Ono M, Hyogo H, Ikeda Y, Masuda K, Yoshioka R, Ishikawa Y, Nagata Y, Munekage K, Ochi T, Hirose A, Nozaki-Fujimura Y, Noguchi S, Okamoto N, Chayama K, Suganuma N, <u>Saibara T</u> .	Glycemic variability is an independent predictive factor for development of hepatic fibrosis in nonalcoholic Fatty liver disease.	PLoS One.	8	e76161	2013
Toda K, Hayashi Y, Yamashita A, Okabe M, Ono M, <u>Saibara T</u> .	Aromatase-null mice expressing enhanced green fluorescent protein in germ cells provide a model system to assess estrogen-dependent	Transgenic Res		Nov 22.	2013

	ovulatory responses.				
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.	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.		Nov 26.	2013
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.	The upper limit of normal serum alanine aminotransferase levels in Japanese subjects.	Hepatology Research		DOI: 10.1111/hepr.12293	2013
<u>Hashimoto E</u> , Taniai M, Tokushige K.	Characteristics and diagnosis of NAFLD/NASH.	J Gastroenterol Hepatol	28 Suppl 4	64-70	2013
TokushigeK, <u>HashimotoE</u> , Kodama K.	Hepatocarcinogenesis in non-alcoholic fatty liver disease in Japan.	J Gastroenterol Hepatol	28 Suppl 4	88-92	2013
Sato K, <u>Tanaka S</u> , Mitsunori Y, Mogushi K, Yasen M, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S.	Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography for vascular imaging of hepatocellular carcinoma; clinical and biological significance.	Hepatology	57(4)	1436-1447	2013

Muramatsu S, <u>Tanaka S</u> , Mogushi K, Adikrisna R, Aihara A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Nakayama K, Tanaka H, Yamaoka S, Arie S.	Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma enlightened in vivo significance of tumor-host interaction and clinical implication.	Hepatology	58(1)	218-228	2013
Furuta M, Kozaki KI, Tanimoto K, <u>Tanaka S</u> , Arie S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, Inazawa J.	The Tumor-suppressive mir-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma.	PLoS One	8(3)	e60155	2013
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			in press
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			in press
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			in press
Kudo A, Mogushi K, Takayama T, Matsumura S, Ban D, Irie T, Ochiai T, Tanaka H, Anzai N, Sakamoto M, <u>Tanaka S</u> , Arie S.	Mitochondrial metabolism in the Noncancerous Liver Determine the Occurrence of Hepatocellular Carcinoma: A Prospective Study.	Journal of Gastroenterology			in press

Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, <u>Ueki K</u> , Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S, Kadowaki T.	A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity.	Nature	503	493-499	2013
Moller JB, Pedersen M, Tanaka H, Ohsugi M, Overgaard RV, Lynge J, Almind K, Vasconcelos NM, Poulsen P, Keller C, <u>Ueki K</u> , Ingwersen SH, Pedersen BK, Kadowaki T	Body Composition is Main Determinant for the Difference in Type 2 Diabetes Pathophysiology between Japanese and Caucasians.	Diabetes Care		Oct 15 (Epub ahead of print)	2013
Nakaya K, Kubota N, Takamoto I, Kubota T, Katsuyama H, Sato H, Tokuyama K, Hashimoto S, Goto M, Jomori T, <u>Ueki K</u> , Kadowaki T.	Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor anagliptin ameliorates diabetes in mice with haploinsufficiency of glucokinase on a high-fat diet.	Metabolism	62	933-951	2013
<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
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
<u>Akuta N</u> , Suzuki F, Kobayashi M, Hara T, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K,	Correlation between hepatitis B virus surface antigen level and alpha-fetoprotein in	J Med Virol.	86	131-138	2014

Kumada H	patients free of hepatocellular carcinoma or severe hepatitis				
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	Hepato Res.			Epub ahead of print
Tanaka M, Suzuki F, Seko Y, Hara T, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H.	Renal dysfunction and hypophosphatemia during long-term lamivudine plus adefovir dipivoxil therapy in patients with chronic hepatitis B.	J Gastroenterol.			Epub ahead of print
Kobayashi M, Hosaka T, Suzuki F, <u>Akuta N</u> , Sezaki H, Suzuki Y, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H	Seroclearance rate of hepatitis B surface antigen in 2,112 patients with chronic hepatitis in Japan during long-term follow-up	J Gastroenterol.			Epub ahead of print
Kawamura Y, Ikeda K, Fukushima T, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Sezaki H, <u>Akuta N</u> , Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H	Potential of no-touch pincer ablation procedure for small hepatocellular carcinoma that uses a multipolar radiofrequency ablation system: an experimental animal study.	Hepato Res.			Epub ahead of print
Suzuki F, Hosaka T, Suzuki Y, <u>Akuta N</u> , Sezaki H, Hara T, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Kumada H	Long-term efficacy and emergence of multidrug resistance in patients with lamivudine-refractory chronic hepatitis B treated by combination therapy with adefovir plus	J Gastroenterol.			Epub ahead of print

	lamivudine				
Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Kawamura Y, <u>Akuta N</u> , Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T.	Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies included hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C	Hepatology.	3	964-973	2013
Hirakawa M, Ikeda K, Kobayashi M, Kawamura Y, Hosaka T, Sezaki H, <u>Akuta N</u> , Suzuki F, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Kumada H	Randomized controlled trial of a new procedure of radiofrequency ablation using an expandable needle hepatocellular carcinoma	Hepatology Res.	43	846-852	2013
Suzuki F, Suzuki Y, Sezaki H, <u>Akuta N</u> , Seko Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Mineta R, Watahiki S, Kobayashi M, Nakayasu Y, Tsuda H, Aoki K, Yamada I, Kumada H	Exploratory Study on telaprevir given every 8h at 500mg or 750mg with peginterferon-alpha-2b and rivavirin in hepatitis C patients	Hepatology Res.	43	691-701	2013
Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, <u>Akuta N</u> , Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H	Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection	Hepatology.	58	98-107	2013
<u>Akuta N</u> , Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Emergence of telaprevir-resistant variants detected by ultra-deep sequencing after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1	J Med Virol.	85	1028-1036	2013

Kawamura Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Fukushima T, Hara T, Seko Y, Hosaka T, Kobayashi M, Sezaki H, <u>Akuta N</u> , Suzuki F, Suzuki Y, Fukuzawa K, Hamada Y, Takahashi J, Kobayashi M, Kumada H	Three-dimensional magnetic resonance imaging for stringent diagnosis of advanced fibrosis associated with nonalcoholic steatohepatitis	Hepatol Int.	7	850-858	2013
Seko Y, Ikeda K, Kawamura Y, Fukushima T, Hara T, Sezaki H, Hosaka T, <u>Akuta N</u> , Suzuki F, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Kumada H	Antitumor efficacy of transcatheter arterial chemoembolization with warmed miriplatin in hepatocellular carcinoma	Hepatol Res.	43	942-949	2013
Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Seko Y, kawamura Y, Sezaki H, <u>Akuta N</u> , Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H	Clearance of hepatitis B surface antigen during long-term nucleot(s)ide analog treatment in chronic hepatitis B: results from a nine-year longitudinal study	J Gastroenterol.	48	930-941	2013
<u>Akuta N</u> , Suzuki F, Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Prediction of treatment efficacy and telaprevir-resistant variants after triple therapy in patients infected with HCV genotype 1	J Clin Microbiol.	51	2862-2868	2013
Kawamura Y, Ikeda K, Fukushima T, Seko Y, Hara T, Sezaki H, Hosaka T, <u>Akuta N</u> , Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H	What Is the most effective drug delivery system for cisplatin during the treatment of hepatic tumors with single-session transcatheter chemotherapy? A pilot study.	Gut Liver.	5	576-584	2013

Hara T, <u>Akuta N</u> , Suzuki F, Sezaki H, Susuki Y, Hosaka, Kobayashi M, Saitoh, Kumada H	A pilot study of triple therapy with telaprevir, peginterferon and ribavirin for elderly patients with genotype 1 chronic Hepatitis C.	J Med Virol.	85	1746-1753	2013
Imai N, Ikeda K, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, <u>Akuta N</u> , Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H	Transcatheter arterial chemotherapy with miriplatin for hepatocellular carcinoma patients with chronic renal failure: report of three cases.	Gut Liver.	7	246-251	2013
Oze T, Hiramatsu N, Mita E, <u>Akuta N</u> , Sakamoto N, Nagano H, Itoh Y, Kaneko S, Izumi N, Nomura H, Hayashi N, Takehara T.	A multicenter survey of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan.	Hepato Res	43	35-43	2013
Ogura S, Saitoh S, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, <u>Akuta N</u> , Kobayashi M, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Magnetic resonance laparoscopy: A new non-invasive technique for the assessment of chronic viral disease.	Hepato Res.	43	836-845	2013
<u>Akuta N</u> , Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Efficacy and anticarcinogenic activity of ribavirin combination therapy for hepatitis C virus-related compensated cirrhosis	Intervirolgy.	56	37-45	2013
Seko Y, <u>Akuta N</u> , Suzuki F, Kawamura Y, Sezaki H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Amino acid substitutions in the hepatitis C Virus core region and lipid metabolism are associated with hepatocarcinogenesis in nonresponders to	Intervirolgy.	56	13-21	2013

	interferon plus ribavirin combination therapy.				
Yamada S, Kawaguchi A, <u>Kawaguchi T</u> , Fukushima N, Kuromatsu R, Sumie S, Takata A, Nakano M, Satani M, Tonan T, Fujimoto K, Shima H, Kakuma T, Torimura T, Charlton MR, Sata M	Serum albumin level is a notable profiling factor for non-B, non-C hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma: A data-mining analysis	Hepatol Res.			in press
<u>Kawaguchi T</u> , Nagao Y, Sata M	Independent factors associated with altered plasma active ghrelin levels in HCV-infected patients	Liver Int.	33	1510-6	2013
Taniguchi E, <u>Kawaguchi T</u> , Sakata M, Itou M, Oriishi T, Sata M	Lipid profile is associated with the incidence of cognitive dysfunction in viral cirrhotic patients: A data-mining analysis	Hepatol Res.	43	418-24	2013
Sakata M, Kawahara A, <u>Kawaguchi T</u> , Akiba J, Taira T, Taniguchi E, Abe M, Koga H, Kage M, Sata M	Decreased expression of insulin and increased expression of pancreatic transcription factor PDX-1 in islets in patients with liver cirrhosis: a comparative investigation using human autopsy specimens	J Gastroenterol.	48	277-85	2013
Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, <u>Matsuura Y</u> .	Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation	J Virol	87	489-502	2013

Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, <u>Matsuura Y</u> , Wakita T, Suzuki T.	Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2	PLoS Pathog		doi:10.1371/journal.ppat.1003589	2013
Lee H, Komano J, Saitoh Y, Yamaoka S, Kozaki T, Misawa T, Takahama M, Satoh T, Takeuchi O, Yamamoto N, <u>Matsuura Y</u> , Saitoh T, Akira S.	Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus	Proc Natl Acad Sci U S A	110	12379-12384	2013
Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, <u>Matsuura Y</u> , Hayashi N, Mizokami M, Takehara T.	Human BDCA3 (+) dendritic cells are a potent producer of IFN- $\lambda$ in response to hepatitis C virus	Hepatology	57	1705-1715	2013
Kimura T, Katoh H, Kayama H, Saiga H, Okuyama M, Okamoto T, Umemoto E, <u>Matsuura Y</u> , Yamamoto M, Takeda K.	Ifit1 inhibits Japanese encephalitis virus replication through binding to 5' capped 2'-O unmethylated RNA	J Virol	87	9997-10003	2013
Tripathi LP, Kambara H, Chen YA, Nishimura Y, Moriishi K, Okamoto T, Morita E, Abe T, Mori Y, <u>Matsuura Y</u> , Mizuguchi K.	Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach	J Proteome Res	12	2537-2551	2013
Ratnoglik SL., Aoki C., Sudarmono P., Komoto M., Deng L., <u>Shoji I.</u> , 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.	Microbiol. Immunol.		doi: 10.1111/1348-0421.12133	2014

Adianti M., Aoki C., Komoto M., Deng L., <u>Shoji I.</u> , 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.	Microbiol. Immunol.		doi: 10.1111/1348-0421.12127	2014
Tao RR, Huang JY, Lu YM, Hong LJ, Wang H, Masood MA, Ye WF, Zhu DY, Huang Q, Fukunaga K, Lou YJ, <u>Shoji I.</u> , 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.	Antioxid & Redox Sign.		doi: 10.1089/ars.2013.5381	2013
Mawatari S., Uto H., Ido A., Nakashima K., Suzuki T., Kanmura S., Kumagai K., Oda K., Tabu K., Tamai T., Moriuchi A., Oketani M., Shimada Y., Sudoh M., <u>Shoji I.</u> , and Tsubouchi H.	Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation by cleaving complement component 4.	PLoS One	8	e82094, 1-7	2013
Wahyuni TS., Tumewu L., Permanasari AA., Apriani E., Adianti M., Rahman A., Widyawaruyanti A., Lusida ML., Fuad A., Soetjipto, Nasronudin, Fuchino H., Kawahara N., <u>Shoji I.</u> , Deng L., Aoki C., and Hotta H.	Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus.	Virol. J.	10	259, 1-9	2013
Ichimura T, Taoka M, <u>Shoji I.</u> , Kato H, Hatakeyama S, Isobe T, and Hachiya N.	14-3-3 Proteins sequester a pool of soluble TRIM32 ubiquitin ligase to repress autoubiquitination and cytoplasmic body formation.	J. Cell. Sci.	126	2014-2026	2013
El-Shamy A, Shindo M, <u>Shoji I.</u> , Deng L, Okuno T, and Hotta H.	Polymorphisms of the Core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma.	Hepatology	58	555-563	2013

Horiuchi Y, Takagi A, Kobayashi N, Moriya O, Nagai T, <u>Moriya K</u> , 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.	<b>Hepatol Res</b>			[Epub ahead of print]
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, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H.	High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly malignant potential.	Int J Cancer.	134	2189-98.	2014
Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, <u>Moriya K</u> , Mizokami M, Miyakawa Y, Koike K	High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B.	Clin Infect Dis.	57(7)	935-42	2013
He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, <u>Tateishi R</u> , Koike K, Karin M.	Identification of Liver Cancer Progenitors Whose Malignant Progression Depends on Autocrine Il-6 Signaling	Cell	155(2)	284-96	2013
Sato M, Kato N, <u>Tateishi R</u> , Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K.	The Impact of Pnpla3 Polymorphisms on the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection.	Hepatol Res			2014