

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月19日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390229

研究課題名（和文） ヒト肝細胞キメラマウスと超高密度アレイによる肝臓の網羅的トランスクリプトーム解析

研究課題名（英文） A comprehensive transcriptome analysis of humanized mouse liver using ultra high density cDNA micro array.

研究代表者

茶山 一彰（CHAYAMA KAZUAKI）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00211376

研究成果の概要（和文）：肝炎ウイルスの持続感染機構を解明するため、感染時に起きる変化と、IFN 応答性変化をヒト肝細胞キメラマウスで超高密度のマイクロアレイを使用して解析した。C型では IFN 応答遺伝子が誘導されていたが、ウイルスは排除されなかった。このマウスに IFN を投与すると、抗ウイルス遺伝子の一部の発現が低下していた。B型でも部分的に IFN 応答が低下していた。C型、B型とも IFN signal を阻害する因子を有するが、阻害機序が異なることが推察された。

研究成果の概要（英文）：We investigated a mechanism of continuous infection of hepatitis B and hepatitis C virus with high density microarray using human hepatocyte chimeric mice. Induction of interferon stimulated genes were partially inhibited by each of the two viruses suggesting that these viruses inhibit induction of interferon stimulated genes with different mechanisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,200,000	2,760,000	11,960,000
2010年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：肝臓病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

肝炎ウイルスは他のウイルスと異なり、持続感染することが特徴的であり、成人が感染しても容易に慢性化する。これは、ウイルスが何らかの自然免疫、獲得性免疫を排除するメカニズムを有しているからである。

2. 研究の目的

本研究者はウイルスが感染したときに肝臓で起きる変化と、その変化によってもたらされるインターフェロン応答性の変化をB型肝炎ウイルスとC型肝炎ウイルスのそれぞれに

おいて解析した。

3. 研究の方法

超高密度のマイクロアレイを使用して、肝臓が高度にヒト肝細胞によって置換されたヒト肝細胞キメラマウスにB型肝炎ウイルスとC型肝炎ウイルスを感染させ、mRNAの変動を解析した。

4. 研究成果

C型肝炎ウイルスでは、インターフェロン応答に関連する遺伝子が誘導されていることが明らかになった。しかし、この抗ウイルス

効果を発揮すると考えられる遺伝子誘導ではウイルスの排除は得られず、マウスは持続感染となった。次にこのマウスにインターフェロンを投与し、インターフェロン誘導遺伝子の発現状況を非感染マウスにインターフェロンを投与した場合と比較した。すると、抗ウイルス関連遺伝子の一部の発現が低下していることが明らかとなった。従って、C型肝炎ウイルスによってインターフェロン応答の一部が阻害されていることが明らかになった。従って、C型肝炎ウイルスは、感染することによりインターフェロン誘導抗ウイルス蛋白質経路の一部をブロックすることにより、持続感染を成立させ、さらにその後のインターフェロンの効果にも耐えうる状況を作り出していると考えられた。また、C型肝炎ウイルスの感染により、発現が低下する遺伝子を調べたところ、細胞内の代謝に関連する遺伝子の低下が認められた。このような発現の変動がC型肝炎ウイルス感染患者に認められる肝細胞の脂肪化、ひいてはインターフェロン応答反応性の低下、インスリン抵抗性などに関連しているものと考えられて。さらに、B型肝炎ウイルスについても同様の検討を行った。まず、B型肝炎ウイルスを感染させたヒト肝細胞キメラマウスの肝内の遺伝子発現状況を超高密度マイクロアレイにより解析した。B型肝炎ウイルスの感染により、細胞の分裂増殖や癌で発現していることが知られている遺伝子の発現が更新していることが明らかになった。また、B型肝炎ウイルスの感染により低下した遺伝子を解析したところ、細胞分裂やDNA修復に関連する因子の遺伝子発現が低下していることが認められた。B型肝炎ウイルスが感染したマウスにインターフェロンを投与し、非感染マウスと比較したところ、インターフェロンのシグナル伝達に関与する遺伝子の発現がB型肝炎ウイルス感染によって阻害されていることが明らかになった。以上の結果からC型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルスとも、インターフェロンシグナルを阻害する因子を有しているが、ウイルスによってその阻害機序が異なっていることが推察された。

肝炎ウイルスの持続感染機構を解明するため、感染時に起きる変化と、IFN 応答性変化をヒト肝細胞キメラマウスで超高密度のマイクロアレイを使用して解析した。C型ではIFN 応答遺伝子が誘導されていたが、ウイルスは排除されなかった。このマウスにIFNを投与すると、抗ウイルス遺伝子の一部の発現が低下していた。B型でも部分的にIFN 応答が低下していた。C型、B型ともIFN signal

を阻害する因子を有するが、阻害機序が異なることが推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 37 件)

1. Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Nelson Hayes C, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H, Chayama K. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer by Fas/FasL interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology* 2012. 査読有, in press doi: 10.1002/hep.25651.
2. Ochi H, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Uchiyama T, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. Toward the establishment of a prediction system for the personalized treatment of chronic hepatitis C. *J Infect Dis* 2012;205:204-210. 査読有 doi: 10.1093/infdis/jir726.
3. Kumada H, Toyota J, Okanoue T, Chayama K, Tsubouchi H, Hayashi N. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naive patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol* 2012;56:78-84. 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2011.07.016.
4. Chayama K, Takahashi S, Toyota J, Karino Y, Ikeda K, Ishikawa H, Watanabe H, McPhee F, Hughes E, Kumada H. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *Hepatology* 2012;55:742-748. 査読有 doi: 10.1002/hep.24724.
5. Wakita T, Suzuki T, Evans MJ, Shimotohno K, Chayama K, Matsuura Y, Hijikata M, Moriishi K, Seya T, Enomoto N, Koike K, Kato N, Kanto T, Hotta H. Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17th international meeting on hepatitis C virus and related viruses. *Gastroenterology* 2011;141:e1-5. 査読有 doi: 10.1053/j.gastro.2011.05.027.
6. Tsuge M, Takahashi S, Hiraga N, Fujimoto Y, Zhang Y, Mitsui F, Abe H,

- Kawaoka T, Imamura M, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Effects of hepatitis B virus infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice. *J Infect Dis* 2011;204:224-228. 査読有 doi: 10.1093/infdis/jir247.
7. Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, Zhang Y, Ohnishi M, Kohno T, Abe H, Miki D, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Miya F, Tsunoda T, Chayama K. Hepatitis C virus infection suppresses the interferon response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse. *PLoS One* 2011;6:e23856. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0023856.
 8. Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Chayama K, Kamatani N, Nakamura Y, Miyakawa Y, Kumada H. Influence of ITPA polymorphisms on decreases of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir. *Hepatology* 2011;53:415-421. 査読有 doi: 10.1002/hep.24058.
 9. Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology* 2011;54:425-433. 査読有 doi: 10.1002/hep.24399.
 10. Ohishi W, Fujiwara S, Cologne JB, Suzuki G, Akahoshi M, Nishi N, Tsuge M, Chayama K. Impact of radiation and hepatitis virus infection on risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011;53:1237-1245. 査読有 doi: 10.1002/hep.24207.
 11. Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tatenno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of hepatitis C virus by short term NS3-4A and NS5B inhibitor combination therapy in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol* 2011;54:872-878. 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2010.08.033.
 12. Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayashida Y, Nakano R, Imamura M, Hiraga N, Kawakami Y, Aimitsu S, Kao JH, Kubo M, Tsunoda T, Kumada H, Nakamura Y, Hayes CN, Chayama K. IL-28B predicts response to chronic hepatitis C therapy--fine-mapping and replication study in Asian populations. *J Gen Virol* 2011;92:1071-1081. 査読有 doi: 10.1099/vir.0.029124-0.
 13. Miki D, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Yoshima T, Aikata H, Ikeda K, Kumada H, Toyota J, Morizono T, Tsunoda T, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Variation in the DEPDC5 locus is associated with progression to hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus carriers. *Nat Genet* 2011;43:797-800. 査読有 doi: 10.1038/ng.876.
 14. Mbarek H, Ochi H, Urabe Y, Kumar V, Kubo M, Hosono N, Takahashi A, Kamatani Y, Miki D, Abe H, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study of chronic hepatitis B identified novel risk locus in a Japanese population. *Hum Mol Genet* 2011;20:3884-3892. 査読有 doi: 10.1093/hmg/ddr301.
 15. Kawaoka T, Hayes CN, Ohishi W, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Tsuge M, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Tsunoda T, Nakamura Y, Kumada H, Chayama K. Predictive value of the IL28B polymorphism on the effect of interferon therapy in chronic hepatitis C patients with genotypes 2a and 2b. *J Hepatol* 2011;54:408-414. 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.032.
 16. Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tatenno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wildtype clone in vivo. *Hepatology* 2011;54:781-788. 査読有 doi: 10.1002/hep.24460.
 17. Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tatenno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host interleukin-28b polymorphism on

- replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology* 2011;54:764-771. 査読有 doi: 10.1002/hep.24453.
18. Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut* 2011;60:261-267. 査読有 doi: 10.1136/gut.2010.223495.
 19. Fujimoto Y, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayes CN, Kumada H, Nakamura Y, Chayama K. A single nucleotide polymorphism in activated Cdc42 associated tyrosine kinase 1 influences the interferon therapy in hepatitis C patients. *J Hepatol* 2011;54:629-639. 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.021.
 20. Chayama K, Hayes CN, Abe H, Miki D, Ochi H, Karino Y, Toyota J, Nakamura Y, Kamatani N, Sezaki H, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H. IL28B but not ITPA polymorphism is predictive of response to pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir triple therapy in patients with genotype 1 hepatitis C. *J Infect Dis* 2011;204:84-93. 査読有 doi: 10.1093/infdis/jir210.
 21. Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol* 2011;55:11-18. 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2010.10.017.
 22. Abe H, Hayes CN, Ochi H, Maekawa T, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. IL28 variation affects expression of interferon stimulated genes and peg-interferon and ribavirin therapy. *J Hepatol* 2011;54:1094-1101. 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2010.09.019.
 23. Yokosuka O, Takaguchi K, Fujioka S, Shindo M, Chayama K, Kobashi H, Hayashi N, Sato C, Kiyosawa K, Tanikawa K, Ishikawa H, Masaki N, Seriu T, Omata M. Long-term use of entecavir in nucleoside-naive Japanese patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatol* 2010;52:791-799. 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2009.12.036.
 24. Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R, Tanaka S, Matsushita M, Mitsui F, Abe H, Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Mori N, Imamura M, Takahashi S, Hayes CN, Chayama K. HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol* 2010;91:1854-1864. 査読有 doi: 10.1099/vir.0.019224-0.
 25. Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010;407:80-90. 査読有 doi: 10.1016/j.virol.2010.07.041.
 26. Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayashida Y, Nakano R, Kubo M, Tsunoda T, Hayes CN, Kumada H, Nakamura Y, Chayama K. ITPA polymorphism affects ribavirin-induced anemia and outcomes of therapy—a genome-wide study of Japanese HCV virus patients. *Gastroenterology* 2010;139:1190-1197. 査読有 doi: 10.1053/j.gastro.2010.06.071.
 27. Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology* 2010;405:361-369. 査読有 doi: 10.1016/j.virol.2010.06.020.
 28. Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. *J Gen Virol* 2010;91:1668-1677. 査読有 doi: 10.1099/vir.0.019315-0.
 29. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K,

- Nakamura Y, Kumada H. Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology* 2010;52:421-429. 査読有 doi: 10.1002/hep.23690.
30. Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ohishi W, Arihiro K, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. *J Hepatol* 2010;53:439-443. 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2010.03.022.
31. Tsukada H, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Fujimoto Y, Tsuge M, Takahashi H, Kumada H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. A polymorphism in MAPKAPK3 affects response to interferon therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2009;136:1796-1805 e1796. 査読有 doi: 10.1053/j.gastro.2009.01.061.
32. Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Dorskali M, Igarashi Y, Tashiro H, Hiraga N, Imamura M, Sakamoto N, Asahara T, Chayama K, Ohdan H. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 2009;119:3226-3235. 査読有 doi: 10.1172/JCI38374.
33. Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tatenno C, Yoshizato K, Chayama K. G-to-A hypermutation in hepatitis B virus (HBV) and clinical course of patients with chronic HBV infection. *J Infect Dis* 2009;199:1599-1607. 査読有 doi: 10.1086/598951.
34. Nabeshima Y, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Chayama K. Deletion of angiotensin II type I receptor reduces hepatic steatosis. *J Hepatol* 2009;50:1226-1235. 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2009.01.018.
35. Matsumura T, Hu Z, Kato T, Dreux M, Zhang YY, Imamura M, Hiraga N, Juteau JM, Cosset FL, Chayama K, Vaillant A, Liang TJ. Amphipathic DNA polymers inhibit hepatitis C virus infection by blocking viral entry. *Gastroenterology* 2009;137:673-681. 査読有 doi: 10.1053/j.gastro.2009.04.048.
36. Kamatani Y, Wattanapokayakit S, Ochi H, Kawaguchi T, Takahashi A, Hosono N, Kubo M, Tsunoda T, Kamatani N, Kumada H, Puseenam A, Sura T, Daigo Y, Chayama K, Chantratita W, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association study identifies variants in the HLA-DP locus associated with chronic hepatitis B in Asians. *Nat Genet* 2009;41:591-595. 査読有 doi: 10.1038/ng.348.
37. Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tatenno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol* 2009;51:1046-1054. 査読有 doi: 10.1016/j.jhep.2009.09.002.

[学会発表] (計4件)

1. Chayama Kazuaki, Dual Oral Combination Therapy with the NS5A Inhibitor BMS-790052 and the NS3 Protease Inhibitor BMS-650032 Achieved 90% Sustained Virologic Response (SVR12) in HCV Genotype 1b-Infected Null Responders, The 62nd Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 7 Nov.2011, San Francisco U.S.A.

[その他]

ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/naikal/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茶山 一彰 (CHAYAMA KAZUAKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00211376