

課題番号 : 26指109

研究課題名 : C型肝炎ウイルス排除後の肝発がんに関与する血中エピゲノムマーカーの探索と臨床的有用性の検証-探索研究と全国肝疾患診療拠点病院共同前向き研究

主任研究者名 : 考藤 達哉

分担研究者名 : なし

キーワード : HCV, SVR, 肝がん, ゲノム, エピゲノム

研究成果 :

### 【目的】

C型慢性肝炎に対する治療の進歩は目覚ましく、直接作用型抗ウイルス薬（Direct anti-viral agent, DAA）のみの治療では、90%以上のHCV排除（Sustained virological response, SVR）が報告されている。しかし、世界的にC型肝炎患者の高齢化は進み、SVR後にも肝がんが発症する例が増加している。SVR達成10年後の発がんは、65歳以上では11%と報告されている。SVR後発がんに関与する因子として、高齢、肝脂肪化などが報告されているが詳細は明らかではない。HCV感染によって肝細胞の遺伝子にはDNAメチル化などのエピジェネティック修飾が蓄積されることが報告されており、発がんへの関与が示唆されている。

肝がんは血流の豊富な腫瘍であり、その発生、進展に血管新生が重要な役割を果たしている。申請者は、ANG-2の受容体であるTIE-2を発現する単球（TIE2-expressing monocytes, TEM）が肝がん患者の肝組織中で増加しており、肝がんにおける血管新生に関与することを明らかにしている（Matsubara T, Kanto T, et al. Hepatology 2013）。SVR後発がんにも血管新生の亢進が関与している可能性がある。

本研究では、まず遺伝子のエピゲノム修飾や血管新生などに焦点を当て、SVR後肝がんの病態の解明と、発がんリスクに関連する遺伝子マーカーの探索を行う。次に全国肝炎拠点病院での治療例を対象として、前向きに遺伝子マーカーの有用性の検証を行う。そして発がんリスク評価を基にしたSVR後患者の効果的・効率的な継続診療基準の確立を目指す。

### 【当初研究計画】

#### SVR後肝発がん関連因子の探索研究

当センター病院、国府台病院、都立駒込病院にて、肝がん切除治療を受ける患者（SVR後発がん例、Non-SVR後発がん例、自然発がん例）の肝がん組織からがん細胞、浸潤リンパ球を別々に採取し、異常メチル化遺伝子のプロファイルをパイロシークエンス法やMCAM法で、miRNAプロファイルをRNA-seq法にて網羅的に解析する。がん部と非癌部、浸潤リンパ球とPBMCとで比較し差異を検出する。候補遺伝子の周辺のゲノム情報から癌抑制遺伝子、血管新生因子などを抽出、またmiRNAの標的候補遺伝子を検索する。臨床検体における各遺伝子のメチル化や発現強度をBisulfite PCRや定量PCRで確認する。血清中のDNA、exosome中のmiRNAから、候補遺伝子やそのメチル化を検出する系を確立する。その検出系の再現性を肝炎拠点病院における保存血清を用いて検証する。

#### SVR後肝発がん遺伝子マーカーの多施設前向き検証研究

各拠点病院から提供されたSVR後の発がん例、非発がん例、抗HCV治療なしの自然経過発がん例などの検体を用いて検討する。また、肝疾患拠点病院において抗HCV治療を受ける患者を対象として、候補マーカーの発がん予測への有用性を前向きに検証する。SVR後の肝発がん率は高齢者では5年後に6%であり、長期間の継続観察が必要である。IFN併用治療とDAAのみの治療とでSVR後の肝発がん率を比較することで、今後のIFN併用治療の意義に関しても評価する。

### 【本研究で得られた成果】

肝がん患者における癌部、肝硬変部の線維芽細胞のランドマーク遺伝子同定と機能解析

SVR 後肝がんの生物学的特性を明らかにするために、非 SVR 例での肝がんの切除標本を材料として、癌部、非癌部から線維芽細胞を分離した。C 型肝炎、B 型肝炎、非 B 非 C 型肝炎患者の肝癌部、肝硬変部、正常肝部それぞれから線維芽細胞培養系が樹立された。各線維芽細胞の培養上清を用いてヒト単球からマクロファージへの分化能、マトリゲルを用いた肝癌細胞の浸潤能を評価した。肝硬変部、肝癌部からの線維芽細胞培養上清には IL-6, IL-8, CCL2 が高濃度であった。肝硬変部、肝癌部線維芽細胞上清は、単球を遊走させ、M2 型マクロファージを誘導し、肝癌細胞株の浸潤能を亢進させた。これより、肝癌における線維芽細胞はサイトカイン、ケモカインなどの産生を介して免疫細胞の遊走、マクロファージへの分化、肝癌の悪性化に関与していることが明らかになった。また肝がん線維芽細胞(CAF)は、非がん部線維芽細胞(NF)に比べて細胞老化(Senescence)が進行していた。各線維芽細胞の遺伝子発現を網羅的に比較し、肝硬変部、癌部で特異的に発現上昇している遺伝子(Gene-X)を同定した。線維芽細胞への遺伝子 Gene-X の強制発現、siRNA による遺伝子発現抑制により、遺伝子 Gene-X と上記の機能や Senescence との関連性を確認した。肝がん CAF における Gene-X の発現増加は、背景肝疾患の病因(B 型、C 型肝炎、非アルコール性脂肪肝炎など)に関わらず認められた。また肝がん非合併患者の肝硬変部から分離樹立した線維芽細胞(LCNF)では、Gene-X の発現は肝がん CAF と同等であり、CCL2 産生も同等であった。Gene-X は肝がん CAF の形質・機能形成に関与する遺伝子の可能性がある。また LCNF の形質は既に CAF に近似しており、Gene-X は NF から LC、CAF へ分化するドライバーとして機能する遺伝子候補と考えられた。現在、Gene-X の発現制御に関与するエピゲノム修飾(網羅的メチル化解析)、転写調節に関与する miRNA の同定(Nanostring による網羅的解析)を進めており、重要なシグナル伝達経路と複数の候補 miRNA を絞り込んでいる(図1)。

#### 肝がん関連血管新生細胞の誘導因子の探索と発がん・再発・予後マーカーとしての有用性の検討

肝癌患者の血液中では TIE2 陽性単球(TEM)が増加しており、TEM の頻度は肝臓での血管新生の程度と正相関することを明らかにしている。肝癌が産生する何らかの因子が TEM の誘導に関与すると仮定し、肝がん患者血清中のサイトカイン、ケモカインを Multiplex 法を用いて網羅的に解析した。その結果、TEM 高値群と低値群で比較すると、HGF、Osteopontin、M-CSF、Foliatin が TEM 高値群で有意に増加していた。これらの4因子を用いて、in vitro でのマクロファージ分化能を比較すると、M-CSF が単球からマクロファージへの分化を促進し、TIE2 発現が増加した。したがって、肝癌由来の M-CSF が TEM 誘導に関与することが示唆された。SVR 後、非 SVR 後肝がん患者に対して分子標的治療薬(Sorafenib)治療を行った症例を対象とし、治療前、治療後の経過における TEM 頻度を解析し(Pre, T1m)、治療効果、予後との関連性を検討した。治療後 TEM 低値群(T1m-Low)は、TEM 高値群に比較して治療開始後 1 ヶ月の時点での抗腫瘍効果が良好であり(△TEM)、生命予後も良好であった。TEM は肝がんの発症・再発・予後に関与する Biomarker として有用であることが示唆された(図2)。現在 M-CSF 以外の TEM 誘導因子を網羅的に探索し、新たな候補分子を同定している。

#### 肝発がんリスク評価のための非侵襲的肝線維化バイオマーカーの探索

SVR 後肝がんの臨床背景の検討から、発がんのリスク因子として、年齢、男性、抗 HCV 治療前の線維化進展度、糖尿病や脂肪肝の合併が抽出されている。HCV 排除後の発がんリスクを評価し、適切なフォローアップ体制を構築するためには、非侵襲的に繰り返し測定できる肝線維化マーカーが必要である。HCV 排除後肝疾患のモデルとして非アルコール性脂肪肝炎(NAFLD/NASH)を対象とし、血清サイトカイン、ケモカイン Multiplex 法を用いて網羅的に検討した。その結果、マクロファージ分化因子である IL-34 と YKL-40 が抽出され、これらは肝線維化進展度と相関し、既存の肝線維化マーカー(FIB-4, NAS 等)と相関した。また、重回帰分析により Type-IV collagen 7S と組み合わせた判別式は、高い肝線維化判別能を示した(肝硬変判別能 ROC IL-34 0.94, YKL-40 0.88)。また YKL-40 は NAFLD/NASH による肝がん患者では、非肝がん患者より有意に高値であり、肝がんマーカーとしても有用であった。IL-34、YKL-40 の肝臓における産生細胞は、線維芽細胞(IL-34)、マクロファージ(YKL-40)であった。IL-34、YKL-40 は SVR 後の肝がんリスク評価(線維化評価)に応用可能なバイオマーカーである(図 3、図 4)。

### 【今後の展望】

本研究により、肝がん CAF の Senescence 誘導や機能発現に重要な遺伝子 Gene-X を同定した。また、肝がんの進展過程で重要な血管新生に関与する単球・マクロファージ系免疫細胞 TEM は、Sorafenib 治療の抗腫瘍効果を反映しており、生命予後予測に有用であることを明らかにした。SVR 後肝がんのリスク群の囲い込みには、肝線維化の評価が重要であり、マクロファージ分化と活性化に関与する IL-34、YKL-40 が NAFLD における肝線維化及び肝がんのバイオマーカーとして有用であることを明らかにした。

今後は、SVR 後肝がんのリスクに関与する遺伝子マーカーを同定し、ハイスループットで検出可能な測定系を構築する。全国肝疾患診療連携拠点病院を含む共同研究施設での治療例、フォローアップ例を対象として、遺伝子マーカーのリスク評価における有用性の検証を行う。発がんリスク評価を基にした SVR 後患者の効果的・効率的なフォローアップ方法の確立を目指す。

Subject No. : 26-shi-109

Title : Investigation of epigenomic biomarkers of liver cancer in patients who cleared chronic HCV infection – an exploratory and validation study with regional core centers for liver disease in Japan.

Researchers : None

Key word : HCV, SVR, liver cancer, genome, epigenome

Abstract :

### **【Backgrounds/Aim】**

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third leading cause of cancer-related deaths in the world. Hepatitis viruses, such as HBV and HCV, have been considered the main causes of liver cancer. Because the development of anti-viral treatment against HCV has been dramatically successful, HCV eradication can be attained in more than 95% of patients who undergo treatment with novel direct anti-viral agents (DAAs). If such DAAs become more accessible to patients, the disease burden of chronic HCV infection and HCV-induced HCC should decline in the near future. However, the proportions of HCC caused by non-viral etiologies, including alcoholism, steatohepatitis or diabetes, has been increasing worldwide. In HCV infection, the annual incidence of HCC increases according to the progression of liver fibrosis, which occurs in approximately 3-5% of cirrhotic patients. Even in patients who have been cleared of HCV, the risk of liver cancer continues to be high in those with moderate/advanced liver fibrosis or with metabolic disorders, such as steatosis or diabetics. Why HCC frequently occurs, regardless of etiology, in the fibrotic or cirrhotic liver remains largely unknown.

HCC is mostly hyper-vascular nature, the pathogenesis of which is determined by angiogenesis. We reported previously that monocytes that express TIE-2, or a receptor of ANG-2, are increased in the liver of HCC patients. We showed that such TIE-2-expressing monocytes (TEMs) are correlated with the degree of angiogenesis in the liver and could serve as a biomarker of HCC (Matsubara T, Kanto T, et al. Hepatology 2013). It is possible that angiogenesis may be involved in the occurrence of HCC even in the liver of HCV clearance.

In this research project, we firstly sought to explore the mechanisms of HCC development in SVR patients, by focusing on epigenomic gene modification or angiogenesis. Next, we intended to estimate the feasibility of potential biomarkers for the detection of fibrosis or HCC in such patients, potentially in future collaboration with regional core centers for liver disease in Japan.

### **【Results】**

#### **Identification of genes regulating cancer-associated fibroblasts in the liver.**

Liver fibrosis is a continuous phenomenon accompanied by inflammation and tissue remodeling. Hepatic stellate cells (HSCs) play essential roles in the process of fibrogenesis; they turn to be activated myofibroblasts on exposure to various stimuli. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are regarded as activated fibroblasts localized intra-tumor or in tumor-surrounding niches. CAFs exert supportive roles in the development and dissemination of cancer by producing cytokines or growth factors or by interacting with other cells in the stroma. The high incidence of HCC in

Researchers には、分担研究者を記載する。

advanced fibrosis patients implies that fibroblasts have a promoting effect on HCC development. We aimed to explore the key regulators of phenotypes and function of CAFs in the liver.

We enrolled 14 patients who underwent HCC resection and two who had liver transplants. We established primary fibroblasts recovered from HCC (CAFs) and/or non-cancerous liver tissues (NFs). We compared phenotypes, capacity of cytokine/chemokine production and gene expression profiles between CAFs and NFs from the same donors. The functional relevance of focused genes in fibroblasts was confirmed by gene transfer, addition of recombinant protein or shRNA-knockdown. The CAFs exhibited  $\alpha$ SMA-positive and were more senescent with lesser proliferative capacity than the NFs. The CAFs produced larger amounts of IL-6, IL-8 and CCL2 than the NFs, which led to invasiveness of HuH7, mobilized monocytes and polarized M2 macrophages. We found that *Gene-X* and senescence-related genes are up-regulated in CAFs compared to NFs. The CAF phenotype, senescence and function were gained by *Gene-X* over-expression or recombinant *Gene-X* given to fibroblasts, all of which decreased with *Gene-X* knockdown. In liver tissues obtained from the patients, *Gene-X*-positive cells are mainly observed in encapsulated lesions of HCC. **Conclusion:** *Gene-X* is one of the regulatory genes of CAFs in the liver, affects cellular senescence and plays a supportive role in the development of liver cancer (Figure 1). Exploration of epigenomic modification mechanisms of Gene-X is underway.

#### **Exploration of angiogenesis-related factors and its validation as a biomarker of recurrence or prognosis of HCC patients.**

TIE-2-expressing monocytes and macrophages (TEMs) have been recently described as a subpopulation of peripheral or tumor-infiltrating myeloid cells with pro-angiogenic activity. We have reported that TEMs increase in patients with HCC, and that the level of TEMs in the blood or tumors is positively correlated with the degree of angiogenesis. TEMs dramatically decrease after successful HCC ablation or resection, but increase with HCC recurrence. These data suggest that TEMs accelerate tumor angiogenesis and thus may serve as a diagnostic biomarker of HCC. We found that the levels of HGF, Osteopontin, M-CSF and Folistatin were higher in patients with the TEM<sub>high</sub> group compared to those with the TEM<sub>low</sub>. In vitro, addition of M-CSF to monocytes, but not others, enhanced the expression of TIE-2, suggesting that M-CSF is one of inducing factors of TEMs. We next tried to clarify the possibility of using TEMs to predict the effect of sorafenib-treated patients with advanced HCC.

Sorafenib, a multi-kinase inhibitor, inhibits tumor angiogenesis and is the first-line systemic therapy for patients with advanced HCC. However, due to its limited effects and frequent occurrence of side effects, biomarkers are needed to predict the effects of sorafenib. We analyzed 25 advanced HCC patients and prospectively evaluated TEMs before (Pre TEMs) and at 1 month after initial therapy (T1m TEMs). The radiologic response was evaluated by modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (mRECIST). Median survival time (MST) was significantly longer in the partial response / stable disease (PR / SD) group (21.8 months) than in the PD group (8.7 months).  $\Delta$ TEMs (changes of T1m TEMs compared to Pre TEMs) were significantly lower in the PR / SD group than in the PD group. MST of the  $\Delta$ TEMs low group (14.2 months) was

significantly longer than that of the high group (8.7 months). Univariate and multivariate Cox regression analyses showed that  $\Delta$ TEMs (hazard ratio [HR] = 8.53, 95% confidence interval [CI] = 1.51 – 48.16, P = 0.015) and Child-Pugh class (HR = 5.59, 95% CI = 1.06 – 29.63, P = 0.043) were independently associated with overall survival. **Conclusion:** Our results suggest that  $\Delta$ TEMs could serve as a biomarker for predicting radiologic response and overall survival in sorafenib-treated patients with advanced HCC (**Figure 2**).

### **Development of non-invasive biomarkers for liver fibrosis and liver cancer.**

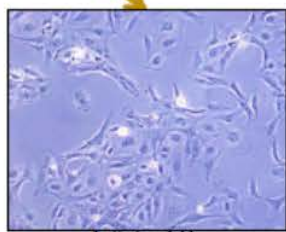
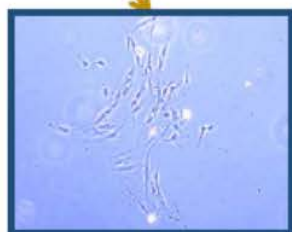
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most common causes of chronic liver disease, with a 15-30% prevalence rate worldwide. NAFLD is a progressive liver disease, evolving from simple steatosis, non-alcoholic steatohepatitis (NASH), liver cirrhosis to HCC. The degree of fibrosis is one of the critical features that indicates the prognosis of patients with NAFLD, and thus evaluating the fibrosis stage is crucial for the management of patients with NAFLD. Furthermore, steatosis is one of the risk factors for the development of HCC in patients with SVR. To this end, several clinical biomarkers, non-invasive indices, and ultrasound-based imaging techniques have been developed.

Activation of macrophages and hepatic stellate cells is a critical step that promotes liver fibrosis. We explored the feasibility of interleukin-34 (IL-34), a key regulator of macrophages, as a fibrosis marker in patients with NAFLD. We enrolled 197 biopsy-proven NAFLD patients. We evaluated the serum levels of IL-34, M-CSF, soluble CD163 (sCD163), 40 cytokines, hyaluronic acid, type IV collagen 7s, and clinically-approved fibrosis scores. IL-34 increased with the progression of fibrosis and was an independent marker for liver fibrosis. Immunostaining experiments revealed that IL-34 was mainly expressed on liver fibroblasts. IL-34 based fibrosis score ( $0.0387 \times \text{IL-34 (pg/ml)} + 0.3623 \times \text{type IV collagen 7s (ng/ml)} + 0.0184 \times \text{age (year)} - 1.1850$ ) was a practical predictive model of liver fibrosis. Using ROC analyses, the AUC, sensitivity, and specificity of IL-34 based fibrosis score were superior or comparable to the other fibrosis biomarkers and scores. **Conclusion:** The IL-34 based fibrosis score, including serum IL-34, type IV collagen 7s and age, is a feasible diagnostic marker of liver fibrosis in NAFLD patients (**Figure 3**).

YKL-40, chitinase-like protein expressed in multiple tissues including liver, is involved in cell proliferation, inflammation and remodeling of the extracellular matrix. Serum YKL-40 levels were quantified in 111 NAFLD patients and 23 HCC patients with NAFLD. Serum YKL-40 levels in NAFLD patients increased in accordance with the progression of liver fibrosis. Multivariate analysis revealed that YKL-40 was one of the independent factors significantly associated with severe fibrosis (F3-4). We established a new predictive model for fibrosis of NAFLD, using logistic regression analysis:  $\text{YKL-40 based fibrosis score} = -0.0545 + \text{type IV collagen 7s} \times 0.3456 + \text{YKL-40} \times 0.0024$ . Serum YKL-40 levels of HCC patients with non-cirrhotic NAFLD were significantly higher than those without HCC. Immunofluorescence staining showed that YKL-40 was expressed by macrophages in liver tissue of NAFLD patients. **Conclusion:** Macrophage-derived YKL-40 is a feasible biomarker of liver fibrosis in NAFLD patients (**Figure 4**).

# Gene-X - 肝がん関連線維芽細胞の機能関連遺伝子

同一患者から肝部位別に線維芽細胞を単離



非がん部  
(NF/LCF)

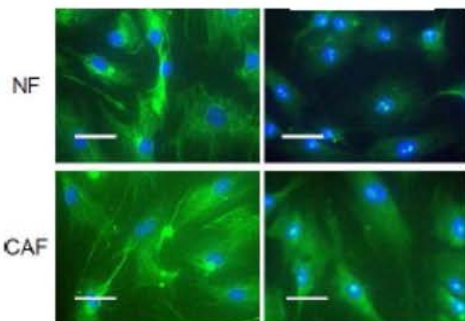
がん部  
(CAF)

継代培養→機能解析と遺伝子発現解析

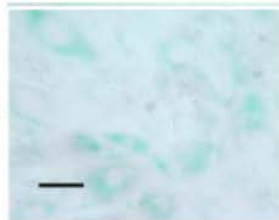
免疫蛍光染色 (線維芽細胞)

Vimentin

α-SMA

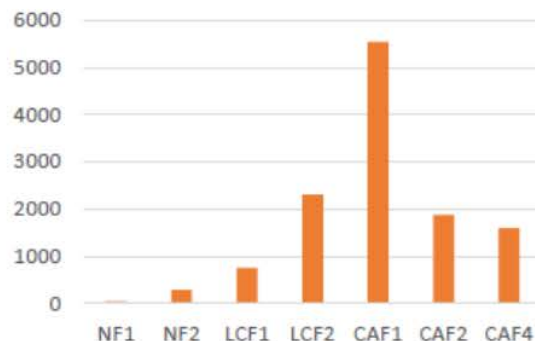


Senescence



SA-β-gal

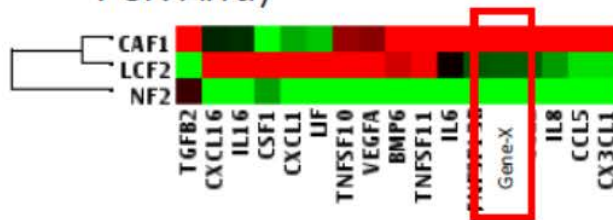
IL-6



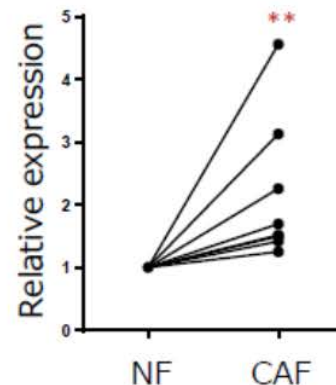
HCC 浸潤能



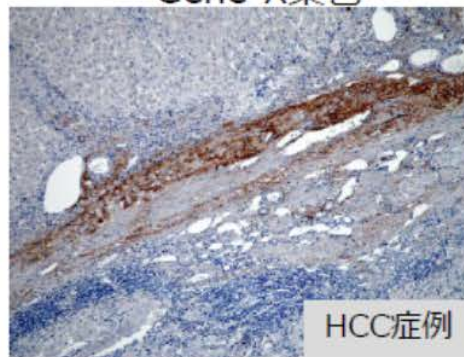
PCR Array



Gene-X mRNA発現



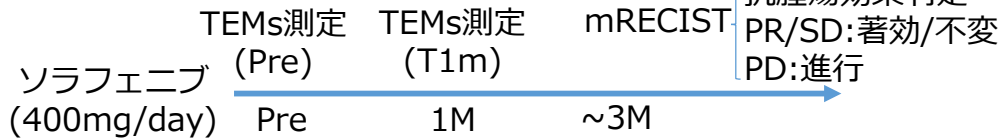
Gene-X染色



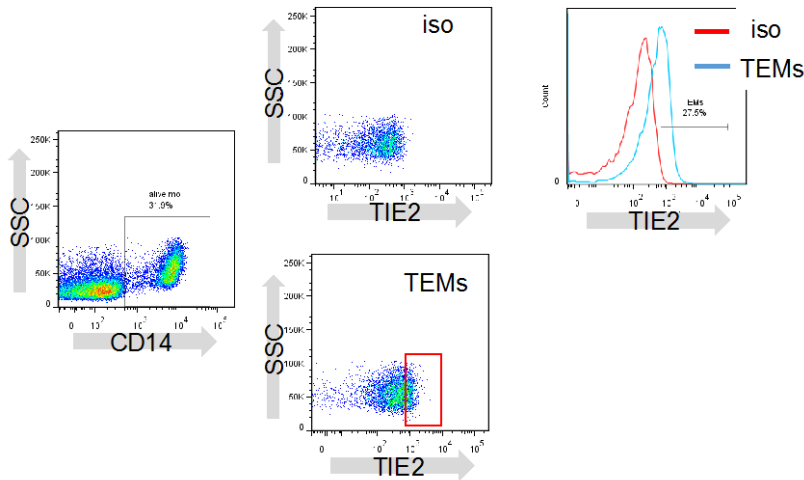
CAF: がん関連線維芽細胞  
NF: 非がん部線維芽細胞  
LCF: 肝硬変部線維芽細胞

# 血管新生前駆細胞(TEM)の肝がん治療における意義の解明

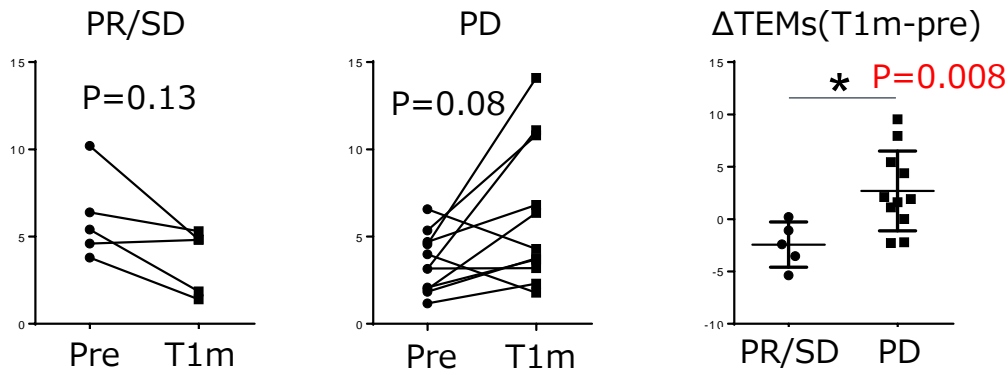
進行肝がん患者対象 (42例)



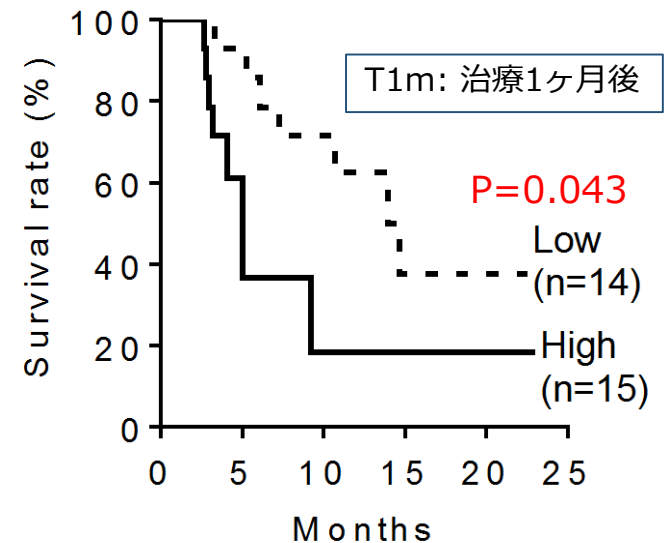
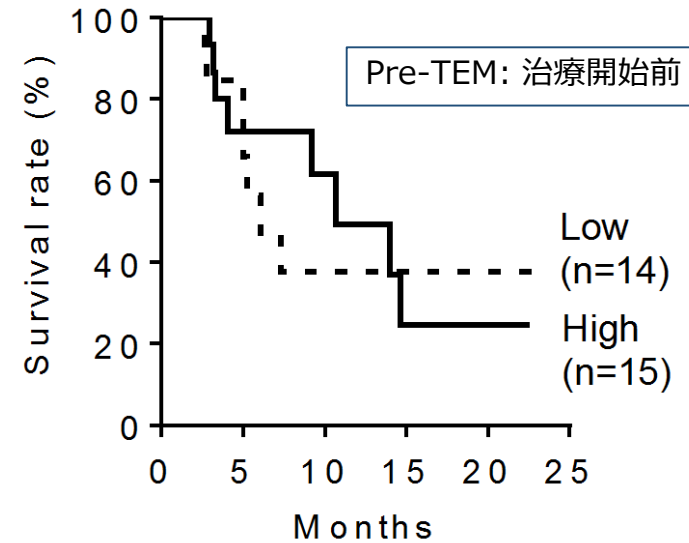
Tie2発現単球/マクロファージ (TEM)の同定



TEMと抗腫瘍効果の関連



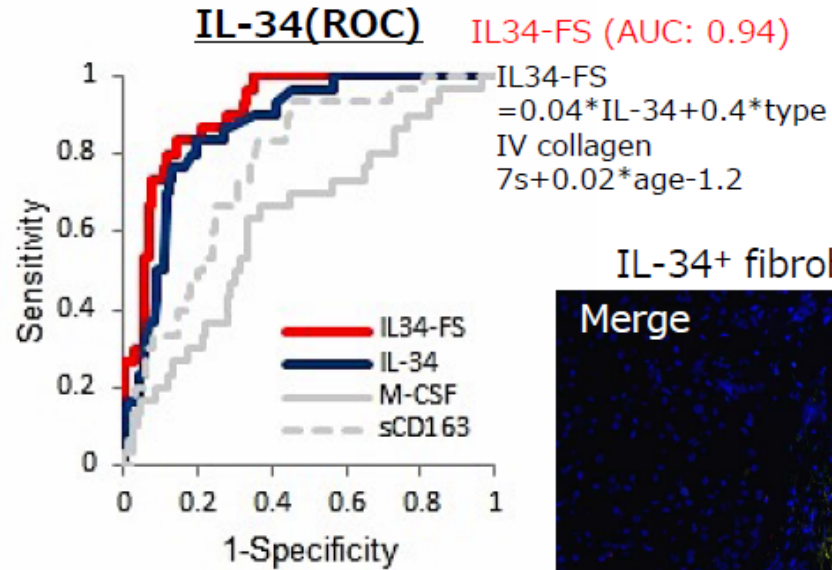
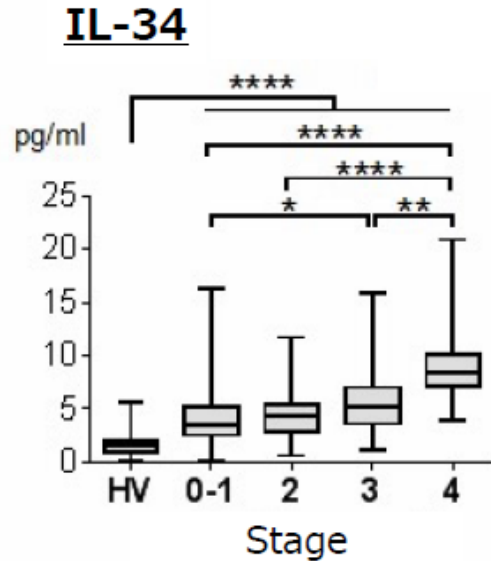
TEMと生存率の関連



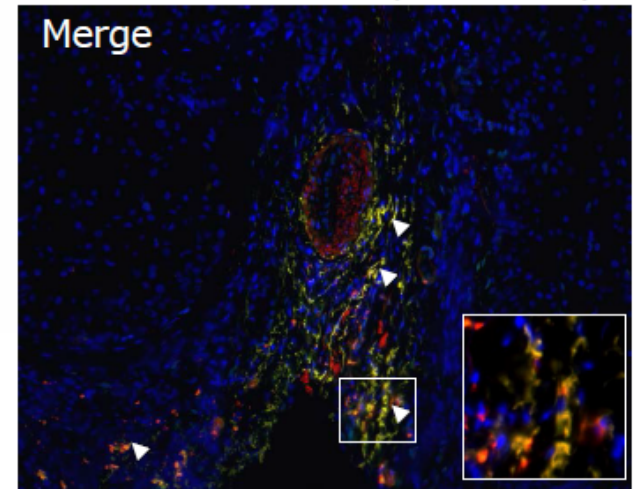


# NAFLD/NASHの新規線維化マーカー - Fibroblast由来のIL-34 -

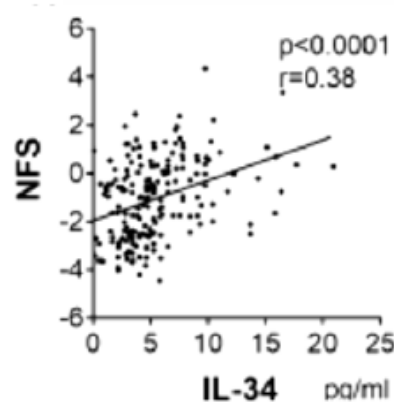
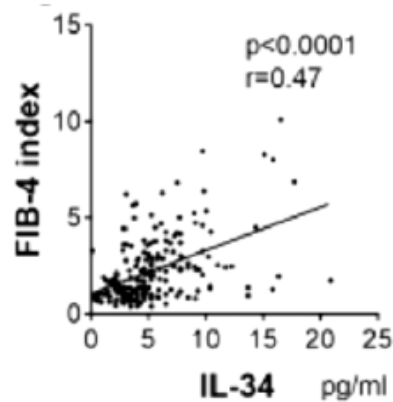
対象：肝生検で診断したNAFLD, NAFLD 197例



IL-34+ fibroblast (NAFLD F3)



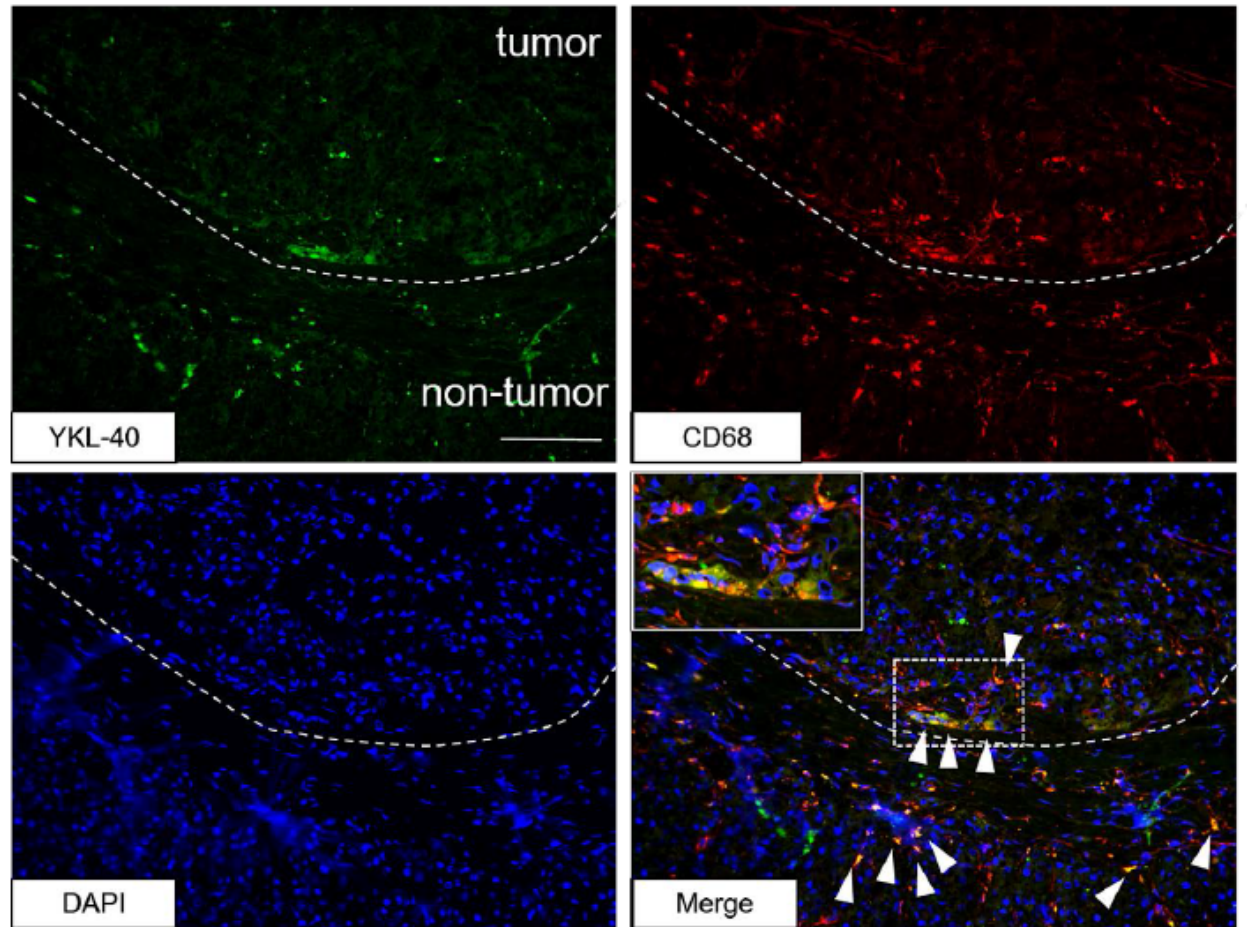
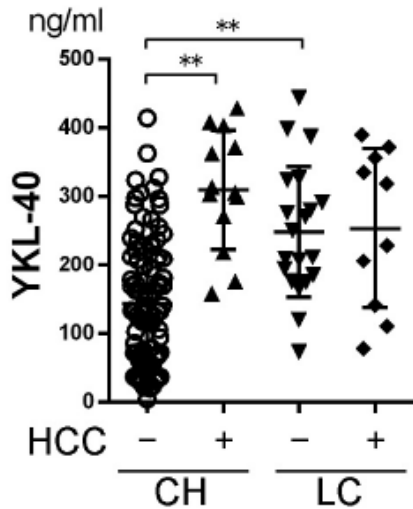
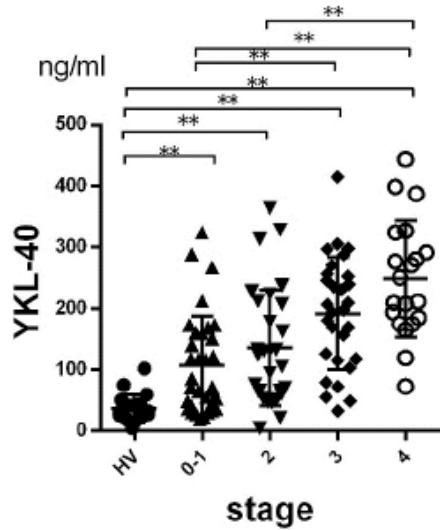
Blue: DAPI  
Red:  $\alpha$ -SMA  
Green: IL-34



日本医大, 広島大, 久留米大, 愛媛大,  
愛知医大他との共同研究

# NAFLD/NASHの新規線維化・肝がんマーカー - マクロファージ由来のYKL-40 -

対象：肝生検で診断したNAFLD, NAFLD+HCC 134例



広島大, 久留米大, 愛知医大,  
愛媛大他との共同研究

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指109

研究課題名：C型肝炎ウイルス排除後の肝発がんに関与する血中エピゲノムマーカーの探索と臨床的有用性の検証-

探索研究と全国肝疾患診療拠点病院共同前向き研究

主任研究者名：考藤達哉

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Pro-angiogenic TIE-2-expressing monocytes/TEMs as a biomarker of the effect of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma.	Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Doi H, Sugiyama M, Osawa Y, Kimura K, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aoki Y, Fukai M, Taketomi A, Mizokami M, Kanto T.	Int J Cancer	May 27. doi: 10.1002/ijc.30804. [Epub ahead of print]	2017
Serum YKL-40 as a marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.	Kumagai E, Mano Y, Yoshio S, Shoji H, Sugiyama M, Korenaga M, Ishida T, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Kawaguchi T, Torimura T, Nozaki Y, Watanabe S, Mizokami M, Kanto T*.	Sci Rep.	Oct 14;6: 35282. doi: 10.1038/srep35282.	2016
Long noncoding RNA #32 contributes to antiviral responses by controlling interferon-stimulated gene expression.	Nishitsuji H, Ujino S, Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M, Kanto T, Shimotohno K.	Proc Natl Acad Sci U S A.	Sep 13;113(37):10388-93.	2016
Pretreatment serum levels of interferon-gamma-inducible protein-10 are associated with virologic response to telaprevir-based therapy.	Yamagiwa Y, Asano M, Kawasaki Y, Korenaga M, Murata K, Kanto T, Mizokami M, Masaki N.	Cytokine.	Dec; 88:29-36.	2016
Dual blockade of hepatitis C virus entry at a gatekeeper of hepatocytes: Not only a preventive, but also therapeutic target of claudin 1.	Sugiyama M, Kanto T*.	Hepatology	Sep;64(3): 979-82.	2016

研究発表及び特許取得報告について

<p>Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.</p>	<p>Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Kumagai E, Sugiyama M, Korenaga M, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aikata H, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Nozaki Y, Kawaguchi T, Torimura T, Abe M, Hiasa Y, Kamiyama T, Fukai M, Taketomi A, Mizokami M, Kanto T*.</p>	<p>Sci Rep</p>	<p>Jul 1;6:28814. doi: 10.1038/srep28814.</p>	<p>2016</p>
<p>Host-virus interactions in hepatitis B and hepatitis C infection.</p>	<p>Yoshio, S., and Kanto, T*.</p>	<p>J Gastroenterol</p>	<p>51(5):409-20</p>	<p>2016</p>
<p>Indoleamine-2, 3-dioxygenase as an effector and an indicator of protective immune responses in patients with acute hepatitis B.</p>	<p>Yoshio S, Sugiyama M, Shoji H, Mano Y, Mita E, Okamoto T, Matsuura Y, Okuno A, Takikawa O, Mizokami M, Kanto T*.</p>	<p>Hepatology</p>	<p>63, 83-94</p>	<p>2016</p>
<p>The impact of PNPLA3 and JAZF1 on hepatocellular carcinoma in non-viral hepatitis patients with type 2 diabetes mellitus.</p>	<p>Ueyama M, Nishida N, Korenaga M, Korenaga K, Kumagai E, Yanai H, Adachi H, Katsuyama H, Moriyama S, Hamasaki H, Sako A, Sugiyama M, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Kawaguchi T, Torimura T, Hyogo H, Aikata H, Ito K, Sumida Y, Kanazawa A, Watada H, Okamoto K, Honda K, Kon K, Kanto T, Mizokami M, Watanabe S.</p>	<p>J. Gastroenterol</p>	<p>51, 370-379</p>	<p>2016</p>

研究発表及び特許取得報告について

<p>Appropriate Use of Virtual Touch Quantification and FibroScan® M and XL Probes According to the Skin Capsular Distance.</p>	<p>Kumagai E, Korenaga K, Korenaga K, Imamura M, Ueyama M, Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Kanto T, Mizokami M, Watanabe S.</p>	<p>J Gastroenterol</p>	<p>51, 496-505</p>	<p>2016</p>
<p>Hepatocyte Factor JMJD5 Regulates Hepatitis B Virus Replication through Interaction with HBx.</p>	<p>11. Kouwaki, T., Okamoto, T., Ito, A., Sugiyama, Y., Yamashita, K., Suzuki, T., Kusakabe, S., Hirano, J., Fukuhara, T., Yamashita, A., Saito, K., Okuzaki, D., Watashi, K., Sugiyama, M., Yoshio, S., Standley, D. M., Kanto, T., Mizokami, M., Moriishi, K., and Matsuura, Y.</p>	<p>J Virol</p>	<p>90, 3530-3542</p>	<p>2016</p>
<p>Association of serum IFN-lambda3 with inflammatory and fibrosis markers in patients with chronic hepatitis C virus infection.</p>	<p>Aoki Y, Sugiyama M, Murata K, Yoshio S, Kurosaki M, Hashimoto S, Yatsuhashi H, Nomura H, Kang JH, Takeda T, Naito S, Kimura T, Yamagiwa Y, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, Izumi N, Kage M, Mizokami M, Kanto T*.</p>	<p>J Gastroenterol,</p>	<p>50,(8), 894-902</p>	<p>2015</p>
<p>Regional disparities in interferon therapy for chronic hepatitis C in Japan: a nationwide retrospective cohort study.</p>	<p>Masaki N, Yamagiwa Y, Shimbo T, Murata K, Korenaga M, Kanto T, Mizokami M; prefectural members contributing to the Japanese Interferon Database.</p>	<p>BMC Public Health.</p>	<p>Jun 19;15: 566. doi: 10.1186/s12889-015-1891-2</p>	<p>2015</p>

研究発表及び特許取得報告について

<p>Ex vivo induction of IFN-lambda3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients.</p>	<p>Murata, K., Sugiyama, M., Kimura, T., Yoshio, S., Kanto, T., Kirikae, I., Saito, H., Aoki, Y., Hiramine, S., Matsui, T., Ito, K., Korenaga, M., Imamura, M., Masaki, N., and Mizokami, M. () Ex vivo induction of IFN-lambda3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients.</p>	<p>J Gastroenterol</p>	<p>49, 126-137</p>	<p>2014</p>
<p>High-throughput and sensitive next-generation droplet digital PCR assay for the quantitation of the hepatitis C virus mutation at core amino acid 70.</p>	<p>Mukaide, M., Sugiyama, M., Korenaga, M., Murata, K., Kanto, T., Masaki, N., and Mizokami, M.</p>	<p>J Virol Methods</p>	<p>207, 169-177</p>	<p>2014</p>

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
<p>Activated fibroblasts recovered from the cirrhotic liver provides malignancy-prone phenotypes to cancer cells and macrophages: comparable capacity with cancer-associated fibroblasts in hepatocellular carcinoma.</p>	<p>Mano Y, Yoshio S, Shoji H, Sugiyama M, Osawa Y, Kimura K, Shirabe K, Maehara Y, Mizokami M and Kanto T.</p>	<p>EASL The International Liver Congress 2016. Barcelona</p>	<p>Spain</p>	<p>2016.04.14-19.</p>
<p>Activated fibroblasts recovered from cancer tissue and cirrhotic liver are primed to exert malignancy prone functions.</p>	<p>Mano Y, Yoshio S, Shoji H, Sugiyama M, Doi H, Osawa Y, Kimura K, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y, Mizokami M, Kanto T.</p>	<p>JSH 23th Single Topic Conference.</p>	<p>Kanazawa, Japan</p>	<p>2016.09.22-23.</p>

研究発表及び特許取得報告について

<p>Pro-angiogenic Tie2-expressing monocytes/TEMs as a biomarker of the response to sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma.</p>	<p>Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Kumagai E, Doi H, Sugiyama M, Osawa Y, Kimura K, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Fukai M, Taketomi A, Mizokami M and Kanto T.</p>	<p>Japan Society of Hepatology, Single Topic Conference, Hepatocellular carcinoma.</p>	<p>Kanazawa, Japan</p>	<p>2016.09.22-23.</p>
<p>Human BDCA3+DCs utilize IFN-λ for inducing intrahepatic anti-viral ISGs and stimulating bystander Immune cells in HCV Infection.</p>	<p>Yoshio S, Sugiyama M, Fukuhara T, Matsuura Y, Mizokami M, Kanto T.</p>	<p>23rd International Symposium on Hepatitis C virus and Related Viruses.</p>	<p>Kyoto, Japan</p>	<p>2016年10月</p>
<p>Critical roles of bone morphogenetic protein 4 in cirrhotic and cancer-associated fibroblasts that regulates cellular senescence and cancer-supportive phenotype in the human liver.</p>	<p>Mano Y, Yoshio S, Shoji H, Sugiyama M, Doi H, Okamoto T, Osawa Y, Kimura K, Yoshizumi T, Shirabe K, Maehara Y, Mizokami M, Kanto T.</p>	<p>AASLD The Liver Meeting 2016.</p>	<p>Boston, USA</p>	<p>2016.11.11-15.</p>
<p>Serum YKL-40 as a marker of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma in patients with non-alcoholic fatty liver disease.</p>	<p>Mano Y, Kumagai E, Yoshio S, Shoji H, Sugiyama M, Korenaga M, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Kawaguchi T, Torimura T, Nozaki Y, Mizokami M, and Kanto T.</p>	<p>AASLD The Liver Meeting 2017.</p>	<p>Boston, USA</p>	<p>2016.11.11-15.</p>
<p>Linkage of sequential chemokine activation to HBV eradication after primary exposure: comprehensive analysis from the window period to the clearance in the blood donor, patients and chimpanzees.</p>	<p>Yoshio S, Sugiyama M, Shoji H, Mano Y, Doi H, Eiji M, Keiko K, Hoshi Y, Uchida S, Mizokami M, Tanaka J, Kanto T.</p>	<p>AASLD The Liver Meeting 2018.</p>	<p>Boston, USA</p>	<p>2016.11.11-15</p>

研究発表及び特許取得報告について

Enhanced expression of activation-induced cytidine deaminase in memory B cells provokes skewed immunoglobulin profile in advanced cirrhosis.	Doi H, Kaplan DE, Morikawa K, Eguchi J, Ito T, Kanto T, Yoshida H.	AASLD The Liver Meeting 2019.	Boston, USA	2016.11.11-15
Interleukin-34 as a fibroblast-derived marker of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease.	Shoji H, Yoshio S, Mano Y, Kumagai E, Doi H, Sugiyama M, Korenaga M, Arai T, Itokawa N, Atsukawa M, Aikata H, Hyogo H, Chayama K, Ohashi T, Ito K, Yoneda M, Nozaki Y, Kawaguchi T, Torimura T, Abe M, Hiasa Y, Fukai M, Kamiyama T, Taketomi A, Mizokami M and Kanto T.	AASLD The Liver Meeting 2020.	Boston, USA	2016.11.11-15
Cancer-associated or cirrhosis fibroblasts recovered from hepatocellular carcinoma promote macrophages and cancer cells to progressive phenotype.	Mano Y, Kanto T, Shoji H, Yoshio S, Sugiyama M, Osawa Y, Kimura K, Shirabe K, Maehara Y, Mizokami M.	Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR),	Philadelphia, USA	4/19-22, 2015
Comprehensive analyses of serum biomarkers associating with the increase of pro-angiogenic Tie2-expressing monocytes in patients with hepatocellular carcinoma.	Shoji H, Kanto T, Yoshio Y, Mano Y, Sugiyama M, Aoki Y, Taketomi A, Mizokami M.	Annual Meeting of American Association of Cancer Research (AACR),	Philadelphia, USA	4/19-22, 2015

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				



## 研究発表及び特許取得報告について

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。