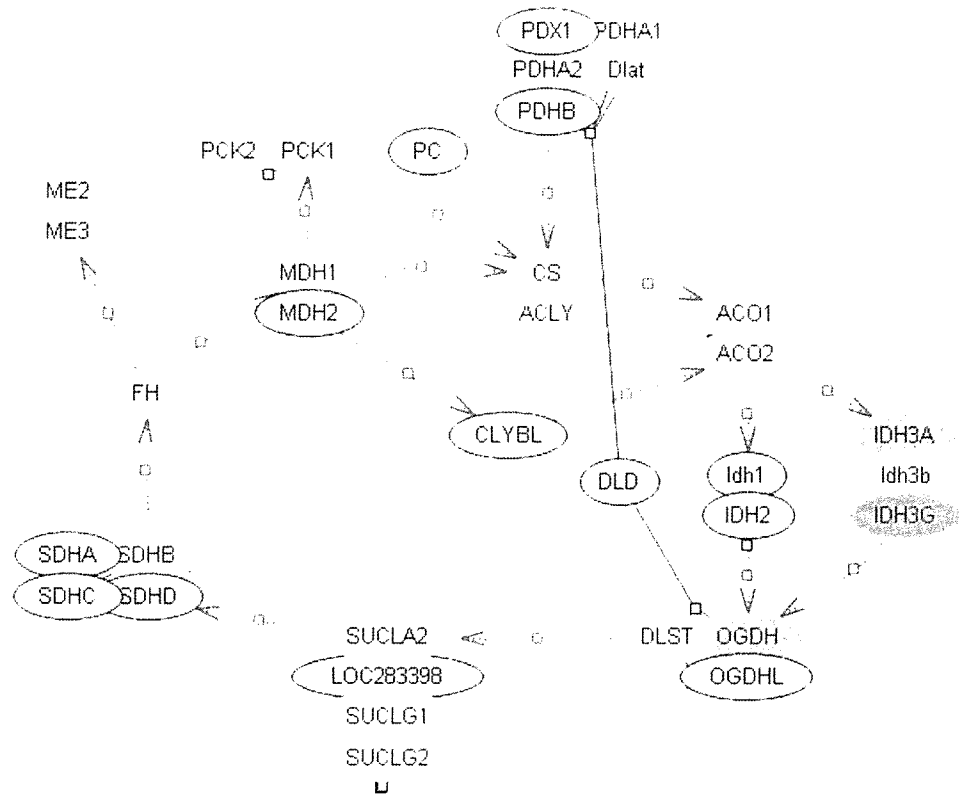
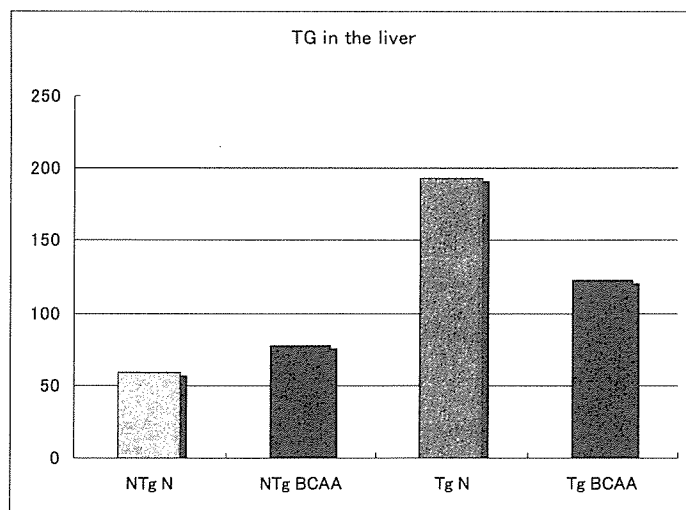


☒ 1



☒ 2



肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

HCV感染とBリンパ腫発症機構の解明

分担研究者	山口 一成	国立感染症研究所 血液・安全性研究部
協力研究者	溝呂木ふみ	慈恵医大第3病院診療部長、血液腫瘍内科助教授
	水落 利明	国立感染症研究所血液・安全性研究部第2室長
	濱口 功	国立感染症研究所血液・安全性研究部第4室長
	益見 厚子	国立感染症研究所血液・安全性研究部第4室主任研究官
	百瀬 暖佳	国立感染症研究所血液・安全性研究部第4室研究員
	岡田 誠治	熊本大学エイズ学研究センター・予防開発分野教授
	池淵 研二	埼玉医科大学輸血部教授

研究要旨

肝炎ウイルス関連肝外病変の中でB細胞悪性リンパ腫との関連は欧米を中心として、多くの報告がある。わが国においては詳細は不明であり、究明が待たれる。我々はHCV関連のB細胞悪性リンパ腫についてわが国での実態を明らかにし、B細胞悪性リンパ腫発症機序を解明することを目的として研究を行っている。

研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は肝臓に病気を起こすウイルスであるが、肝臓以外の臓器にも病変を起こすことが知られている。HCV感染者は肝外病変を主訴として診療科を受診する例も多い。またその発生頻度、予後への影響、感染者の quality of life (QOL)への影響など不明な点が多く、臨床疫学的実態を把握するには多科にわたる大規模な疫学調査が必要である。肝外病変の病態生理は肝炎ウイルス感染による自己免疫、ウイルス蛋白の関与などが示唆されているものの、その分子機序は明らかにされていない。そこで肝炎ウイルス関連肝外病変の現状を把握し、診断法、治療法を確立するために、臨床、基礎両面から研究することを目的とする。

HCV感染とB細胞性悪性リンパ腫発症機構の解明に関する研究は次の4つに分けられそれぞれの責任者の下、行われている。

研究プロジェクト

1. HCV抗体陽性B細胞性悪性リンパ腫の臨床的検討
2. HCV感染B細胞の免疫学的解析
3. 免疫不全マウスを用いたヒトHCV感染B細胞リンパ腫発症のメカニズム解析
4. 新規免疫不全マウスを用いたヒトB細胞 *in vivo* 増殖系の樹立とC型肝炎研究への応用

研究方法と研究結果

プロジェクト1. HCV抗体陽性B細胞性悪性リンパ腫の臨床的検討（溝呂木、浜口、山口）

A. 研究目的

本邦におけるHCV感染とBリンパ腫発症の関連を明らかにする。

B. 研究方法

慈恵医大第3病院血液・腫瘍内科を、1993年から2005年までに受診したB細胞性悪性リンパ腫266例のうちのHCV抗体陽性40例(15%)について、retrospectiveに調査した。

C. 研究結果

男性26、女性14名。年齢中央値は68.8歳。1999年以前にリンパ腫と診断された19例では64歳(48-85)、2000年以降では72歳(60-89)と高齢化を認めた。WHO分類ではDLBCL 27、MALT 4例。初発部位はリンパ節2、肝4、胃4、脾3、肺、脳、精巣、気管支、直腸、軟部組織各1例。24例がCS IVであった。リンパ腫診断時の肝臓病変は無症候性キャリア(AC) 3、慢性肝炎(CH) 25、肝硬変(LC) 12、肝臓がん(HCC) 合併7例であった。30例(AC 2、CH 21、LC 7)にCHOP相当の化学療法が行なわれ、完全寛解率は70%(AC 100%、CH 76%、LC 42%)だった。Rituximab使用12例を含め、化学療法による肝炎劇症化はみられなかった。リンパ腫治療後4例がCHからLCへ進行した。リンパ腫診断後の生存期間中央値はCH例75月、LC例6.7月で、LCとリンパ腫の合併は予後不良である。26例が死亡し、死因はリンパ腫12例、肝疾患は14例(4例重複)で、CH例にリンパ腫が多く、LC例にHCCが目立った。AC1、CH2例にリンパ腫治療終了後HCCを発症し死亡した。

D. 結論

HCV抗体陽性B細胞性悪性リンパ腫は肝予備能を考慮して化学療法を選択する必要がある。HCV抗体陽性B細胞性悪性リンパ腫はさらに高齢化すると考えられるが、QOLを尊重した治療を考慮するべきである。

プロジェクト2. HCV感染B細胞の免疫学的解析（水落、池淵）

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は、そのウイルス表皮蛋白の一種であるE2分子が肝細胞表面に発現されるCD81分子に高親和性に結合することにより感染が成立すると考えられている。このCD81分子は肝細胞のみならずB細胞にも発現されており、B細胞表面でCD19およびCD20分子と会合して、B細胞内へのシグナリングに寄与していることが明らかになっている。以前より、HCV感染者においてはmixed cryoglobulinemiaに代表されるB細胞免疫異常、あるいはrheumatoid factor(RF)の産生、あるいはSjogren-like syndromeといった自己免疫疾患の発症が報告されていた。さらにはHCV感染とnon-Hodgkin B cell lymphomaとの関連も指摘されている。このようなHCV感染と関連する肝外免疫病変には、上述したCD81分子を発現しているB細胞が深く関与している可能性が大である。特にCD5陽性B細胞は自己免疫疾患に関与していること(rheumatoid arthritisやSjogren syndromeの患者においてはCD5陽性B細胞の増殖が見られること、またこの細胞群がT細胞非依存性に自己抗原に対して反応すること)が示されており、HCV抗原(E2)の刺激によりCD5陽性B細胞が強く活性化されることが予想される。

B. 研究方法

瀉血療法により採取された HCV 感染者血液を用いて以下のような検討する。まず正常人 B 細胞と HCV 感染者 B 細胞において、CD81, CD19, CD5, CD27 の各分子の発現を比較する。CD27 分子はメモリー B 細胞のマーカーとして確立されており、HCV 抗原刺激によるナイーブ B 細胞 (CD27 陰性) からメモリー B 細胞への移行を検討するために比較する。また正常人の B 細胞と、さらには CD5 陽性 B 細胞と CD5 陰性 B 細胞の比較において、B 細胞活性化の指標として TLR4 や IFN β の発現あるいは IL-6 や IL-10 などのサイトカイン産生を比較する。さらには実際に HCV が B 細胞内に感染しているかどうかを negative strand HCV RNA を指標にして検討する。

C. 研究結果

今年度においては瀉血療法による検体 (HCV 感染患者血液) の入手の手續きに時間がかかったため、まず正常人全血検体より Ficoll 分離および auto-MACS (抗体結合磁気ビーズを用いる細胞分離装置) による CD5 陽性 B 細胞の分離を試みた。その結果、95%以上の純度で CD19 陽性細胞を精製することが可能になり、また FACS による細胞表面マーカーの解析から CD19+CD5+細胞の存在を確認した。今後は HCV 感染者血液から B 細胞を分離し実験に供していく。

プロジェクト 3. 免疫不全マウスを用いた HCV 関連 B 細胞リンパ腫発症のメカニズム解析 (浜口、益見、百瀬)

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスはヒトに持続感染し、肝細胞

癌などの慢性疾患を引き起こす主要因子である。一方、慢性的な HCV 感染患者の末梢血からはクローナルな感染 B リンパ球がしばしば見いだされ、HCV 感染が B 細胞リンパ腫の発症にも関与していることが示唆されているが、その機序は明らかでない。本研究課題では、HCV 遺伝子導入細胞の動態を免疫不全マウス (NOD/SCID/Jak3^{-/-}) を用いて *in vivo* で解析することで、HCV 感染と B 細胞リンパ腫発症の関係を解明してゆくことを目的とする。平成 18 年度はヒト正常末梢血に効率よく HCV 遺伝子を導入する方法を確立する。

B. 研究方法

細胞の調整

ヒト白血球を豊富に含むバッフィーコートよりヒト末梢単核球の調製を行った。バッフィーコートは日本赤十字社より譲渡されたものである。4°Cで一晩保存したバッフィーコートを PBS/2%(w/v)FCS で 3 倍希釈し、3,000rpm にて 10 分間、室温で遠心操作を行った。沈降してきた細胞分画を PBS/2%(w/v)FCS 30ml に懸濁して 15ml の LymphoprepTM (AXIS-SHIELD PoC AC)に重層し、これを 1,800rpm にて 25 分間、室温で遠心した。境界面にある単核球層を採取して PBS/2%(w/v)FCS で洗浄した後、生細胞数を算定し、実験に用いた。

遺伝子導入

ヒト末梢単核球への遺伝子導入は、一つは Microporator MP-100 (AR BROWN)を用いて行った。1x10⁵ の細胞を PBS にて 1 回洗浄し、Resuspension Buffer R 12 μ l に懸濁、0.5 μ g の GFP 発現ベクター pmaxGFP (amaxa biosystems)と混合した。Gold-Tip 内にサンプルを充填して Electrolytic Buffer E の入った MP-Tube に装着し、

24通りの条件で遺伝子導入を行った。

または、Human CD34 Cell Nucleofector™ Kit と Nucleofector™II (amaxa biosystems)を用いてヒト末梢単核球へ遺伝子導入を行った。必要量の細胞を遠心して回収し、Nucleofector™ Solution に懸濁、目的量のプラスミドと混合した。キュベットに移して Nucleofector™II に挿入し、プログラム U-008 を選択して遺伝子導入を行った。遺伝子導入後の細胞は速やかに至適培地に移し、解析まで CO₂ インキュベーター内で培養した。遺伝子導入の効率率は JSAN デスクトップ・セルソーター(Bay bioscience)を用い、GFP 陽性細胞率を求めることで検討した。

C. 研究結果

GFP 発現ベクターを用いて、ヒト末梢単核球へ高効率に目的遺伝子が導入できる条件検討を行った。検討項目は使用機器、細胞数、プラスミド濃度、遺伝子導入後の培地、および培養時間である。

1. 使用機器

通常の遺伝子導入が困難であるプライマリー細胞へ、高い導入効率の実績がある Microporator MP-100 (AR BROWN) と Nucleofector™II (amaxa bioscience)を用い、比較検討を行った。その結果、Microporator MP-100 を用いた場合には最高で3%程度しか GFP 陽性細胞数が認められなかったのに対し、Nucleofector™II を用いた場合には最低でも20%程度の導入効率を得られた。従って、使用する機器は Nucleofector™II が適していると考えられた。

2. 細胞数

10⁶~10⁸ cells の間で様々な細胞数のサンプルを用意し、Nucleofector™II を用いて GFP 陽性細胞

出現率を検討した。その結果、2x10⁷ cells より少ない細胞数で遺伝子導入を行った際に GFP 陽性細胞の割合が高いことが明らかとなった。一方、生細胞数の検討では 5x10⁶ cells 以上が適していた。従って、2x10⁷ cells が至適細胞数と考えられる。

3. プラスミド濃度

0~20μg の間で pmaxGFP の濃度を振り、GFP 陽性細胞の比率を検討した。その結果、10μg 以上のプラスミドを用いた際に最も高い導入効率を得られた。従って、10μg が至適プラスミド濃度と考えられる。

4. 至適培地

遺伝子導入後の細胞培養に適した培地を検討する目的で、下記2種類の培地を用いた。

① RPMI1640, 10% FCS, 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 20 ng/ml IL-6

② α-MEM, 20% FCS, 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml IL-3, 50 ng/ml TPO, 100μM β-mercaptoethanol

遺伝子導入3日後の GFP 陽性細胞数と生細胞数を検討したところ、GFP 陽性細胞の出現率には顕著な差が認められなかったものの、細胞の生存能力は①の培地を用いた方がやや高かった。従って、遺伝子導入後の細胞を培養する際には、①の 10% FCS, 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 20 ng/ml IL-6 を添加した RPMI1640 培地が適すると考えられる。

5. 培養時間

遺伝子導入後の細胞を7日目まで培養し、GFP 陽性細胞数と生細胞数の推移を検討した。その結果、GFP 陽性細胞数は3日目を境に減少することが明らかとなった。一方、生細胞数は1日目を過ぎると急速に減少した。遺伝子導入した細胞は速やかにマウスへの移植に用い、*in vitro* で培養する場合でも1日以内がよいと考えられ

る。

以上の結果から、ヒト末梢単核球に遺伝子導入を行う条件設定が完了した。すなわち、Human CD34 Cell Nucleofector™ Kit と Nucleofector™II を用い、 2×10^7 cells のヒト末梢単核球に $10 \mu\text{g}$ の plasmid を transfection する。遺伝子導入後の細胞は速やかにマウスへ移植するが、場合によっては 10% FCS, 50 ng/ml SCF, 10 ng/ml IL-3, 20 ng/ml IL-6 を添加した RPMI1640 培地中で 1 日培養したものを使用するのが適当である。

プロジェクト 4. 新規免疫不全マウスを用いたヒト B 細胞 *in vivo* 増殖系の樹立と C 型肝炎研究への応用 (岡田、浜口、百瀬)

A. 研究目的

HCV は、肝細胞のみならず B 細胞などにも感染し、自己免疫疾患や悪性リンパ腫の発症に深く関わっていることが知られている。しかし、HCV と血液細胞の関係を見る良い解析系が存在しないため、その機序ははっきりしていない。本研究では、ヒト B 細胞が生着・増殖するマウスモデルを構築し、HCV の血液・免疫系への影響や腫瘍との関連について解析可能なモデル系を構築することを目的とする。

B. 研究方法と結果

1) NOD/Scid/Jak-3 欠損マウスの樹立

NOD/Scid マウスと Jak-3 欠損マウスを 10 世代交配して NOD/Scid/Jak-3 欠損マウスを作成した。本マウスにおいては、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞が欠損し、高度の免疫不全状態にあることを確認した。また、本マウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性造血幹細胞を移植したところ、マウス骨髄への造血幹細胞の生着と B 細胞への分化が認められた。B 細胞は、最終分化した形質細胞まで確認された。

2) 免疫不全マウス体内におけるヒト B 細胞増殖・分化系の構築

2 Gy 放射線照射した NOD/Scid/Jak-3 欠損マウス腹腔内及び脾臓にヒト臍帯血単核球を移植したところ、移植後 2 週間で両者共にヒトリンパ球の生着が認められた。腹腔内投与では、主に T 細胞の構築が認められたのに対し、脾臓内投与では、B 細胞と T 細胞の両者の構築が認められた。T 細胞 B 細胞共にナイーブなフェノタイプを示すものから記憶細胞までが存在することを確認した。

C. 考察と来年度の計画

NOD/Scid/Jak-3 欠損マウス脾臓にヒト臍帯血由来単核球を移植することにより、マウス体内でヒトナイーブ B 細胞から記憶 B 細胞まで増殖・分化する系を構築した。今後この系を用いて、①C 型肝炎患者 B 細胞の増殖分化異常の検討(自己免疫疾患発症との関連)、②C 型肝炎関連悪性リンパ腫モデル系の樹立、③CHCV に対する免疫応答、に関する研究を進めていく予定である。

D. 考察

本研究グループは四つのプロジェクトを立ち上げそれぞれ連携しながら、研究を進めている。臨床的研究として、1) 合併頻度、2) 予後への影響、3) QOL への影響、4) 治療法の現状と予後への影響などが今後の課題である。同時にリンパ腫発症の機構についての基礎研究も推進していかなければならない

E. 結論

わが国にも HCV 関連 B リンパ腫は存在すると考えられ、今後わが国においても大規模な臨床疫学的研究が必要であると思われる。

1. F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Kato H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Mochizuki M, Ochiai M, Yamamoto A, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Two vaccine toxicity-related genes Agp and Hpx could prove useful for pertussis vaccine safety control, *Vaccine*, *In press*.

2) Masumi A, Fukazawa H, Shimazu T, Toshida M, Ozato K, Komuro K, Yamaguchi K.: Nucleolin is involved in interferon regulatory factor-2-dependent transcriptional activation. *Oncogene* 25:5113-5124,2006

3) Mizuochi T, Okada Y, Umemori K, Mizusawa S, Yamaguchi K.: Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H. *J Virological methods* 136,254-256,2006

4) Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M, Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K, Oike Y, Dumont DJ, Suda T.: Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival. *Blood* 107:1207-1213, 2006

6) 水落利明、岡田義昭、梅森清子、水沢左衛子、佐藤進一郎、山口一成 : 国内で販売されている10種類の高感度キットを用いた異なるH

BV genotype 由来 HBs 抗原の検出。臨床検査印刷中

7) 浜口 功、山口一成 : 輸血・移植と感染症。小児感染症学 印刷中

2. 学会発表

溝呂木ふみ、島田 貴、野里明代、他 : C型肝炎ウイルス (HCV) 抗体陽性B細胞リンパ腫の臨床的検討。第68回日本血液学会、第48回日本臨床血液学会合同総会。2006年10月7日。福岡。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

なし

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究
分担研究報告書

マウスモデルを用いたHCV誘発性リンパ腫発生機序の解析に関する研究

分担研究者 小原恭子 熊本大学大学院医学薬学研究部・特任教授

研究要旨： C型肝炎ウイルス (HCV) 感染は本邦における慢性肝炎の主原因である。さらに、HCV感染は自己免疫疾患の発生や悪性リンパ腫、扁平苔癬など肝臓外に疾患を引き起こすが、その発症機序は明らかではない。本研究では、これら肝外病変のうちリンパ腫発症機序解明を目的として2種のHCV誘発性リンパ腫モデルマウスの樹立を行った。1つはHCVの構造蛋白遺伝子を持続発現するマウス (CN2・IRF-1^{-/-}) で、HCV蛋白質発現が長期に渡って持続しリンパ腫を形成する事が明らかとなった。もう1つは、HCV遺伝子をB細胞で発現するトランスジェニックマウスであるHCV-CD19Creマウスを樹立した。HCV-CD19Creマウスの樹立により、HCVのB細胞への直接作用解析が可能となった。

A. 研究目的

HCV感染に伴う肝外病変の発症機序は未だ不明な点が多い。B細胞リンパ腫の発生は欧米でまず報告され、日本においてもある地域では発生が報告されている。これらのB細胞リンパ腫ではHCVの存在が報告されているが、具体的な発症の分子機序は未だ明らかではない。本研究では、HCVトランスジェニックマウスを用いて、その発症の分子機序解明を行い、治療法開発に寄与する基礎的知見を得る事を目的とする。

B. 研究方法

1. HCV持続発現マウス；HCV構造蛋白遺伝子 (CN2) をCre/loxPシステムで任意の時期に発現するマウスを、CTLやNK活性の低下したIRF-1欠損マウスと交配させる事によりHCV発現細胞が排除されず長期に渡っ

て発現できると予測し作製した。CN2 IRF-1^{-/-}マウスの尾静脈からCre-adenovirus (2x10⁹ PFU) を投与後HCVコア蛋白質を長期間測定した。

2. B細胞特異的にHCVを発現するマウス；1のモデルマウスではCre-adenovirusで発現誘導するためB細胞でのHCV発現が低い。そこでHCVのB細胞への直接作用を明らかにするため、HCV全長 (Rz) あるいはCN2マウスとCD19にCre遺伝子をノックインしたマウスを交配した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組み換え生物などの第二種使用等については、熊本大学遺伝子組み換え生物等第二種等安全委員会の承認を得ている (H18年6月)。動物実験については、「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」(H18.6.1)に従う。また、熊本大学本荘・大江地区動物実験委員会の承認を得ている(H18年4月)。

C. 研究結果

モデルマウス(1)については、Cre-adenovirus感染後500日まで肝臓においてHCVコア蛋白質の発現が確認できた。また、接種後180日を過ぎるとHCV発現マウスの中にリンパ腫を発生する個体が現れた。モデルマウス(2)については、全長HCVとHCV構造蛋白質部分の遺伝子を持つマウスと、CD19Creマウスを交配して作出した。

D. 考察

2つのモデルマウスの解析からHCVとリンパ腫発症機序の解析が可能となった。モデルマウス(1)においては、リンパ腫の発生率、リンパ腫を構成する細胞種、およびこれらの発症誘導に関わるサイトカインの体内動態等に関して研究を進める。(2)においては既に得られた産仔マウスについてHCV発現解析やリンパ腫の発生などについての経過観察を行う。

E. 結論

今年度、HCVを持続発現するマウスとHCVをB細胞で発現するマウスを樹立した。HCVを持続発現するマウスではリンパ腫の発生も認められた。今後これらのモデルマウスを用い、HCVによりリンパ腫発生を誘導する分子機序を解析する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Kaito, S. Watanabe, H. Tanaka, N. Fujita, M. Konishi, M. Iwasa, Y.

Kobayashi, E.C. Gabazza, Y. Adachi, K. Tsukiyama-Kohara, and M. Kohara. Morphological identification of hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins on the virion surface using immunogold electron microscopy. *Int J Mol Med.* 2006; 4: 673-678.

2. Y. Inoue, Y. Nomura, T. Haishi, K. Yoshikawa, T. Seki, K. Tsukiyama-Kohara, C. Kai, T. Okubo, and K. Ohtomo. Imaging of Living Mice Using a 1-T Compact Magnetic Resonance Imaging System. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2006; 24(4):901-907.
3. M. Masuda, H., Sato, H. Kamata, T. Katsuo, A. Takenaka, R. Miura, M. Yoneda, K. Tsukiyama-Kohara, K. Mizumoto, and Kai C. Characterization of monoclonal antibodies directed against the canine distemper virus nucleocapsid protein. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2006; 29 (2-3): 157-165.
4. K. Fujita, R. Miura, M. Yoneda, F. Shimizu, H. Sato, Y. Muto, Y. Endo, and K., Tsukiyama-Kohara, and C. Kai Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement heparin-like molecule in CDV infection. *Virology* in press.

2. 学会発表

(学会名・開催地・開催年等も記入)

1. 西村知裕、笠間由里、小原道法、小原恭子 C型肝炎ウイルス全長遺伝子発現継代細胞におけるp53の翻訳後修飾 第43回日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006.
2. 笠間由里, 高野貴士, 西村知裕, 斎藤誠

2. 小原道法, 小原恭子 C型肝炎ウイルス複製抑制抗体の樹立 第43回日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006
 3. 齋藤誠, 小原恭子 HCVによるDHCR24発現誘導機序の解明: DHCR24 遺伝子の転写制御機構の解析 第43回日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006.
 4. 高野貴士, 小原恭子, 関貴弘, 黄瑛, 甲斐知恵子 肝癌治療用麻疹ウイルスベクター特異性の検討 第43回日本ウイルス学会九州支部総会 久留米 2006.
 5. 小原恭子, 西村知裕, 齋藤誠, 甲斐知恵子, 小原道法 C型肝炎ウイルスによる酸化ストレス応答因子の修飾 第65回日本癌学会学術総会 横浜 2006.
 6. 小原道法, 習田昌祐, 塗谷秀子, 小原恭子 C型肝炎ウイルスと肝臓がんシンポジウム 感染発がんの共通性と特異性 第65回日本癌学会学術総会 横浜 2006.
 7. 高野貴士, 齋藤誠, 甲斐知恵子, 小原恭子 C型肝炎ウイルス関連腫瘍抗原 p70 の解析 第65回日本癌学会学術総会 横浜 2006.
 8. 西村知裕, 笠間由里, 小原道法, 小原恭子 C型肝炎ウイルス全長遺伝子発現継代細胞における p53 の翻訳後修飾 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006.
 9. 齋藤 誠, 小原恭子 C型肝炎ウイルスによる新規腫瘍関連分子 DHCR24 の発現誘導機序の解明 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006.
 10. 高野貴士, 甲斐知恵子, 小原恭子 肝癌関連抗原 P30 の解析 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006.
 11. 佐藤宏樹, 本間玲子, 関貴弘, 米田美佐子, 三浦竜一, 池田房子, 小原恭子, 渡辺慎哉, 甲斐知恵子 麻疹ウイルス感染後の宿主細胞遺伝子発現の包括的解析 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006.
 12. 井上義久, 佐藤宏樹, 米田美佐子, 小原恭子, 甲斐知恵子 麻疹ウイルスN遺伝子 mRNA の5' 非翻訳領域を介した翻訳制御機構の解析 第54回日本ウイルス学会学術集会 名古屋 2006.
 13. 齋藤誠, 小原恭子 C型肝炎ウイルスによる新規腫瘍関連分子 DHCR24 の発現誘導機序の解明 日本分子生物学会 2006 フォーラム 名古屋 2006.
- 「国際学会」
14. Tsukiyama-Kohara, K., Izumi, K., Huang, Y., Takano, T., Nishimura, T., Kohara, M., and Kai, C. HEPATITIS C VIRUS POSITIVE HEPATOCELLULAR CARCINOMA ASSOCIATED ANTIGEN. "20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress" Kyoto, 2006.
 15. Tsukiyama-Kohara, K., Nishimura, T., Kasama, Y., Shuda, M., and Kohara, M. 24-dehydrocholesterol reductase; a novel target of Hepatitis C virus and oxygen stress in hepatocytes. "13th International Meeting on Hepatitis C & Related viruses" Australia, 2006.

16. Tsukiyama-Kohara, K. Molecular Basis of Hepatocarcinogenesis aggravated by Hepatitis C virus "The 22nd International Kumamoto Medical Bioscience Symposium
17. The 3rd Japna-China Cooperative Life Science Symposium in Kumamoto, Asia-Africa International Network Symposium in Kumamoto of JSPS Asia and Africa Science Platform Program" Kumamoto, 2006.

2. その他セミナー等

1. 小原恭子 C型肝炎制圧のための基礎研究;肝発癌分子機序解明とワクチン開発へのアプローチ KIKUCHI バイオセミナー三風会 熊本 2006.
2. Makoto Saito, Takashi Takano, Tomohiro Nishimura, Yuri Kasama and Kyoko Kohara Fundamental Study for Overcoming Chronic Hepatitis C, Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma The 4th Kumamoto University Forum in Daejeon, Korea 2006.
3. 小原恭子 C型肝炎の克服に向けて 第8回イブニングセミナー 熊本大学リエゾンオフィス (東京) 2006.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

「C型肝炎治療用抗体」、特願：2006-49572
、発明者：小原恭子、甲斐知恵子、西村友裕、出願日：平成18年2月27日、出願人：国立大学法人 熊本大学、甲斐知恵子、(財)化学及血清療法研究所

2. 実用新案登録 なし

肝炎ウイルス感染の肝外病変の基礎的及び臨床的包括研究

分担研究報告書

HCV非肝細胞培養系の樹立と肝外病変発症機序の解明

分担研究者 勝二 郁夫 国立感染症研究所ウイルス第二部第三室 室長

研究要旨 C型肝炎ウイルス(HCV)非肝臓培養系を樹立し、HCV 関連肝外病変がおこる分子機序を明らかにし、治療法開発へとつなげることを目的とした。ヒト B 細胞株 Bjab 細胞で持続的に HCV コア蛋白を発現する Bjab-core 細胞株を樹立した。B 細胞表面分子の FACS 解析により、104 種類の CD 抗原の中で Bjab-core で発現が上昇しているもの 55 種、減少しているもの 11 種、変化のないものが 38 種あった。CD2 の主要リガンドである CD48 抗原の発現低下が著明であった。core 蛋白の発現により CD48 プロモーター活性が抑制され、CD48 mRNA の量が減少することが明らかとなった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は肝臓で複製し、肝炎、肝硬変、肝癌を発生するウイルスである。また、HCV は肝臓以外の臓器(血液、心臓、腎臓、代謝性疾患など)で混合型クリオグロブリン血症、Bリンパ腫、心筋症、糸球体腎炎、耐糖能異常などの多様な病態を引き起こすことが知られており、慢性C型肝炎の制圧とともに肝外病変への対策は社会的要請が極めて高い。HCV は肝臓のみでなくBリンパ球、Tリンパ球などの血球系細胞や心筋、腎細胞に感染増殖することが示唆されているが、肝以外の細胞で効率良くHCVが増殖する実験系がないため、肝外病変発現機構の解明が進んでいない。そこで、HCV 非肝臓細胞での効率の良いHCV 蛋白発現系、HCV RNA レプリコン細胞、およびHCV 培養系の構築を図り、肝外病変の分子機序を明らかにし、治療法開発へとつなげることを目的とする。

B. 研究方法

(1)HCV コア蛋白を恒常的に発現するB細胞リンパ腫細胞 Bjab-core 株の樹立
pEF- α に HCV core 遺伝子(aa 1-191)を挿入し、Bjab 細胞に Bio-Rad cell electroporator で遺伝子導入した。G418 含有の RPMI1640+10%FCS で培養、選別し、恒常的に core 蛋白を発現する細胞株 Bjab-core を樹立した。Vector control として Bjab-neo を樹立した。

(2)Bjab-core の表面分子の FACS 解析
Bjab-core と vector control の Bjab-neo の細胞表面分子 104 種類について発現レベルを FACSCalibur Flow Cytometer で解析し CellQuest Pro software でプロファイリングした。

(3)一過性 HCV コア蛋白発現による CD48 の発現変化の解析
B 細胞に HCV コア蛋白遺伝子を導入し、細胞表面分子 CD48 の発現レベルを FACS 解析した。

(4) Bjab-core 細胞での CD48 mRNA の real-time RT-PCR 解析

Bjab-core 細胞と Bjab-neo 細胞から RNA を抽出し、CD48 mRNA 量を Taqman Chemistry による real time RT-PCR 法で定量した。

(5) CD48 promoter 活性の比較

Bjab-core 細胞と Bjab-neo 細胞において、CD48 プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイで測定し比較した。

(6) 培養 B 細胞株による HCV RNA レプリコン細胞の作製

HCV subgenomic replicon luciferase を培養 B 細胞株に遺伝子導入し、ルシフェラーゼ活性を指標に HCV RNA レプリコンが複製可能な細胞をスクリーニングした。細胞は B 細胞株 (Raji, C1R, P3HR1 など)、T 細胞株 (Jurkat 細胞) などを用いた。

(7) Subgenomic GFPNeo-JFH1 replicon の構築

HCV RNA レプリコンが複製可能な細胞を可視化し、効率よくスクリーニングするために GFP 遺伝子を挿入した Subgenomic GFPNeo-JFH1 replicon プラスミドを作製した。P3HR1 細胞に electroporation で導入し、蛍光顕微鏡で発現を検討した。

(倫理面への配慮)

取り扱うすべての DNA および病原性微生物に関しては適切な封じ込めレベルの実験施設で取り扱われた。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。患者試料を用いる際は当研究所の倫理委員会に報告し承認を受けたのちに行う。

C. 研究結果

(1) HCV コア蛋白を恒常的に発現する B 細胞 Bjab-core の樹立

恒常的に HCV core 蛋白を発現する細胞株 Bjab-core を樹立した。コア蛋白の発現をイムノブロット法、免疫蛍光染色法で確認した。樹立した Bjab-core 細胞とベクターコントロールの Bjab-neo で以下の検討を進めた。

(2) Bjab-core の表面分子の FACS 解析

B 細胞表面分子の FACS 解析を行ったところ、104 種類の CD 抗原の中で Bjab-core で発現が上昇しているもの 55 種、減少しているもの 11 種、変化のないものが 38 種あった。CD2 の主要リガンドである CD48 抗原の発現低下が最も顕著であった。

(3) 一過性 HCV コア蛋白発現による CD48 の発現変化の解析

一過性 HCV コア蛋白の発現においても CD48 の発現が低下することが FACS 解析により示された。

(4) Bjab-core 細胞での CD48 mRNA の real-time RT-PCR 解析

Bjab-core 細胞と Bjab-neo 細胞から RNA を抽出し、CD48 mRNA 量を real-time RT-PCR 法で比較したところ、core 発現細胞で CD48 mRNA の量が減少していた。

(5) CD48 promoter 活性の比較

Bjab-core 細胞と Bjab-neo 細胞で CD48 プロモーター活性を測定したところ、Bjab-core で CD48 プロモーター活性が低下していた。

(6) 培養 B 細胞株による HCV RNA レプリコン細胞の作製

HCV subgenomic replicon luciferase RNA を Nucleofector で導入し、HCV RNA レプリコンが複製可能な細胞のスクリーニングを行った。C1R, P3HR1, Raji 細胞では HCV RNA レプリコンの複製活性は Huh7 細胞に比べ非常に低かった。

(7) Subgenomic GFPNeo-JFH1 replicon の構築

GFP 遺伝子を挿入した Subgenomic GFPNeo-JFH1 replicon を作製し、P3HR1 細胞に導入し、顕微鏡で観察したところ GFP の蛍光発色陽性の細胞が確認できた。

D. 考察

ヒトB細胞株Bjab細胞にHCVコア蛋白発現プラスミドを導入し、持続的にHCVコア蛋白を発現するBjab-core細胞を樹立した。Bjab-core細胞とコントロール細胞Bjab-neoについてB細胞表面分子のFACS解析を行った。104種類のCD抗原の中でBjab-coreで発現が上昇しているもの55種、減少しているもの11種、変化のないものが38種あった。HCVコア蛋白の発現によりB細胞表面分子の発現に著明な変化が起こることが示された。これらの表面抗原分子の中で顕著に変化が認められたのはCD48の発現低下であった。コア蛋白の発現によりCD48の発現が低下する分子機序を解析したところ、HCVコア蛋白の発現によりCD48プロモーター活性が抑制され、CD48 mRNAの量が減少することが分かり、CD48の転写抑制により発現が低下していると考えられた。

CD48はCD2との相互作用を介してT細胞やNK細胞の活性化、IL-2, IFN- γ の産生に

関与している。HCVコア蛋白発現によるCD48の発現抑制はIL-2, IFN- γ の産生低下につながると考えられ、HCV感染細胞の免疫系による排除からのがれる機構となっている可能性が考えられた。このことがB細胞でのHCVの持続感染機構になっている可能性が考えられ、HCV感染者からのHCV排除のためのターゲットになる可能性が考えられた。

次に、B細胞系におけるHCV RNAレプリコン細胞の樹立を図った。NucleofectorはB細胞系へも効率よく遺伝子導入できることが条件検討により明らかになった。Huh7細胞と比較するとまだ十分なHCV RNAの複製がみられていないが、Subgenomic GFPNeo-JFH1 repliconにより発現細胞が可視化できるようになったので、効率よくスクリーニングできるようになった。更に多くの細胞株を検討し、HCV RNAが効率よく複製する細胞を取得していききたい。HCV RNAレプリコンが効率よく複製できる細胞が得られたら、順次、in vitroで合成した感染性HCVを感染させ、コア蛋白ELISA, HCV RNAのreal time RT-PCRでHCV感受性細胞をスクリーニングしていききたい。

E. 結論

1) ヒトB細胞株Bjab細胞で持続的にHCVコア蛋白を発現するBjab-core細胞株を樹立した。B細胞表面分子のFACS解析により、104種類のCD抗原の中でBjab-coreで発現が上昇しているもの55種、減少しているもの11種、変化のないものが38種あった。CD2の主要リガンドであるCD48抗原の発現低下が著明であった。コア蛋白の発現により

CD48プロモーター活性が抑制され、CD48 mRNAの量が減少するために発現が低下すると考えられた。

2) B細胞系、T細胞系の細胞株でHCV RNAレプリコン細胞の樹立するために遺伝子導入条件を検討し、効率良く遺伝子導入できる条件を見出した。GFP遺伝子を発現するサブジェノミックレプリコンRNAを用いてレプリコン発現細胞を可視化することにより、効率よく感受性細胞をスクリーニングできるようになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Murakami K, Ishii K, Ishihara Y, Yoshizaki S, Tanaka K, Gotoh Y, Aizaki H, Kohara M, Yoshioka H, Mori Y, Manabe N, Shoji I, Sata T, Bartenschlager R, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus particles in three-dimensional cultures of the cell line carrying the genome-length dicistronic viral RNA of genotype 1b. *Virology*, 2006, 351:381-92.

2) Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Natsume T, Suzuki T, Shoji I, Aizaki H, Miyamura T, Nishijima M. Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein. *J. Biochem*, 2006, 139: 921-30.

3) Polyak SJ, Kevin C. Klein, Shoji I, Miyamura T, Lingappa JR. Assemble and Interact: Pleiotropic Functions of the HCV Core Protein *Hepatitis C Viruses: Genomes*

and Molecular Biology. (Seng-Lai Tan ed.) Horizon Scientific Press, Norwich, UK, 89-119, 2006.

4) The E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein.: Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. *J. Virol*, 2007, 81:1174-1185.

2. 学会発表

1) Shoji I, Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Suzuki T, Fukuda K, Shimoji T, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, and Miyamura T. E6AP-mediated ubiquitylation and degradation of HCV core protein. 12th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Paris, July 1-5, 2006.

2) Fukuda K, Shoji I, Shirakura M, Murakami K, Suzuki T, Wakita T, Mizumoto K, and Miyamura T. Molecular determinants of E6AP-dependent degradation of hepatitis C virus core protein. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses, Cairns, Australia, August 27 – 31, 2006

3) E6AP依存性HCV core蛋白分解の分子認識機構の解析. 福田浩一郎、勝二郁夫、白倉雅之、村上恭子、下地徹、阿部克俊、奈須純一、高橋由利絵、鈴木哲朗、脇田隆宇、

水本清久、宮村達男、第54回日本ウイルス学会、2006年11月19-21日、名古屋。

4) E6AP依存性HCV core蛋白分解によるウイルス産生調節機構. 勝二郁夫、村上恭子、白倉雅之、市村徹、鈴木亮介、鈴木哲朗、福田浩一郎、下地徹、佐藤慈子、深澤征義、山河芳夫、西島正弘、宮村達男、脇田隆字、

日本分子生物学会2006フォーラム、2006年12月6-8日、名古屋

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
佐田通夫,長尾由実子.	C型肝炎はなぜ恐いのか.	佐川公矯, 石竹達也, 藤丸知子	医療者の共同作業による病院感染対策	五絃舎	東京	2006	131-141
佐田通夫.	Q6 最近口内炎がよく出来ます。肝臓が悪いことと関係があるのでしょうか?	松崎靖司, 宜保行雄	患者さんの質問に答える慢性肝疾患診療	南山堂	東京	2006	18-20
佐田通夫.	Q55 キャリアの血液に触れたのですが, どのように対処したらよいでしょうか?	松崎靖司, 宜保行雄	患者さんの質問に答える慢性肝疾患診療	南山堂	東京	2006	180-182
長尾由実子,佐田通夫	C型肝炎患者が専門医に聞く88の質問.	長尾由実子, 佐田通夫	C型肝炎患者が専門医に聞く88の質問.	新興医学出版社	東京	2006	1-129
熊田博光	肝機能検査とその評価	井廻道夫 熊田博光 坪内博仁 林紀夫	肝臓病学	朝倉書店	東京	2006	98-106
熊田博光	その1 最新の治療コンセンサスに基づいた実地診療 ウイルス性肝炎治療ガイドライン 2006年1月	熊田博光	肝疾患の実地診療へのアプローチ	文光堂	東京	2006	6-11
水落利明、岡田義昭、梅森清子、水沢左衛子、佐藤進一郎、山口一成	国内で販売されている10種類の高感度キットを用いた異なるHBV genotype由来HBs抗原の検出(続報)		臨床検査	医学書院	東京	2007	印刷中
浜口功 山口一成	輸血・移植と感染症	岡部信彦	小児感染症学	診断と治療社	東京	2007	印刷中
Polyak SJ, Klein KC, Shoji I, Miyamura T, Lingappa JR.	Assemble and Interact: Pleiotropic Functions of the HCV Core Protein	Seng-Lai Tan	<i>Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology.</i>	Horizon Scientific Press,	Norwich, UK	2006	89-119

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
<u>Koike K</u>	Hepatitis C virus infection presenting with metabolic disease by inducing insulin resistance	Intervirology	49	51-57	2006
<u>Koike K</u> , Miyoshi H	Oxidative stress and hepatitis C viral infection	Hepatol Res	34	65-76	2006
<u>Koike K</u>	Oxidative stress and apoptosis in hepatitis C: the core issue	J Gastroenterology	41	292-294	2006
Okuse C, Yotsuyanagi H, Nagase Y, Kobayashi Y, Yasuda Y, <u>Koike K</u> , Iino S, Suzuki M, Itoh F	Risk Factors for Retinopathy Associated with Interferon Alpha-2b and Ribavirin Combination Therapy in Patients with Chronic Hepatitis C	World J Gastroenterol	12	3759-3759	2006
<u>Koike K</u>	Antiviral treatment of hepatitis C: present status and future prospects	J Infect Chemother	12	227-232	2006
Takahashi H, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Koibuchi T, Suzuki M, Kato T, Nakamura T, Iwamoto A, Nishioka K, Iino S, <u>Koike K</u> , Itoh F	Molecular epidemiology of hepatitis A virus in metropolitan areas in Japan	J Gastroenterol	41	981-986	2006
<u>Koike K</u> , Tsukada K, Yotsuyanagi H, Moriya K, Kikuchi Y, Oka S, Kimura S	Prevalence of Coinfection with Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Japan	Hepatol Res	37	2-5	2007
<u>Koike K</u>	Pathogenesis of HCV-associated HCC: dual-pass carcinogenesis through the activation of oxidative stress and intracellular signaling	Hepatol Res	In press		2007

<u>Koike K</u>	Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways	J Gastroenterol Hepatol	In press		2007
Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, <u>Koike K</u> , Matsuura Y	Hepatitis C Virus Core Protein Induces Insulin Resistance through a PA28 γ -Dependent Pathway	J Virol 2007	81	1727-1735	2007
Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, <u>Koike K</u> , Matsuura Y	Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis	Proc Natl Acad Sci USA	104	1661-1666	2007
Yotsuyanagi H, <u>Koike K</u>	Mechanisms underlying drug resistance in antiviral treatment for infections with hepatitis B and C viruses	J Gastroenterol	In press		2007
Suzuki Y, Yotsuyanagi H, Okuse C, Nagase Y, Takahashi H, Moriya K, Suzuki M, <u>Koike K</u> , Iino S, Itoh F	Fatal liver failure caused by reactivation of lamivudine-resistant hepatitis B virus: A case report	World J Gastroenterol	In press		2007
Tanaka K, Nagao Y, Ide T, Kumashiro R, <u>Sata M.</u>	Antibody to hepatitis B core antigen is associated with the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-infected persons: a 12-year prospective study.	Int J Mol Med	17	827-832	2006
Ohtsubo K, Oku E, Imamura R, Seki R, Hashiguchi M, Osaki K, Yakushiji K, Yoshimoto K, Ogata H, Nagamatsu H, Ando E, Shimamatsu K, Okamura T, <u>Sata M.</u>	Simultaneous hepatic relapse of non-Hodgkin's lymphoma and hepatocellular carcinoma in a patient with hepatitis C virus-related cirrhosis.	Acta Haematol	116	266-271	2006
Wang Y, Takao Y, Harada M, Yutani S, Ide T, <u>Sata M.</u> , Itoh K, Yamada A.	New epitope peptides derived from hepatitis C virus (HCV) 2a which have the capacity to induce cytotoxic T lymphocytes in HLA-A2+ HCV-infected patients.	Microbiol Immunol	50	857-865	2006

Taniguchi E, Kawaguchi T, Shimada M, Kuwahara R, Nagao Y, Otsuka M, Iwasaki S, Matsuda T, Ibi R, Shiraishi S, Ito M, Oriishi T, Kumashiro R, Tanaka S, Saruwatari Y, <u>Sata M.</u>	Branched-chain amino Acid supplementation complements conventional treatment for spontaneous bacterial peritonitis.	Digest Dis Sci	51	1057-1060	2006
Kawaguchi T, Taniguchi E, Ito M, Akiyoshi J, Itano S, Otsuka M, Iwasaki S, Matsuda T, Ibi R, Shiraishi S, Oriishi T, Tanaka S, Saruwatari Y, <u>Sata M.</u>	Appearance-specific satiety increases appetite and quality of life in patients with metastatic liver tumor: a case report.	Kurume Med J	53	41-46	2006
Murashima S, Tanaka M, Haramaki M, Yutani S, Nakashima Y, Harada K, Ide T, Kumashiro R, <u>Sata M</u>	A decrease in AFP level related to administration of interferon in patients with chronic hepatitis C and a high level of AFP.	Dig Dis Sci	51	808-812	2006
Nagao Y, Kawasaki K, <u>Sata M.</u>	Insulin resistance and lichen planus in patients with HCV-infectious liver diseases.	J Gastroen Hepatol		in press	2007
Nakajima T, Moriguchi M, Katagishi T, Sekoguchi S, Nishikawa T, Takashima H, Kimura H, Minami M, Itoh Y, Kagawa K, Tani Y, <u>Okanoue T</u>	Premature telomere shortning and impaired regenerative response in hepatocytes of individuals with NAFLD	Liver Int	26	23-31	2006
Harano Y, Yasui K, Toyama T, Nakajima T, Mitsuyoshi H, Minami M, Hirasawa T, Itoh Y, <u>Okanoue T</u>	Fenofibrate, a peroxisome proliferators-activated receptor alpha agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver	Liver Int	26	613-620	2006
Makiyama A, Itoh Y, Yasui K, Mori K, Okita M, Nakayama M, Yamaoka J, Minami M, Nakajima T, <u>Okanoue T</u>	First phase viral kinetic parameters and prediction of response to interferon alpha-2b/ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C	Hepatol Res	36	94-99	2006
Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Akuta N, Tsubota A, Suzuki Y, Sezaki H, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Matsuda M, Satoh J, and <u>Kumada H.</u>	Clinical and virological features of non-breakthrough and severe exacerbation due to lamivudine resistant mutant.	J Med Virol	78	341-352	2006
Arase Y, Ikeda K, Suzuki F, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Akuta N, Sezaki H, Someya T, Hosaka T, Sezaki H, Kobayashi M, and <u>Kumada H.</u>	Long-term outcome following HBsAg seroclearance in patients with chronic hepatitis B.	Am J Medicine	71	9-71	2006