

片化を行った後、断片化されたゲノム DNA の両末端にアダプター配列をライゲーション反応により付加する。アダプター配列は、続く PCR で使用されるプライマーと相同な配列を持ち、また制限酵素認識配列を突出端として持つ 2 本鎖 DNA である。2 種類の制限酵素 (Sty I、Nsp I) のそれぞれに対して用意されるアダプター配列は、制限酵素認識配列を除いて共通の配列を持っているので共通のプライマーを使用して PCR を行うことができる。PCR では、目的の長さを持ったゲノム DNA 断片 (250-1100 bp) だけが選択的に増幅される。ここまでの酵素反応により、もともと 30 億塩基対のゲノム DNA が 5 億塩基対程度の PCR 混合産物となる。マイクロアレイへの効率的なハイブリダイゼーションには、ゲノムの複雑さを低減することが大きな役割を果たすと考えられている。続いて、Sty I および Nsp I それぞれの PCR 産物を混合した後、混合産物を精製し、DNase I 制限酵素による断片化を行う。断片化された PCR

産物は平均長で 180 bp 以下となる。マイクロアレイへの効率的なハイブリダイゼーションには、ゲノムの複雑さを低減することに加えて PCR 産物の断片化が重要になる。最後に terminal deoxynucleotidyl transferase 酵素反応により、断片化された PCR 産物の末端にビオチンを導入する。

続いて、専用のマイクロアレイを用いてハイブリダイゼーションを行う。マイクロアレイに固定されるプローブは 25 塩基長のオリゴ DNA で、SNP 部位を含む塩基配列を持っている。2 種類のアリルを正確に識別するために、SNP 部位を 25 塩基長のプローブの中心に置いたプローブを基本として、SNP 部位を中心から 4 塩基上流 (+4) にずらしたプローブから 4 塩基下流 (-4) にずらしたプローブまで 7 種類のプローブ (-4、-2、-1、0、+1、+3、+4) を用意し、その中から最適な 1 種類のプローブを選択する。また、同一のプローブをマイクロアレイ上に 4 スポット用意することで、SNP タイピングデータの欠損を防ぐ工夫がなされている。

マイクロアレイへのハイブリダイゼーションが終了した後、洗浄・染色装置を用いてマイクロアレイの洗浄および蛍光染色を行う。蛍光染色は、蛍光分子で標識されたストレプトアビジンが、上述のビオチン導入された PCR 断片に結合することにより行われる。また、洗浄・染色装置内ではビオチン修飾された抗ストレプトアビジン抗体を用いてシグナルの増強が行われる。最後に蛍光染色されたマイクロアレイを専用のスキャナーで画像データとして読み取り、続いて専用の画像解析ソフトウェア (Affymetrix Genotyping Console 2.0) を用いて各 SNP の遺伝子型を決定する。

複数の施設で行われた Affymetrix SNP6.0 による SNP 解析の結果から、コール率(全 909, 622SNPs

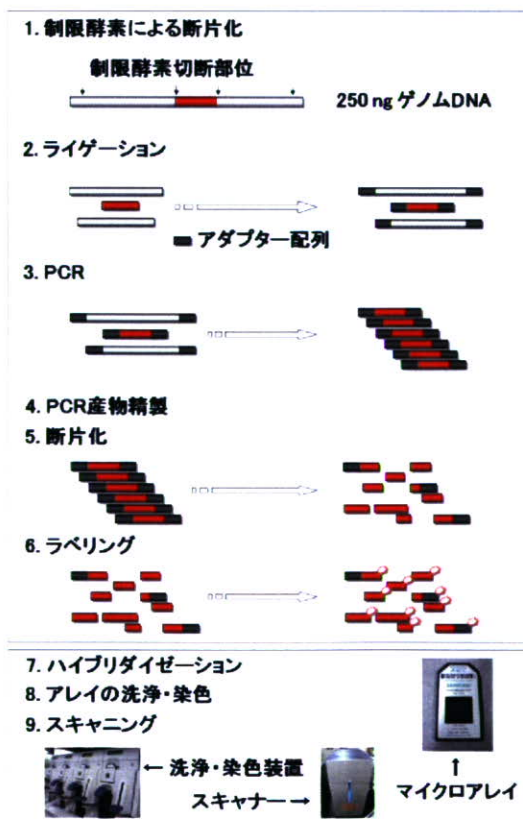


図 1 Affymetrix SNP6.0 による SNP タイピング - 18 -

のうち遺伝子型が決定された SNP の割合) は平均 99%以上となり、また、HapMap データベースに登録された SNP との遺伝子型一致率は 99.7%を超えることが Affymetrix 社から報告されている。また、タイピング結果が悪いことが明らかとなっている 3,022SNPs をクオリティーコントロール (QC) として用いており、QC コール率 (全 3,022SNPs のうち遺伝子型が決定された SNP の割合) が 86%を下回る検体は解析から除外される。

C. 研究結果

現在までに、健常対照群 200 検体および慢性ウイルス性肝疾患患者 144 検体の SNP タイピングが完了し、QC コール率の平均はそれぞれ 97.37%、97.91%となった。また、QC コール率が 86%を下回る検体は、健常対照者群で 200 検体のうち 2 検体、慢性ウイルス性肝疾患患者は 144 検体のうち 1 検体であった。全 909,622SNP のコール率は、QC コール率が 86%を上回った検体で決定され、それぞれ 99.71% (n=198)、99.58% (n=143) となった (図 2)。

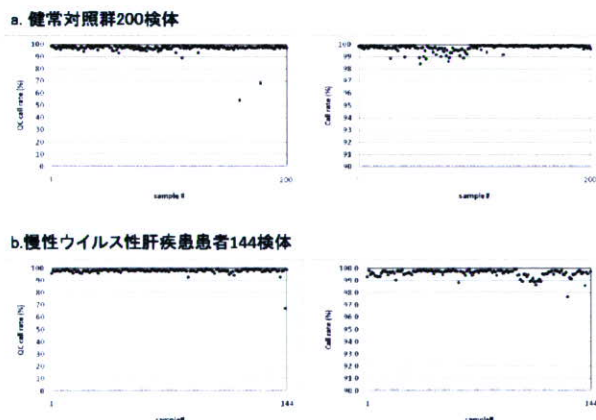


図 2 QC コール率およびコール率

健常対照群 200 検体および慢性ウイルス性肝疾患患者 144 検体について、QC コール率が 86%を上回る検体を用いて遺伝子型の決定を行った

日本人健常対照群 200 検体の SNP タイピングの結果から、Affymetrix SNP6.0 に搭載された全 909,622SNPs の約 18.8%に相当する 170,921SNPs

において、日本人試料では多型性が見られないことが明らかとなった。また、マイナーアレル頻度 (MAF) が 5%以上、ハーディ・ワインバーグ平衡 (HWE) が p 値 > 0.001 、SNP コール率 (各 SNP についてタイピングした全検体のうち遺伝子型を決定できた検体の割合) が 95%以上となる SNP は 588,932SNPs となることが明らかとなった。

遺伝子型を決定することのできた慢性ウイルス性肝疾患患者 143 検体のうちの 96 検体と健常対照群 198 検体を用いて、ゲノムワイド関連分析を行った。われわれが開発したゲノムワイド関連分析ソフトウェア (GeneChipAnalysis ver2.0.12) は、全 909,622 種類の SNP についてケース・コントロール関連分析を行うことができ、アレル頻度、ジェノタイプ頻度、優性・劣性モデルでの統計解析結果を専用のソフトウェア

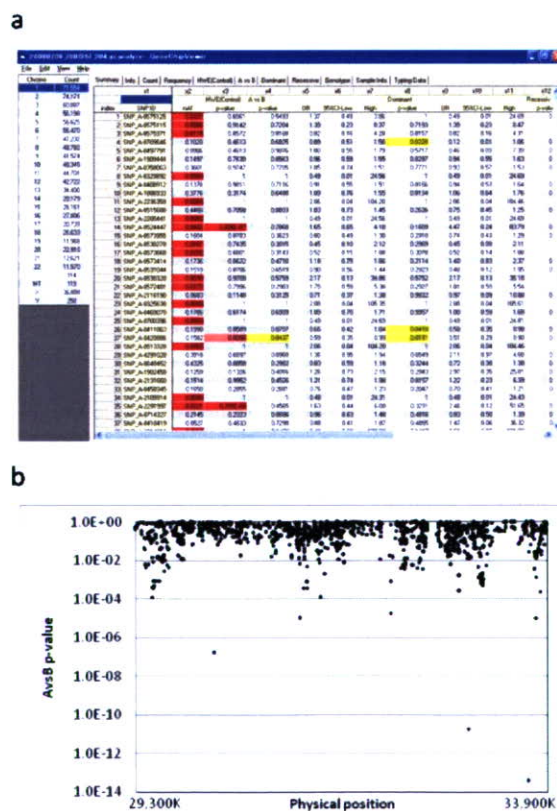


図 3 ゲノムワイド関連分析の結果

a. GeneChipViewer による関連分析結果の表示画面 b. ヒト 6 番染色体の MHC 領域における関連解析の結果

(GeneChipViewer ver2.1.1) で視覚的に表示することができる (図 3a)。例えば、ヒト 6 番染色体上については 56,470 種類の SNP において、MAF > 5%、HWE p-value > 0.001、SNP コール率 > 95% を満たす SNP は 38,756 SNPs 存在し、アリル頻度での関連解析の結果、p 値 < 0.05 となる SNP は 2,157 個検出された。また、ヒト 6 番染色体上の MHC 領域 (6q21.31) には、1,459 種類の SNP が存在し、アリル頻度での関連解析で p 値 < 0.05 となる SNP は 188 SNPs であった (図 3b)。

D. 考察

健常対照群 198 検体と慢性ウイルス性肝疾患患者 96 検体でゲノムワイド関連分析を行った結果、ヒト 6 番染色体の MHC 領域には p 値 < 0.05 となる SNP が期待値の倍以上存在することが明らかとなった。この結果から、MHC 領域には慢性ウイルス性肝疾患感受性遺伝子が存在していることが示唆される。しかし、ゲノムワイド関連解析で有意差が検出された SNP の中には擬陽性シグナルが多く含まれていることが知られている。擬陽性シグナルを取り除くためには、ケース・コントロール関連分析に不適切なサンプルを除去すること、また、MAF、HWE および SNP コール率をパラメータとしてタイピング精度の高い SNP を選択すること、さらに異なるサンプルセットを用いた再現性の検討が重要であると考えられる。

E. 結論

肝炎ウイルスに感染した宿主側の病態促進因子及び薬剤応答性を規定する遺伝要因はまだ明らかとなっていない。患者群を病態および薬剤応答性に応じて分類したサブグループごとに、90 万種類以上の SNP を対象としたゲノムワイド関連分析を行うことにより、宿主側の遺伝要因の候補が多数検出されることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 西田奈央、徳永勝士：大規模 SNP タイピングによる多因子疾患遺伝子の探索、実験医学、Vol. 25 : 62-68 (2007)
- 2) 西田奈央、徳永勝士：ゲノムワイド関連分析による多因子疾患遺伝子の探索、肝疾患 Review 2008~2009 (in press)
- 3) Miyagawa T, et al.: Appropriate data cleaning methods for genome-wide association study (Submitted)
- 4) Nishida N. et al.: Further development of multiplex single nucleotide polymorphism typing method, the DigiTag2 assay, Anal. Biochem., 364: 78-85 (2007)

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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）
分担研究報告書（平成 19 年度）

テラーメイド治療を目指した肝炎ウイルスデータベース構築に関する研究

分担研究者：佐田 通夫 久留米大学医学部消化器疾患情報講座 教授
同大学医学部内科学講座消化器内科部門 教授
研究協力者：長尾由実子 久留米大学医学部消化器疾患情報講座 准教授

分担研究課題：肝外病変とくに扁平苔癬と HCV 感染

研究要旨：C型肝炎ウイルス（HCV）やB型肝炎ウイルス（HBV）は、肝疾患だけでなく種々の肝外病変を引き起こす。扁平苔癬やシェーグレン症候群は、肝外病変の代表的な疾患の1つである。HCV感染者の10-20%に扁平苔癬を合併するが、どんな患者に合併するのか、その詳細はわかっていない。そこで、扁平苔癬あるいはシェーグレン症候群を合併しているHCVもしくはHBV慢性肝疾患患者について、ヒトゲノム・遺伝子解析研究を開始した。本研究の開始にあたり、久留米大学倫理委員会の審査で承認を受けた後（承認日2007年8月6日付）、2007年10月30日より検体及び付帯情報の収集を開始した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）は、扁平苔癬の発症に関与する。現在までに、HCV感染者の10-20%に扁平苔癬を合併すること、HCV関連の扁平苔癬では、皮膚や口腔粘膜内でHCVが増殖していることが証明され、HCV感染を伴う扁平苔癬は非感染者よりも口腔癌の発生率が高いこともわかっているが、種々のHCV関連肝外病変の発症メカニズムは、ほとんど解明されていない。扁平苔癬の発症には、肝炎ウイルス量や genotype、肝機能等に関与しない。

そこで、扁平苔癬あるいはシェーグレン症候群を合併しているウイルス性慢性肝疾患患者について、ヒトゲノム・遺伝子解析研究を開始した。

B. 研究方法

本研究の開始にあたり、久留米大学倫理委員会の審査で承認を受けた後（承認日2007年8月6日付）、2007年10月30日より検体及び付帯情報の収集を開始した。

対象は、本研究の目的と内容に同意した患者で、ウイルス性慢性肝疾患として久留米大学病院を受診し、扁平苔癬あるいはシェーグレン症候群の合併有無が確認できた患者とした。ただし、インターフェロン治療中の患者は除外した。

（倫理面への配慮）

対象患者に、調査の目的と方法について説明し、同意と承諾の下で研究を実施した。収集された検体は、すべて匿名化した。

C. 研究結果

今年度は、2007年10月30日より検体及び付帯情報の収集を開始し、具体的な研究成果はまだ得られていない。今後、解析予定である。

D. 結論

今後、肝外病変とくに口腔扁平苔癬患者の検体

および付帯情報を収集する。一方で、口腔扁平苔癬以外の肝外病変であるシェーグレン症候群、糖尿病、悪性リンパ腫の検体も収集する予定である。また、扁平苔癬患者が、インターフェロン治療を受けた場合、多くの症例で症状が増悪し、治療の完遂やQOL、そして治療効果にも影響を及ぼすことになるため、扁平苔癬の合併は重要な問題である。すでに検体が収集された患者に対しては、インターフェロン治療が導入された場合の経時的な臨床経過を調査する。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Takao Y, Yamada A, Yutani S, Ono T, Nagao Y, Ando E, Ide T, Itoh K, Sata M. Serum levels of IgG to the peptide of HCV1b core at positions 35-44 correlated with persistent infection, while levels of IgG to the peptide of NS5A at positions 2132-2140 correlated with better prognosis in HCV-infected patients. *Med Microbiol Immunol* 2007; 196: 157-164.
2. Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, Itou M, Sumie S, Nagao Y, Yanagimoto C, Hanada S, Koga H, Sata M. Clearance of HCV improves insulin resistance, Beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 570-576.
3. Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Sumie S, Oriishi T, Matsuoka H, Nagao Y, Sata M. Branched-chain amino acids improve insulin resistance in patients with hepatitis C virus-related liver disease: report of two cases. *Liver Int* 2007; 50: 1287-1292.
4. Nagao Y, Myoken Y, Katayama K, Tanaka J, Yoshizawa H, Sata M. Epidemiological survey of oral lichen planus among HCV-infected

inhabitants in a town in Hiroshima Prefecture in Japan from 2000 to 2003. *Oncol Rep* 2007; 18: 1177-1181.

5. Nagao Y, Kawasaki K, Sata M. Insulin resistance and lichen planus in patients with HCV-infectious liver diseases. *J Gastroen Hepatol* in press.

2. 学会発表

1. Kawguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, Itou M, Sumie S, Nagao Y, Yanagimoto C, Hanada S, Koga H, Sata M. Eradication of HCV Improves Hepatic Expression of Insulin Receptor Substrate 1/2 and Insulin Resistance. *Digestive Disease Week-2007, Washington, 2007.*
2. Taniguchi E, Kawguchi T, Itou M, Oriishi T, Sata M. Body cell mass estimated by DSM-BIA is a possible parameter for disease severity in patients with liver cirrhosis. *The 6th JSH Single Topic Conference, Iwate, 2007.*
3. Itou M, Kawguchi T, Taniguchi E, Sumie S, Oriishi T, Mitsuyama K, Tsuruta O, Ueno T, Sata M. Down-regulation of glucagon-Like peptide-1 in patients with HCV-related glucose intolerance. *The 6th JSH Single Topic Conference, Iwate, 2007.*
4. Kawguchi T, Ide T, Taniguchi E, Itou M, Sumie S, Abe M, Yanagimoto C, Koga H, Harada M, Sata M. Clearance of CHV improves glucose metabolisms and up-regulates hepatic expression of insulin receptor substrates. *The 6th JSH Single Topic Conference, Iwate, 2007.*

F. 知的所得権の所得状況 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）
分担研究報告書（平成19年度）

テーラーメイド治療を目指した肝炎ウイルスデータベース構築に関する研究

分担研究者：本多 政夫 金沢大学医学部先端医療技術学 教授

分担研究課題：肝癌浸潤リンパ球、肝癌患者末梢血液単核球細胞の遺伝子発現プロファイルの特徴

研究要旨：肝癌組織においてはリンパ球浸潤がしばしば認められる。また、末梢血単核球（以下PBMC）はリンパ球をはじめとした免疫担当細胞を含む。今回、12例の外科的切除肝癌組織より癌部および非癌部浸潤リンパ球をレーザーキャプチャーマイクロダイセクションにて選択的に回収、また、32名のC型肝硬変患者および30名のC型肝硬変肝癌合併患者のPBMCを採取、DNAマイクロアレイを用いてそれぞれ包括的に遺伝子発現を解析した。癌浸潤リンパ球において発現が亢進した遺伝子の生物学的プロセスは、抗原提示、低酸素および酸化ストレスへの応答、ユビキチン・プロテアゾーム蛋白分解、細胞周期、mRNAプロセスに関連し、これらのプロセスは、肝癌患者PBMCにおいて発現が亢進した遺伝子の生物学的プロセスと共有されていた。肝癌浸潤リンパ球の遺伝子発現の特徴は、肝癌患者におけるPBMCの遺伝子発現プロファイルに反映され、末梢血液細胞の遺伝子発現解析によって宿主の癌に対する応答を解明できる可能性が示された。

A. 研究目的

肝癌における浸潤リンパ球には、癌増殖に抑制的に働く細胞傷害性T細胞や、促進的にはたらく制御性T細胞など様々な免疫担当細胞が存在し、その生物学的意義役割について、診断治療的観点からも興味もたれている。また、末梢血液単核球細胞も、免疫担当細胞より構成されており、宿主の免疫状態を反映すると考えられる。今回、癌局所の免疫応答を示す癌浸潤リンパ球、また、肝癌患者の末梢血液単核球細胞の遺伝子発現プロファイルを解析し、遺伝子発現の観点から、両者の関連について検討した。

B. 研究方法

C型慢性肝炎を背景とした肝癌患者の外科的切除標本より、癌部浸潤リンパ球、および非癌部肝組織浸潤リンパ球をlaser capture microdissectionを用いて選択的に分離、また、C型肝硬変(LC)患者32名、またC型肝硬変肝癌合併患者(HCC)30名より、末梢血液単核球細胞(PBMC)を採取、それぞれtotal RNAを精製し、mRNAを増幅、AceGene®Human Oligo Chip 30K(日立ソフト)にて包括的に遺伝子発現を解析した。発現データ解析にはBRB array tool(NCBI)、MetaCore(GeneGo)を用いた。

C. 研究結果

肝癌浸潤リンパ球においては、T細胞およびマクロファージが多数存在し、また、有為に発現亢進を示した遺伝子773個が関連する生物学的プロセスは、抗原提示、低酸素および酸化ストレスへの応答、ユビキチン・プロテアゾーム蛋白分解、細胞周期、mRNAプロセスに関連した。LC患者とHCC患者のPBMCの遺伝子発現プロファイルは階層クラスタによって大きくLC群、HCC群に分かれ、また、HCC群において有為に発現が亢進した遺伝子867個が関与する生物学的プロセスに、肝癌浸潤リンパ球の発現亢進の特徴的なプロセスが同様に認められた(下表)。

肝癌浸潤リンパ球、肝癌患者PBMCにおいて発現亢進した遺伝子に関する共通の生物学的プロセス

Antigen presentation
Ubiquitin-proteasomeal proteolysis
mRNA processing
Cell cycle
Response to hypoxia and oxidative stress

D. 考察

肝癌浸潤リンパ球の遺伝子発現プロファイルを包括的に解析することにより、局所における宿主の癌に対する免疫応答の特徴が解明できることが示唆された。また、遺伝子発現プロファイル

において、肝癌浸潤リンパ球の特徴が、全身の末梢組織を循環する PBMC において反映されていることが見出された。このことは、肝癌患者における PBMC の遺伝子発現解析によって、肝癌発生時における宿主の局所免疫応答を解析できる可能性を示唆するものであり、肝癌診断、また肝癌治療におけるその効果の判定に応用できる可能性を秘める。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発表

1. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. BBRC 2007 361(2):379-84. Takamura T, Honda M, Kaneko S. et al

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
特願 2006-294933 「末梢血液細胞の遺伝子発現解析による肝癌診断遺伝子セットの同定と診断キットの開発」

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）
研究協力報告書（平成19年度）

テラーメイド治療を目指した肝炎ウイルスデータベース構築に関する研究

分担研究者：黒崎 雅之 武蔵野赤十字病院消化器科 副部長

分担研究課題：C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン・リバビリン併用療法における治療効果規定因子のデータマイニング解析

研究要旨：ペグインターフェロン・リバビリン併用療法における著効（ウイルス完全排除）を規定する要因をデータマイニングにより解析した。その結果、強力な抗ウイルス効果を有する本療法では、ウイルス因子よりも生体因子が治療抵抗性因子として顕在化し、steatosis、LDL-cholesterol、年齢、gamma-GTP、および血糖値が治療効果を規定することを示した。さらに、これらの生体因子を均一化した集団においては、ウイルス因子であるHCV変異（NS5A、Core）が治療効果を規定することを示した。現在ヒトSNPsの解析が進行しており、その結果も順次データマイニング解析に投入することにより、生体因子、ウイルス因子、ヒトSNPs情報の統合的解析が可能となり、治療抵抗性機序解明の重要な基盤情報が得られる。

A. 研究目的

ペグインターフェロン・リバビリン併用療法によりウイルス完全排除が達成される症例は約50%であり、治療抵抗性の機序解明は臨床的に重要な課題である。治療抵抗性にはウイルス因子と生体因子の両者が関与するが、ウイルス側の治療抵抗性因子の解明には生体側の治療抵抗性因子を均一化した集団での解析が必要である。本年度の研究ではデータマイニング手法により臨床データを解析し、ペグインターフェロン・リバビリン療法における生体側の治療抵抗性因子を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

ペグインターフェロン・リバビリン併用療法を開始後24週以上経過した312例（全例がgenotype 1b、高ウイルス量の難治例）を対象とした。目的変数として、最終的なウイルス完全排除と密接に関連する早期治療効果（12週HCV陰性化）を設定

し、説明変数として肝組織所見、臨床情報、および診療データベースからdownloadした全血液検査結果を投入し、SPSS Clementine 10.1によりデータマイニング解析を行い、治療効果判別アルゴリズムを構築した。269例で治療効果を判別するアルゴリズムを作成し、43例で妥当性を検証した。

C. 研究結果

1. 12週HCV陰性化にはsteatosis 30%未満、LDL-cholesterol 100以上、年齢50ないし60未満、gamma-GTP 40未満、血糖値120未満が関与した。これらを判別因子とする治療効果判別アルゴリズムにより、12週HCV陰性化率が15%-77%の7 subgroupが同定された。

2. アルゴリズム作成群 vs. 検証群の subgroup別の12週HCV陰性化率は subgroup1-2：15-18% vs. 13-20%、subgroup3-4：31-35% vs. 36-50%、subgroup5-7：60-77% vs. 60-100%であり、アルゴリズムの妥当性が検証された。

3. 各 subgroup の最終的なウイルス完全排除率は subgroup1-2 : 19-24%、Subgroup3-4 : 42-44%、subgroup5-7:36-79%であった。

4. ウイルス因子のインパクトを検証するために各 subgroup における HCV 変異 (NS5A, Core) を検討し、これらの因子が治療効果と関連することを示した。

5. 更なる治療抵抗性因子を解明するために、治療無効 (ウイルス持続陽性かつ 12 週時ウイルス減少 2 log/ml 未満) 例および著効 (ウイルス完全排除) 例からヒト SNPs 解析に用いる検体を収集した。次年度は、ヒト SNPs の解析結果もデータマイニング解析に順次投入する予定である。

D. 考察

データマイニング解析により、ペグインターフェロン・リバビリン療法の治療前効果判別アルゴリズムを構築した結果、強力な抗ウイルス効果を有する本療法では、ウイルス因子よりも生体因子が治療抵抗性因子として顕在化した。このデータマイニング解析結果に基づき宿主因子を均一化することにより、純粋なウイルス側の治療抵抗因子の解析が可能となる。さらに既知のウイルス側治療抵抗因子 (NS5A, Core) を均一化し、ヒト SNPs 解析の情報を統合することにより、網羅的な治療抵抗性要因の検討が可能になる。

E. 結論

データマイニング解析により、steatosis、LDL-cholesterol、年齢、gamma-GTP、および血糖値がペグインターフェロン・リバビリン療法の治療効果を規定する生体因子であることを示した。この情報は、ウイルス側の治療抵抗性機序解明の重要な基盤となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kurosaki M, Izumi N. External validation of

FIB-4: diagnostic accuracy is limited in elderly populations. *Hepatology*,47(1);352,2008

2. Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase level are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. *Journal of Hepatology* 2008 in press
3. Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. A Predictive Model of Response to Peginterferon Ribavirin in Chronic Hepatitis C using Classification and Regression Tree Analysis. in submission.

2. 学会発表

1. データマイニング解析による発癌予測。 C 型慢性肝炎における steatosis は、年齢、肝線維化、interferon 治療効果と独立した発癌危険因子であることの証明 第 43 回日本肝臓学会総会 肝臓 48 巻 Suppl. 1 PageA200
2. C 型慢性肝炎における PEG-IFN/ribavirin 併用療法の発癌抑止効果。従来型 IFN との比較 第 43 回日本肝臓学会総会 肝臓 48 巻 Suppl. 1 PageA159
3. 発癌からみた ALT 基準値内の C 型肝炎治療ガイドラインの検証。ALT、血小板は発癌予測因子であり、IFN 治療による ALT, AFP の制御は発癌リスクを減少させる 第 43 回日本肝臓学会総会 肝臓 48 巻 Suppl. 1 PageA104
4. C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法における HCV-RNA 陰性化時期と治療効果および治療期間の検討 第 43 回日本肝臓学

会総会肝臓 48 卷 Suppl. 1 PageA85

5. 各種ウイルス量測定法による治療中の HCV 動態。治療効果予測に最も有用な方法の検討
第 43 回日本肝臓学会総会 肝臓 48 卷 Suppl. 1
PageA82

6. データマイニング解析による
peginterferon /ribavirin 併用療法の治療
効果予測 第 43 回日本肝臓学会総会 肝臓 48
卷 Suppl. 1 PageA51

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

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）
分担研究報告書（平成 19 年度）

テーラーメイド治療を目指した肝炎ウイルスデータベース構築に関する研究

分担研究者：田中 靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科 臨床分子情報医学 准教授
研究協力者：新海 登 名古屋市立大学大学院医学研究科 消化器代謝内科学 大学院生

分担研究課題：B 型肝炎ウイルスの X、コアプロモーター遺伝子変異と肝発癌機序の解明

研究要旨：本邦の慢性B型肝炎キャリアのほとんどの症例は母親からの垂直感染により成立し、成人期にHBe抗原からHBe抗体へのセロコンバージョンをおこし、予後良好の無症候性キャリアへと移行する。一方、一部の症例においてはトランスアミナーゼの異常が持続し、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌へと移行する。これらの臨床経過の違いはB型肝炎ウイルス (HBV) 側の因子が大きく関与していると考えられる。今回、我々は臨床病態とウイルス変異の関係をより明らかにするために、本邦に広く分布し予後不良とされるHBV genotype C (HBV/C) 症例において、年齢、性別、HBe抗原陽性率をマッチさせた患者 (HCCグループ) 一対照 (non-HCCグループ) 研究を行った。発癌に寄与すると報告されているX領域～core promoter領域の全塩基配列を決定した結果、basic core promoter (BCP) の変異 (T1762/A1764) に alpha box 1653番目のCからTへの変異 (T1653) や 1753番目の変異が加わることにより肝癌発生に関与することを発見した。

A. 研究目的

東アジアにおいて大部分を占める genotype C の B 型肝炎キャリアのほとんどの症例は母親からの垂直感染により成立し、大部分が成人期に一過性に肝機能障害を起こすが、HBe 抗原から HBe 抗体への seroconversion をおこし、予後良好の無症候性キャリアへと移行する。一方、一部の症例においては seroconversion 後も肝機能障害が持続し、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌へと移行する。この違いに関して B 型肝炎ウイルス (HBV) 側の因子が関与していると考えられる。しかし、これまでのウイルス変異と臨床病態との関連にかかわる研究においては背景因子である年齢、性別、HBe 抗原の状態、HBV genotype 等に bias を認めた。これまでに我々は、HBe 抗原陰性例に限定して患者一対照研究を行った結果、basic core

promoter (BCP) の変異 (T1762/A1764) に alpha box 1653 番目の C から T への変異 (T1653) が加わることにより肝癌発生に関与することを発見している (Ito K et al., Clin. Infect. Dis. 2006)。そこで、新たに HBe 抗原陽性例も含めた患者一対照研究を設定し、各種臨床病態とウイルス変異の関係をより明らかにするために、発癌に寄与すると報告されている X 領域～core promoter 領域の全塩基配列を決定し、追加検討を行った。

B. 研究方法

対象患者は多数の施設との共同研究により、HBV genotype (C2) 感染肝細胞癌患者 80 例 (HCC グループ；年齢 55 歳、男性 68 例、HBe 抗原陽性 31 例) と年齢、性別、HBe 抗原陽性率、genotype をマッチさせた非肝癌患者 80 人 (non-HCC グル

ープ；年齢 54 歳、男性 67 例、HBe 抗原陽性 29 例) を対象とした。また、HBeAg 陽性群及び陰性群別にも解析を行った (文献)。

それぞれの症例に関して血清 100 μ l より血清中 DNA を抽出し、HBV の X 領域~core promoter 領域を nested PCR 法で増幅した。さらに PCR 産物を direct sequence 法により塩基配列を決定した。

C. 研究結果

HCC グループ (n=80) と non-HCC グループ (n=80) における臨床データを比較した結果 (表)、血小板のみが有意な因子で、HCC グループが non-HCC グループに対して有意に少なかった (10.7 ± 5.1 vs. 17.3 ± 5.1 ; $p < 0.0001$)。ウイルス変異に関しては、box α の C1653T 変異 (56% vs. 30%, $p=0.0013$) と basal core promoter の T1753V, A1762T/G1764A 変異は HCC グループが non-HCC グループに対して有意に多く見られた (50% vs. 24%, 91% vs. 73%; $p=0.0010$, $p=0.0035$)。HBe 抗原陽性例 (HCC 31 例 (53 歳)、non-HCC 29 例 (53 歳)) において box α の 1653T 変異は HCC グループが non-HCC グループに対して有意に多く見られ (52% vs. 24%; $p = 0.036$)、血小板は有意に低かった (10.6 ± 6.0 vs. 13.5 ± 5.3 ; $p = 0.0062$)。さらに、HBe 抗原陰性例 (HCC 49 例 (55 歳)、non-HCC 51 例 (54 歳)) においても box α の 1653T 変異、T1753V 変異、A1762T/G1764A 変異は HCC グループが non-HCC グループに対して有意に多く見られた (59% vs. 33%, 61% vs. 27%, 90% vs. 69%; $p=0.016$, $p=0.0012$, $p<0.0001$)。また、HCC グループでは、ALT が高く (76 ± 79 vs. 47 ± 73 ; $p=0.048$)、血小板は有意に少なかった (11 ± 4.5 vs. 19 ± 3.5 ; $p < 0.0001$)。次に、肝癌に対する予測因子を年齢、性別、HBe 抗原、ALT 値、HBV DNA 量、血小板数、1653 変異、1753 変異、1762/1764 変異、1896 変異などに関して多変量解析で検討した。結果は、血小板 10 万以下: [相対危険度 (95%信頼区間), P 値]=[24.39 (8.11-73.33), $p < 0.0001$], 1653 変異: [4.37 (1.53-12.48), $p=0.0059$],

1753 変異: [7.98 (2.54-25.10), $p=0.0004$] が予測因子として認められた。また、肝癌との関連性が報告されている G1613A 変異、X 蛋白の 36 番のスレオニンからプロリン、38 番のプロリンからセリンへのアミノ酸変異については両群間の頻度に差を認めなかった。

表. Clinical and virologic characteristics of patients infected with HBV endogetype C2/Cc who were matched for age, sex, and HBeAg status

Variable	Non-HCC (n=80)	HCC (n=80)	P
Age, mean years \pm SD	54 \pm 8	55 \pm 8	Matched
Male sex, no. (%) of patients	67 (84)	68 (85)	Matched
HBeAg positive, no. (%) of patients	29 (36)	31 (39)	Matched
ALT level, mean U/L \pm SD	66 \pm 99	85 \pm 133	0.31
HBV DNA, mean LGU/ml \pm SD	5.7 \pm 1.7	5.7 \pm 1.4	0.84
Platelet count, $\times 10^9$ platelets/mm ³ \pm SD	17.3 \pm 5.1	10.7 \pm 5.1	<.0001
Mutation in X region, no. (%) of patients			
T1479C (at36 T to P)	39 (49)	45 (56)	0.43
C1485T (at38 P to S)	18 (23)	22 (28)	0.58
G1499A	57 (71)	46 (58)	0.10
G1613A	25 (31)	32 (40)	0.32
C1653T (Mutation in the box α)	24 (30)	43 (56)	0.0013
T1753V (Mutation in the core promoter)	19 (24)	40 (50)	0.0010
A1762T/G1764A (Mutation in the core promoter)	58 (73)	73 (91)	0.0035
Mutation in the precore region, no. (%) of patients			
G1896A	41 (51)	43 (54)	0.8743

D. 考察

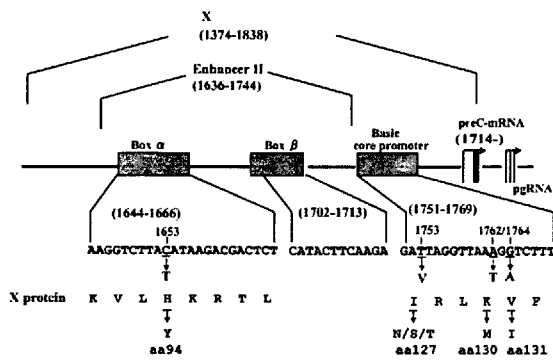
今回の患者一対照研究を行った結果、これまで肝癌への進展との関係が報告された 1762/1764 の basal core promoter の二重変異は、いずれの病態にも比較的高頻度に存在するため、多変量解析を行うと、有意な因子から外れた。むしろ、genotype C において A1762T/G1764A 変異は加齢に伴う現象と考えられた。また、これまでに肝癌症例において 1653 番目の C から T への変異および 1753 番目の T から C, A または G への変異を高頻度に認めるとの報告がなされている。今回の検討では HBe 抗原の有無により、有意な変異パターンが若干異なっていたが、多変量解析を行った結果、1653 変異、1753 変異が肝癌予測因子となり、これまでの報告を支持した。一方、1762/1764 の二重変異は肝癌の予測因子とはならなかったが、他の genotype と比較して悪性度の高い genotype C に高頻度に認められることから、必ずしも病態との関係を認めないというわけではなく、こうした変異を有する genotype C 自体が肝癌発生のハイリスクグループであると考えられた。

特に、1653 番はエンハンサーII の α box に位置しており、C から T への変異は TCTTACATAAGA から TCTTATATAAGA と変化し完全なパルンドローム構造となる。また完全ではないにしても TATA box と相似した配列となるため、各種転写因子との結合、エンハンサーとしての働きが増強

すると考えられる。実際に 1653 変異が肝癌組織で多く認めるとする報告もある。

最も重要な点は、X 蛋白による発癌への影響である。これまでに、X 遺伝子改変マウスでの肝癌発生を代表として、X 蛋白による転写修飾、DNA 修復阻害、プロテオソームなど蛋白分解系因子との相互作用による阻害、蛋白リン酸化シグナル伝達系の修飾など多岐な機能が報告されている。今回報告した 1653 の C から T への変異は X 蛋白の 94 番目のアミノ酸をヒスチジンからチロシンへ、1753 変異や 1762/1764 変異も X 蛋白のアミノ酸変異を伴うため (図)、複数の変異型 X 蛋白を介した発癌との関連も考えられる。

Fig. 1



E. 結論

1762/1764 変異に 1653 変異や 1753 変異が加わるにより肝癌の発生が増加すると考えられた。これらの変異を持つ HBV が感染している患者に対しては抗ウイルス療法を強く勧めるべきである。現在、種々の変異型複製クローンを作成し、細胞培養系及びヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて感染実験・機能解析を開始している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, Izumi N, Yatsunami H, Orito E, Joh T, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus X, core promoter mutations on

hepatocellular carcinoma among patients with subgenotype C. *J Clin Microbiol.* 45 (10) :3191-7. 2007.

2. Ito K, Tanaka Y, Kato M, Fujiwara K, Sugauchi F, Sakamoto T, Shinkai N, Orito E, Mizokami M. Comparison of Complete Sequences of Hepatitis B Virus Genotype C between Inactive Carriers and Hepatocellular Carcinoma Patients before and after Seroconversion. *J Gastroenterol.* 42 (10) :837-44. 2007.

3. Tanaka Y, Hanada K, Hanabusa H, Gojobori T, Mizokami M. Increasing Genetic Diversity of Hepatitis C Virus in Hemophiliacs with Human Immunodeficiency Virus Coinfection. *J Gen Virol.* 88 (Pt 9) :2513-9. 2007.

4. Yuen MF, Tanaka Y, Shinkai N, Poon RT, But DYK, Daniel Fong YT, Fung J, Wong DKH, Yuen JCH, Mizokami M, Lai CL. Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/ C, specific mutations of enhancer II/ core promoter/ precore regions and HBV DNA levels. *Gut*, 2007 in press.

5. Tanaka Y, Mizokami M. Genetic diversity of hepatitis B virus as an important factor associated with differences in clinical outcomes. *J Infect Dis.* 195 (1) :1-4. 2007.

6. Hanada K, Tanaka Y, Mizokami M, Gojobori T, Alter HJ. A reduction in selective immune pressure during the course of chronic hepatitis C correlates with diminished biochemical evidence of hepatic inflammation. *Virology.* 361:27-33, 2007.

2. 学会発表

1. Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, Izumi N, Yatsuhashi H, Orito E, Joh T, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus X₁ core promoter mutations on hepatocellular carcinoma among patients with subgenotype C2. 14th Japan-Korea Hepatitis Meeting. June 16-17 2007, Fukuoka.

2. Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, Izumi N, Yatsuhashi H, Orito E, Joh T, Mizokami M. Influence of hepatitis B virus X₁ core promoter mutations on hepatocellular carcinoma among patients with subgenotype C2. 17th APASL Conference. March 27-30 2007. Kyoto, Japan.

3. Mukaide M, Tanaka Y, Orito E, Yuen MF, Ito K, Kurbanov F, Sugauchi F, Asahina Y, Izumi N, Kato M, Lai CL, Ueda R, Mizokami M, et al. Specific Mutations in Enhancer II/Core Promoter of Hepatitis B Virus Subgenotypes C1/C2 Increase the Risk of Hepatocellular Carcinoma. 17th APASL Conference. March 27-30 2007. Kyoto.

4. 日下部篤宣、田中靖人、溝上雅史. パネルディスカッション 1: B 型肝炎急性増悪に対する方策. 早期治療介入を目指した B 型肝炎ウイルス因子の検討. 第 37 回日本肝臓学会西部会. 平成 19 年 12 月 7 日. 長崎.

5. 菅内文中、田中靖人、溝上雅史. パネルディスカッション 1: B 型肝炎急性増悪に対する方策. 免疫抑制・化学療法後に発生する B 型肝炎ウイルス再活性化に対する方策. 第 37 回日本肝臓学会西部会. 平成 19 年 12 月 7 日. 長崎.

6. 田中靖人, Yuen Man-Fung, 溝上雅史. パネルディスカッション 5: エンテカビル治療効果及び

耐性変異に関する検討. 第 11 回日本肝臓学会大会. 平成 19 年 10 月 18-19 日. 神戸.

G. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

III. 研究成果の刊行一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, Bartholomeusz A, Ghany MG, Pawlotsky JM, Liaw YF, Mizokami M, Kuiken C. Hepatitis B Virus Drug Resistance Working Group.	Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management.	Hepatology	46(1)	254-265	2007
Shin-I T, Tanaka Y, Tateno Y, Mizokami M.	Development and public release of a comprehensive hepatitis virus database.	Hepatol Res.	38 (3)	234-243	2008
Sakamoto T, Tanaka Y, Simonetti J, Osiowy C, Børresen ML, Koch A, Kurbanov F, Sugiyama M, Minuk GY, McMahon BJ, Joh T, Mizokami M.	Classification of hepatitis B virus genotype B into two major types based on characterization of a novel subgenotype in the Arctic indigenous populations.	J Infect Dis.	196(10)	1487-1492	2007
Yano Y, Truong BX, Seo Y, Kato H, Miki A, Tanaka Y, Mizokami M, Kagawa A, Miyazaki H, Azuma T, Kasuga M, Hayashi Y.	A Japanese case of hepatitis B virus genotypes C/D hybrid.	Hepatol Res.	in press.		2007
Kusakabe A, Tanaka Y, Orito E, Sugauchi F, Kurbanov F, Sakamoto T, Shinkai N, Hirashima N, Hasegawa I, Ohno T, Ueda R, Mizokami M.	A weak association between occult HBV infection and non-B non-C hepatocellular carcinoma in Japan.	J Gastroenterol.	42	298-305	2007
Nukaya H, Ohno T, Sakakibara K, Kato A, Hasegawa I, Matunaga S, Endo M, Tanaka Y, Hirashima N, Tanaka Y, Orito E, Joh T, Mizokami M.	Accidental exposure to HCV antibody-positive blood in hospital and pre-emptive one-shot interferon alpha-2b treatment.	Hepatol Res.	37(3)	179-185	2007
Fung J, Lai CL, Yuen JCH, Wong DKH, Tanaka Y, Mizokami M, Yuen MF.	Adefovir dipivoxil monotherapy and combination therapy with lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B in an Asian population.	Antiviral Therapy	12	41-46	2007
Sugiyama M, Tanaka Y, Sakamoto T, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Kato H, Nagao M, Miyakawa Y, Mizokami M.	Early Dynamics of Hepatitis B Virus in Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes Mono- or Coinfected with Genotype G.	Hepatology	45(4)	929-937	2007

Nakagawa S, Niimura Y, <u>Gojobori T</u> , Tanaka H, Miura K.	Diversity of preferred nucleotide sequences around the translation initiation codon in eukaryote genomes.	Nucleic Acids Res.	36(3)	861-871	2008
Matsuya A, Sakate R, Kawahara Y, Koyanagi KO, Sato Y, Fujii Y, Yamasaki C, Habara T, Nakaoka H, Todokoro F, Yamaguchi K, Endo T, Oota S, Makalowski W, Ikeo K, Suzuki Y, Hanada K, Hashimoto K, Hirai M, Iwama H, Saitou N, Hiraki AT, Jin H, Kaneko Y, Kanno M, Murakami K, Noda AO, Saichi N, Sanbonmatsu R, Suzuki M, Takeda J, Tanaka M, <u>Gojobori T</u> , Imanishi T, Itoh T.	Evola: Ortholog database of all human genes in H-InvDB with manual curation of phylogenetic trees.	Nucleic Acids Res.	36(Database issue)	D787-792	2008
Tateno Y, Sugawara H, Ogasawara O, Okubo K, <u>Gojobori T</u> .	DDBJ with New System and Face.	Nucleic Acids Res.	36(Database issue)	22-24	2008
Makino T, <u>Gojobori T</u> .	Evolution of Protein-Protein Interaction Network. Gene and Protein Evolution.	Genome Dynamics	3	13-29	2007
Kubota R, Hanada K, Arimura K, Osame M, <u>Gojobori T</u> , Izumo S.	Genetic Stability of Human T Lymphotropic Virus Type I despite Antiviral Pressures by CTLs.	Journal of Immunol.	178(9)	5966-5972	2007
Liu QX, Nakashima-Kamimura N, Ikeo K, Hirose S, <u>Gojobori T</u> .	Compensatory Change of Interacting Amino Acids in the Coevolution of Transcriptional Coactivator MBF1 and TATA-Box Binding Protein TBP.	Mol. Biol. Evol.	24(7)	1458-1463	2007
Osato N, Suzuki Y, Ikeo K, <u>Gojobori T</u> .	Transcriptional interferences in cis natural antisense transcripts of human and mouse.	Genetics	176	1299-1306	2007
Takeda JI, Suzuki Y, Nakao M, Kuroda T, Sugano S, <u>Gojobori T</u> , Imanishi T.	H-DBAS: Alternative Splicing Database of Completely Sequenced and Manually Annotated Full-length cDNAs Based on H-Invitational.	Nucleic Acids Res.	35 (Database issue)	D104-109	2007

西田奈央、 徳永勝士。	大規模 SNP タイピングによる多因子疾患遺伝子の探索	実験医学	Vol.25(2)	62-68	2007
Nishida N, Tanabe T, Takasu M, Suyama A, Tokunaga K.	Further development of multiplex single nucleotide polymorphism typing method, the DigiTag2 assay	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY	364	78-85	2007
西田奈央 徳永勝士。	ゲノムワイド関連分析による多因子疾患遺伝子の探索	肝疾患 Review	in press		
Takao Y, Yamada A, Yutani S, Ono T, Nagao Y, Ando E, Ide T, Itoh K, Sata M.	Serum levels of IgG to the peptide of HCV1b core at positions 35-44 correlated with persistent infection, while levels of IgG to the peptide of NS5A at positions 2132-2140 correlated with better prognosis in HCV-infected patients.	Med Microbiol Immunol.	196	157-164	2007
Kawaguchi T, Ide T, Taniguchi E, Hirano E, Itou M, Sumie S, Nagao Y, Yanagimoto C, Hanada S, Koga H, Sata M.	Clearance of HCV improves insulin resistance, Beta-cell function, and hepatic expression of insulin receptor substrate 1 and 2.	Am J Gastroenterol.	102	570-576	2007
Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Sumie S, Oriishi T, Matsuoka H, Nagao Y, Sata M.	Branched-chain amino acids improve insulin resistance in patients with hepatitis C virus-related liver disease: report of two cases.	Liver Int.	27	1287-1292	2007
Nagao Y, Myoken Y, Katayama K, Tanaka J, Yoshizawa H, Sata M.	Epidemiological survey of oral lichen planus among HCV-infected inhabitants in a town in Hiroshima Prefecture in Japan from 2000 to 2003.	Oncol Rep	18	1177-1181	2007
Nagao Y, Kawasaki K, Sata M.	Insulin resistance and lichen planus in patients with HCV-infectious liver diseases.	J Gastroenterol Hepatol		in press	2008
Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Teramoto R, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Ueda T, Kamijo K, Kaneko S.	Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the human hepatocellular carcinoma.	Biochem Biophys Res Commun.	366(1)	186-192	2008
Aburatani S, Sun F, Saito S, Honda M, Kaneko S, Horimoto K.	Gene systems network inferred from expression profiles in hepatocellular carcinogenesis by graphical gaussian model.	EURASIP J Bioinform Syst Biol.		47214	2007
Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S.	Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet.	Hepatology	46(5):1	392-403	2007

Oishi N, Shilagardi K, Nakamoto Y, <u>Honda M</u> , Kaneko S, Murakami S.	Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells.	Cancer Sci.	98(10)	1540-1548	2007
Takamura T, <u>Honda M</u> , Sakai Y, Ando H, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Misu H, Kurita S, Matsuzawa-Nagata N, Uchikata M, Nakamura S, Matoba R, Tanino M, Matsubara K, Kaneko S.	Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes.	Biochem Biophys Res Commun.	361(2)	379-384	2007
Komura T, Mizukoshi E, Kita Y, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Ohta T, Shimizu K, Nakamoto Y, <u>Honda M</u> , Takamura T, Kaneko S.	Impact of diabetes on recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical treatment in patients with viral hepatitis.	Am J Gastroenterol.	102(9)	1939-1946	2007
Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, <u>Honda M</u> , Kaneko S, Wakita T, Chayama K.	Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon.	FEBS Lett.	581(10)	1983-1987	2007
Tateno M, <u>Honda M</u> , Kawamura T, Honda H, Kaneko S.	Expression profiling of peripheral-blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C undergoing interferon therapy.	J Infect Dis.	195(2)	255-267	2007
<u>Kurosaki M</u> , Izumi N.	External validation of FIB-4: diagnostic accuracy is limited in elderly populations	Hepatology	47 (1)	352	2008
<u>Kurosaki M</u> , Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N.	The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase level are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy	J of Hepatology		In press	2008
<u>Kurosaki M</u> , Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N.	A Predictive Model of Response to Peginterferon Ribavirin in Chronic Hepatitis C using Classification and Regression Tree Analysis. in submission.			In submission	
Ito K, <u>Tanaka Y</u> , Kato M, Fujiwara K, Sugauchi F, Sakamoto T, Shinkai N, Orito E, Mizokami M.	Comparison of Complete Sequences of Hepatitis B Virus Genotype C between Inactive Carriers and Hepatocellular Carcinoma Patients before and after Seroconversion.	J Gastroenterol..	42(10)	837-844	2007

Shinkai N, <u>Tanaka Y</u> , Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, Izumi N, Yatsushashi H, Orito E, Joh T, Mizokami M.	Influence of hepatitis B virus X, core promote mutations on hepatocellular carcinoma among patients with subgenotype C	J Clin Microbiol.	45(10)	3191-3197	2007
<u>Tanaka Y</u> , Hanada K, Hanabusa H, Kurbanov F, Gojobori T, Mizokami M.	Increasing Genetic Diversity of Hepatitis C Virus in Hemophiliacs with Human Immunodeficiency Virus Coinfection.	J Gen Virol.	88(Pt 9)	2513-2519	2007
Yuen MF, <u>Tanaka Y</u> , Shinkai N, Poon RT, But DYK, Daniel Fong YT, Fung J, Wong DKH, Yuen JCH, Mizokami M, Lai CL.	Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/ C, specific mutations of enhancer II/ core promoter/ precore regions and HBV DNA levels.	Gut	57	98-102	2008
<u>Tanaka Y</u> , Mizokami M.	Genetic diversity of hepatitis B virus as an important factor associated with differences in clinical outcomes.	J Infect Dis.	195(1)	1-4	2007
Hanada K, <u>Tanaka Y</u> , Mizokami M, Gojobori T, Alter HJ.	A reduction in selective immune pressure during the course of chronic hepatitis C correlates with diminished biochemical evidence of hepatic inflammation.	Virology	361	27-33	2007