

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

研究分担者：黒崎雅之 武蔵野赤十字病院 消化器科 部長

分担研究課題：C型慢性肝炎に対するPEG-IFN・RBV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：1b型高ウイルス量のC型慢性肝炎に対する唯一の根治療法であるペグインターフェロン・リバビリン併用療法の治療抵抗性の解明には、ウイルス学的因子、宿主因子、治療因子について、それぞれ他の因子の背景を揃えた解析が必要である。本研究ではデータマイニングを用いた網羅的解析により治療抵抗性要因を探索した。その結果、NS5A遺伝子変異、年齢、AFP、Coreアミノ酸置換の組み合わせにより、SVRの確率が10%しか期待できない難治症例、および72%期待できる治療感受性症例を同定することが可能であった。一般検査に加えてHCV遺伝子検査を説明変数に投入して解析することにより、予想精度は向上した。本解析により現時点で入手可能な臨床情報、ウイルス学的情報に基づいた治療効果予測アルゴリズムが構築できたが、更なる予測精度の向上のためには、治療抵抗性にかかわるHCV遺伝子構造の詳細な検討が必要であり、それ以上に宿主因子の解析が必要である。SNPs解析により得られる情報を統合して解析することにより更なる予測精度の向上が期待される。最終的にはSNPs解析も含めた多彩な情報に基づく治療効果予測をデータマイニング解析によるdecision tree modelで臨床の場にはわかりやすく提示し、患者個人の状態に対応したオーダーメイド医療の実現に展開したいと考える。

A. 研究目的

1b型高ウイルス量のC型慢性肝炎に対する唯一の根治療法であるペグインターフェロン・リバビリン併用療法では、約半数の症例でウイルス学的著効（SVR）が得られる。最終的な治療効果を予測する最も確実な方法は、治療中のHCV陰性化時期のモニターであるが、治療前に的確に効果を予測する方法は確立していない。この治療法は副作用や経済的負担も少なくないために、治療を開始する前に治療効果を予測することが重要である。しかしながら、治療効果を規定する因子は明らかではなく、必然的に現時点では治療前の効果予測は困難である。治療抵抗性にはウイルス学的因子、宿主因子、治療因子がかかわるが、それぞれを解析するためには、他の因子の背景を揃えた解析が必要である。本研究ではデータマイニング解析を用いることにより、従来の統計手法では困難であった治療効果に関連するウイルス、生体、治療の要因を階層化し、それぞれの要因の背景を均一化した集団で、最も重要な因子を探索することを目的とした。

B. 研究方法

武蔵野赤十字病院でペグインターフェロン・リバビリン併用療法を行った1b型高ウイルス量のC型慢性肝炎症例256例を対象とし、臨床背景（年齢、性別、身長、体重、BMI）、肝生検所見（Activity、Fibrosis、Steatosis）、一般血液検査（血算（Hb、WBC、Plt）、生化学（TP、Alb、Cre、AST、ALT、GGT、T.Chol、HDL-Chol、LDL-Chol、TG、Glu、AFP）、

ウイルス学的検査（HCVRNA量、NS5A変異数、Core70アミノ酸置換、Core91アミノ酸置換）、薬剤投与量（PEGIFN投与量、RBV投与量）を説明因子として、ウイルス学的著効と関連する因子について、SPSS Clementine 12.0のアルゴリズムC5.0を用いてデータマイニング解析を行なった。

C. 研究結果

全体のウイルス学的著効（SVR）率は40%であった。年齢と性別のみを用いた解析では、年齢60歳未満、性別が男性であることが治療効果と関連する因子であり、若年男性で最もSVR率が高く（63%）、高齢女性で最も低かった（20%）。

これに一般血液検査を加えて解析すると、年齢は有意な因子として残ったが性別は選択されず、60歳未満の若年者においてはLDLコレステロールが100mg/dl未満であること、血小板数が16万以上であること、60歳以上の高齢者においてはAFPが4未満であることが有意な治療効果関連因子として抽出された。60歳未満でLDLコレステロールが100mg/dl以上で最もSVR率が高く（68%）、次が若年でLDLコレステロールは100mg/dl未満だが血小板数が16万以上であり（56%）、最もSVR率が低かったのが高齢でAFP値が4ng/ml以上であった（18%）。

これにHCVNS5A遺伝子変異解析と肝組織検査所見を加えて解析すると、NS5A変異数が最も重要な因子であり、ついで脂肪肝化により治療効果が大きく異なることが示された。最も治療効果が高いのはNS5A変異が1箇所以上存在する60歳未満の若年者（72%）であり、次は60歳以上の高齢だ

が NS5A 変異が 1 箇所以上存在し、かつ肝脂肪化がない症例であった (50%)。最も SVR 率が低いのは NS5A 遺伝子に変異がなく、10%以上の肝細胞に脂肪化が見られる症例であった (19%)。

さらに HCVCore アミノ酸置換の有無を加えて解析すると、NS5A 遺伝子変異、年齢、AFP、Core アミノ酸置換が有意な因子として最終的に抽出された。最も SVR 率が高いのは NS5A 変異が 1 箇所以上存在する 60 歳未満の若年者 (72%) であることは同様だが、二番目に SVR 率が高かったのは 60 歳以上の高齢だが NS5A 変異が 1 箇所以上存在し、かつ Core70 のアミノ酸に変異がない症例であった (41%)。同様の条件で Core アミノ酸変異が存在すると SVR 率は 18%に低下した。最も SVR 率が低いのは NS5A 遺伝子に変異がなく、AFP が 20 以上の症例であるが (10%)、NS5A 遺伝子に変異がなくても AFP が 20 未満であれば SVR 率は 31% であり、さらに Core91 のアミノ酸に変異がなければ SVR 率は 35%まで上昇した。

D. 考察

AFP は従来は腫瘍マーカーとして測定されているが、正常範囲内の 4 を cutoff として治療効果との関連が示された。AFP は組織学的線維化進行度と有意に相関しており、線維化 stage の鋭敏なマーカーである可能性が考えられた。また LDL コレステロールと治療効果との関連性を論理的に説明することは現時点では困難であるが、脂質代謝と C 型肝炎ウイルス増殖は密接に関連することから、未知の治療抵抗性メカニズムが存在する可能性が考えられる。Steatosis はインスリン抵抗性と関連しており、インスリン抵抗性は細胞内インターフェロニンシグナル伝達抑制因子である SOCS の発現を誘導することにより治療効果を減弱させることが証明されている。

今回の検討により、ウイルス遺伝子解析を加味することにより、治療効果をより精密に予測できることが示された。特に NS5A 遺伝子変異は SVR と関連し、Core 遺伝子変異は非 SVR と関連することが示された。従来高齢女性での SVR 率の低さが問題と考えられてきたが、年齢と性別を用いた分類では、症例の SVR 率の分布は 20-63% であるのに対し、すべての因子を投入した解析では、10-72% までと予測 SVR 率の range は広がった。このように新たな治療効果関連因子の解明と、それらを統合的に組み込んだデータマイニング解析により、治療前の精密な効果予測が可能になると考えられる。

現時点では治療抵抗性に関連した宿主因子は解明されていないが、当研究班の SNPs 解析により有意な宿主因子が同定されれば、治療効果予測の精度はさらに向上すると期待される。またデータマイニングによる decision tree model は、SNPs を含めた多彩な情報を臨床の場にわかりやすく提示する上で極めて有用な方法であり、患者個人の臨床情報に対応したオーダーメイド医療の実現において重要な役割を果たす可能性があ

る。

E. 結論

データマイニング解析により、ウイルス、宿主、治療の各因子を統合して解析することが可能である。今回の解析により、現時点で入手可能な臨床情報、ウイルス学的情報に基づいた治療効果予測アルゴリズムを構築した。SNPs 解析により得られた情報と統合することにより更なる予測精度の向上が期待され、最終的には臨床医療への還元を目標とする。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *J Hepatol* 2008;48:736-42.
- 2) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology* 2008; 134:1396-405.
- 3) Kurosaki M, Izumi N. External validation of FIB-4: diagnostic accuracy is limited in elderly populations. *Hepatology*, 2008. 47(1):352
- 4) 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) 黒崎雅之他. 第 43 回日本肝臓学会総会 長期予後改善を目標とした B 型肝炎の治療: 発癌リスク因子のデータマイニング解析および核酸アナログ治療効果の検討 2008.
- 2) 黒崎雅之他. 第 43 回日本肝臓学会総会 Peg-IFN/RBV 併用療法の治療前効果予測: データマイニング解析による予測アルゴリズムの構築と検証 2008.
- 3) 細川貴範, 黒崎雅之他. 第 43 回日本肝臓学会総会 データマイニング解析による発癌予測: C 型肝炎における steatosis は、年齢、肝線維化、インターフェロン治療効果とは独立した発癌危険因子である 2008

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
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）
研究報告書（平成20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

研究分担者：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
研究協力者：佐田通夫 同大学医学部内科学講座消化器内科部門 教授
同大学医学部消化器疾患情報講座 教授

分担研究課題： 口腔扁平上皮癌患者における HCV と重複癌の検討

研究要旨：口腔扁平上皮（SCC）患者は、消化器癌（食道癌、胃癌、大腸癌）の中でC型肝炎ウイルス（HCV）感染率が高く、コントロール患者より有意にHCV感染率が高率である。このことは、国内多施設共同研究によっても証明された。また、HCV感染患者の口腔SCC組織において、+鎖及び-鎖のHCV RNが検出される。本研究では、HCVの肝外病変の一つである口腔SCC癌におけるHCV感染と重複癌について検討した。対象は、1992年～1994年に口腔SCCを発症し、初めて久留米大学病院を受診し入院加療した患者60例。観察期間は、久留米大学初診から最終再来日まで（2008年10月17日直近日）。レトロスペクティブにカルテを調査すると共に、全診療科から提出された病理組織学診断を確認した。口腔SCC患者60例において、多重重複癌発生率は35%（21/60）、HCV抗体陽性率は26.7%（16/60）であった。HCV抗体陽性者における多重重複癌発生率（62.5%）は、HCV抗体陰性者（25%）よりも有意に高率であった。HCV抗体陽性者における多重重複癌として最も認められた臓器は肝臓（肝細胞癌）であり、HCV抗体陰性者では胃（腺癌）であった。多変量解析により重複癌発生に関わる因子は、Stage IV、HCV抗体陽性、70歳以上の年齢層。HCV感染のある口腔SCC患者では、とくに多重重複癌について注意深く経過観察する必要がある。

A. 研究目的

口腔扁平上皮（SCC）患者は、消化器癌（食道癌、胃癌、大腸癌）の中でHCV感染率が高く（24%）、コントロール患者より有意にHCV感染率が高率である（Nagao Y, Sata M et al: J Oral Pathol Med 1995）。このことは、国内多施設共同研究（北大・神奈川がんセンター・日大・熊本大・久留米大）においても、頭頸部 SCC 患者は、コントロール患者よりも有意にHCV感染率が高率で

あることがわかっている（Nagao Y, Sata M et al: Hepatol Res 1997）。

一方、1974年～1995年までの口腔SCC患者327例における多重重複癌例は57例（17.4%）であり、その重複臓器は胃に続き、肝臓が第2位である。重複癌患者のHCV感染率（36.7%）は、口腔単発癌の感染率（22.8%）と比べ高く、コントロール（9.9%）より有意に高率である（Nagao Y, Sata M et al: Hepatol Res 1997）。

さらに、HCV感染者の口腔SCC組織において、（+）鎖及び（-）鎖のHCV RNAの存在を確認した

(Nagao Y, Sata M et al: Am J Gastroenterol 1998) (Nagao Y, Sata M et al: J Oral Pathol Med 2000)。

頭頸部 SCC は、全身の癌を母集団とした場合に比較して、有意に多重複癌の発症率が高い。また、頭頸部における多重複癌例は、年々増加している。一方、口腔 SCC は、HCV 感染が引き起こす肝外病変である。

本調査では、1992 年～1994 年に口腔 SCC を発症し、初めて久留米大学病院を受診し入院加療した患者 60 例について、HCV 感染者と非感染者における重複癌について検討した。

B. 研究方法

全対象患者は、初診時もしくは入院時に上部消化管検査、腹部エコー検査、生化学検査、肝炎ウイルスマーカーが検査された。

重複癌発生の観察期間は、久留米大学初診から最終再来日まで (2008 年 10 月 17 日直近日) とした。レトロスペクティブにカルテを調査すると共に、全診療科から提出された病理組織学的診断を確認した。

重複癌の定義は、(i) 個々の腫瘍は、明らかに悪性像を呈する、(ii) 個々の腫瘍は、別個に存在する、(iii) 一方の腫瘍は、他方からの転移ではないとした。第 1 癌と第 2 癌の診断間隔が 6 ヶ月未満を同時性、6 ヶ月以上を異時性とした。口腔内に複数の腫瘍が多発した場合は、同じ組織型は口腔多発癌、異なる組織型は重複癌とし、今回の検討では口腔多発癌は除外した。

(倫理面への配慮)

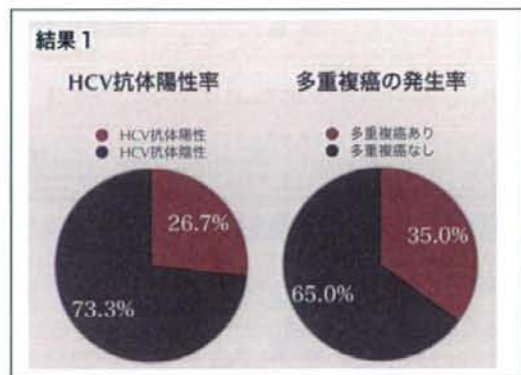
本調査は、久留米大学病院を受診した患

者が、治療の一環として受けたカルテを基に調査を行なったものであり、本研究のために新たに検査を実施したものではない。

C. 研究結果

口腔 SCC 患者 60 例において、多重複癌の発生率は 35% (21/60)、HCV 抗体陽性率は 26.7% (16/60) であった (図 1)。

図 1



HCV 抗体陽性者における多重複癌発生率 (62.5%) は、HCV 抗体陰性者 (25%) よりも有意に高率であった (表 1)。HCV 抗体陽性者における多重複癌として最も多く認められた臓器は肝臓であり、HCV 抗体陰性者では胃であった。

表 1

結果 2 HCV 感染有無による重複癌の発生

| | HCV 抗体陽性 n=44 (%) | HCV 抗体陰性 n=16 (%) | P value |
|-------------|----------------------|----------------------|---------|
| 年齢 | 64.3±14.5 | 66.7±11.0 | NS |
| 男性・女性 | 30・14 | 9・7 | NS |
| 発生数 | 11 (25.0) | 10 (62.5) | P<0.01 |
| 重複癌 発生臓器 | 胃 | 肝臓 | 5 |
| | 食道 | 大腸 | 2 |
| | 皮膚 | 肺 | 1 |
| | 甲状腺 | 甲状腺 | 1 |
| | 唾液腺 | AML | 1 |
| | 腎臓 | | |
| 発生時期 | 同時性 4、異時性 4 | 同時性 1、異時性 3 | |

* 統計学上有意差を示す (Fisher's exact test, P<0.05)

重複癌 21 例と口腔単発癌 39 例における有意な因子は、肝疾患の既往歴、輸血歴、HCV 抗体陽性

率であった(表 2, 3)。

表2

| 結果3 頭頸部SCC患者60例の背景因子 | | | | |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|---------|
| | Total n=60(%) | 重複癌 n=21(%) | 単発癌 n=39(%) | P value |
| 年齢 | 64.8±13.7 | 67.3±11.9 | 63.4±14.4 | NS |
| 男性・女性 | 39・21 | 15・6 | 24・15 | NS |
| Stage I | 15(25.0) | 4(19.0) | 11(28.2) | NS |
| Stage II | 24(40.0) | 6(28.6) | 18(46.2) | |
| Stage III | 6(10.0) | 2(9.3) | 4(10.3) | |
| Stage IV | 15(25.0) | 9(42.9) | 6(15.4) | |
| 観察日数(日) | 29146±15367 | 35123±13550 | 26755±14579 | NS |
| 肝疾患の既往歴 | あり 14 なし 11 不明 3 | あり 9 なし 2 不明 0 | あり 12 なし 1 不明 1 | P<0.01 |
| 糖尿病 | あり 7 なし 48 不明 5 | あり 11 なし 10 不明 0 | あり 11 なし 7 不明 3 | P<0.05 |
| 飲酒歴 | あり 29 なし 29 不明 2 | あり 18 なし 3 不明 0 | あり 19 なし 19 不明 1 | NS |
| 喫煙歴 | あり 24 なし 34 不明 2 | あり 10 なし 11 不明 0 | あり 14 なし 21 不明 2 | NS |

表3

| 結果4 頭頸部SCC患者60例の血液検査 | | | | |
|----------------------|------------------|----------------|----------------|---------|
| | Total n=60(%) | 重複癌 n=21(%) | 単発癌 n=39(%) | P value |
| AST | 31.1 ± 23.5 | 34.6 ± 22.4 | 29.1 ± 24.1 | NS |
| ALT | 19.5 ± 18.5 | 22.7 ± 15.4 | 17.7 ± 19.9 | NS |
| ALP | 15.6 ± 2.0 | 33.2 ± 2.1 | 7.1 ± 1.9 | NS |
| γGTP | 23.4 ± 20.5 | 25.5 ± 18.7 | 22.3 ± 21.3 | NS |
| LDH | 337.1 ± 66.8 | 351.1 ± 56.5 | 330.4 ± 70.8 | NS |
| TP | 7.6 ± 0.5 | 7.7 ± 0.5 | 7.6 ± 0.5 | NS |
| Alb | 4.0 ± 0.4 | 3.9 ± 0.3 | 4.0 ± 0.4 | NS |
| Insulin | 11.9 ± 9.4 | 14.1 ± 9.0 | 10.8 ± 9.5 | NS |
| 血糖値 | 90.9 ± 40.6 | 89.8 ± 19.3 | 91.5 ± 47.7 | NS |
| HCV抗体陽性 | 16(26.7) | 10(47.6) | 6(15.4) | P<0.01 |
| HCV RNA陽性 | 13(21.7) | 7(33.3) | 6(15.4) | NS |
| HBsAg陽性 | 1(1.7) | 0(0) | 1(2.6) | NS |
| HBe抗体陽性 | 39(65.0) | 14(66.7) | 25(64.1) | NS |

多変量解析により重複癌発生に関わる因子は、Stage IV、HCV抗体陽性、70歳以上の年齢層であった(図2)。

図2

| 多変量解析による 重複癌発生因子 | | | |
|------------------|--|---------------|----------|
| | Adjusted odds ratio (95% confidence interval) | P value | |
| Stage IV | 15.50 | (0.39 - 2.58) | P=0.0124 |
| HCV抗体陽性 | 13.45 | (0.50 - 2.30) | P=0.0039 |
| 70歳以上 | 4.46 | (0.04 - 1.56) | P=0.0480 |

D. 考察

わが国で1997年~2001年までに全国で病理解剖された症例総数は134,997例であり、このうち舌癌剖検症例は321例である。321例中、多重複発癌率は35.2%(113/321)で、発生臓器は、肺、肝臓、食道、甲状腺等と報告されている。国内における舌癌剖検症例の重複臓器の第2位が肝臓であることから、HCVと口腔SCCは強い関連があることが推測された。

今回の結果により、HCV感染のある口腔SCC患者では、とくに多重複癌について注意深く経過観察する必要がある。一方、HCV感染者においても肝疾患以外の疾患について診査すべきである。

E. 結論

HCV感染のある口腔SCC患者は、HCV感染のない患者に比べ、高率に多重複癌を発生した(62.5%, P<0.01)。HCV抗体陽性者における多重複癌として最も多く認められた臓器は肝臓であり、HCV抗体陰性者では胃であった。口腔SCC患者は、HCV感染の有無だけでなく多重複癌についてスクリーニングする必要がある。HCV感染者においても、前癌病変である扁平苔癬が認められることが多く、口腔悪性腫瘍の有無についてスクリーニングを実施した方がよい。

F. 研究発表

論文発表

- Nagao Y, Kawasaki K, Sata M. Insulin resistance and lichen planus in patients with HCV-infectious liver diseases. J Gastroenterol Hepatol 2008; 23: 580-585.
- Nagao Y, Matsuoka H, Kawaguchi T, Ide T, Sata M. HBV and HCV infection in

Japanese dental care workers. Int J Mol Med 2008; 21: 791-799.

3. Kawaguchi T, Nagao Y, Matsuoka H, Ide T, Sata M. Branched-chain amino acid-enriched supplementation improves insulin resistance in patients with chronic liver disease. Int J Mol Med 2008; 22: 105-112.
4. Nagao Y, Hiromatsu Y, Nakashima T, Sata M. Graves' ophthalmopathy and tongue cancer complicated by peg-interferon α -2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C: A case report and review of the literature. Molecular Medicine Reports 2008; 1: 625-631.
5. Nagao Y, Kawakami Y, Yoshiyama T, Sata M. Analysis of factors interfering with the acceptance of interferon therapy by HCV-infected patients. Med Sci Monit 2008; 14: 45-52.
6. 長尾由実子, 川口 巧, 井出 達也, 佐田 通夫. HCV あるいは HBV 感染者における歯科治療時の自己申告調査. 感染症誌 2008; 82: 213-219.
7. 長尾由実子, 佐田通夫. 日常診療に必要なウイルス肝炎の知識と対策. A 型肝炎の現況と予防. 臨床と研究 2008; 85: 964-968.
8. 長尾由実子, 佐田通夫. C型肝炎ウイルス感染者に対するインターフェロン治療の状況-患者と医師のアンケート調査から-. HCV News letter 2008; 3: 1-4.
9. 長尾由実子. HCV 感染者におけるインターフェロン治療の実態調査-肝臓専門医と非専門医の違い-. 第5回肝臓

病研究会シンポジウム記録集 2008; 12-16.

10. 長尾由実子, 今福信一, 佐田通夫. 肝臓病の方の皮膚や粘膜には、さまざまな症状が現れます。とくにインターフェロン治療中には注意が必要です。-肝臓病と皮膚・粘膜の病気-. 肝外病変シリーズ 2008; 2: 1-22.
11. 長尾由実子, 佐田通夫. 患者さんの質問に答える 慢性肝疾患診療改訂 2版. 南山堂 東京 1-203 頁.
12. 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 追補版. 進行医学出版社 東京 1-132 頁.

G. 知的所得権の所得状況

なし

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

研究分担者：田中靖人 名古屋市立大学大学院 医学研究科 臨床分子情報医学分野 准教授

分担研究課題：B型肝炎ウイルス全ゲノムにおける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)―対照(non-HCCグループ)研究を行った。全塩基配列を決定した結果、X領域の1497の変異TからVへの変異(T1497V)、Xかつbox α 領域の1653番目のCからTへの変異(C1653T)、Xかつbasic core promoter (BCP) 領域の1753番目の変異TからVへの変異(T1753V)が肝癌発生に関与することを発見した。

共同研究者氏名
新海登、溝上雅史

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―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)。さらに、新たにHBe抗原陽性例も含めた患者―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、追加検討を行ったところ、やはり肝癌の患者群において非肝癌の患者群に対して basic core promoter (BCP) の (A1762T/G1764A) の変異は多い傾向にあったが有意な差を認めなかったのに対して、X かつ box α 領域の C1653T 変異と X かつ BCP 領域の T1753V 変異が肝癌患者群において非肝癌患者群に比べて単変量解析にて有意に多くみられ、多変量においても C1653T 変異と T1753V 変異は肝癌の予測因子であった (Shinkai N et al., J Clin Microbiol. 2007)。しかしながら HBV のゲノム変異と肝癌の関連については、X 領域～core promoter 領域以外にも preS 欠失と肝癌の関連等が報告されているため、HBV の全領域について肝癌との関連をみるのが重要と考え今回検討した。

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 76 例 (HCC グループ; 年齢 54 歳、男性 64 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 77 人 (non-HCC グループ; 年齢 53 歳、男性 63 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 の全領域を 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=76) と non-HCC グループ (n=77) 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 (10.5 ± 5.1 vs. 15.5 ± 5.0 ; $p < .0001$)。

ウイルス変異に関しては、1. PreS2 領域の欠失 (26% vs. 13%; $p=0.043$)。2. S 領域の C373T 変異 (18% vs. 6%)。3. Polymerase 領域の C934A 変異 (70% vs. 6%; $p=0.031$)。4. X 領域の T1497V 変異 (28% vs. 8%; $p=0.0014$)。5. X 領域かつ box α の C1653T 変異 (54% vs. 32%; $p=0.0039$)。6. X 領域かつ BCP の T1753V, A1762T/G1764A 変異 (50% vs. 29%, 92% vs. 75%; $p=0.0081$, $p=0.0078$) が HCC グループにおいて non-HCC グループに対して有意に多く見られた。HBe 抗原陽性例に限定して検討すると (HCC 30 例、non-HCC 29 例)、1. Polymerase 領域の C934A 変異 (73% vs. 45%; $p=0.035$)。2. X 領域の T1497V 変異 (40% vs. 7%; $p=0.0035$) が HCC グループにおいて non-HCC グループに対して有意に多く見られた。また、コアの欠失は HCC グループにおいては non-HCC グループに比べて有意に頻度が低かった。(7% vs. 28%; $p=0.042$)。血小板は HCC グループにおいては non-HCC グループに比べて有意に低かった (10.7 ± 6.2 vs. 13.5 ± 5.3 ; $p=0.0062$)。さらに、HBe 抗原陰性例に限定して検討すると (HCC 46 例、non-HCC 48 例)、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 (61%

vs. 35%, 91% vs. 73%; $p=0.022$, $p=0.031$)。血小板は 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 ± 4.3 vs. 17 ± 4.4 ; $p < 0.0001$)。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、PreS2 欠失、373 変異、934 変異、197 変異、1653 変異、1753 変異、1762/1764 変異、に関して多変量解析で検討した。結果は、血小板 13 万以下: [相対危険度 (95% 信頼区間)、 P 値] = [10.24 (4.075–25.721), $p < 0.0001$]、1497 変異: [5.778 (1.50–22.23), $p=0.0109$]、1653 変異: [3.38 (1.34–8.54), $p=0.0101$]、1753 変異: [3.29 (1.31–8.30), $p=0.0115$] 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。PreS 欠失においても肝癌に関連するとの報告はあり、本研究においても単変量にて肝癌有意に多く PreS2 欠失を認めているものの多変量解析では肝癌の予測因子とならなかった。

HBV genotype C の非型慢性肝炎患者 152 例の臨床データとウイルス変異

| 変異因子 | non-HCC (n=77) | HCC (n=75) | P |
|--|----------------|------------|---------|
| 年齢 | 52 ± 8 | 54 ± 8 | Notched |
| 男性 (%) | 63 (82) | 64 (85) | Notched |
| HBe 抗原陽性率 (%) | 29 (38) | 31 (41) | Notched |
| ALT 値 (U/L) | 72 ± 100 | 62 ± 126 | NS |
| HBV DNA 量 (IU/ml) | 5.7 ± 1.7 | 5.7 ± 1.4 | NS |
| 血小板数 ($\times 10^4$ platelets/ μ l) | 10.5 ± 5.9 | 10.5 ± 5.1 | < .0001 |
| ウイルス変異 | | | |
| PreS2 欠失 (%) | 10 (13) | 39 (52) | 0.042 |
| S 領域の変異 (%) | | | |
| G204A | 5 (6) | 14 (18) | 0.029 |
| Polymerase 領域の変異 (%) | | | |
| G334A | 40 (52) | 52 (70) | 0.021 |
| X 領域の変異 (%) | | | |
| T1487V | 4 (5) | 21 (28) | 0.0014 |
| G1613T (Ser →) | 25 (32) | 41 (54) | 0.0029 |
| T1753V (Ser →) | 22 (28) | 28 (36) | 0.0081 |
| A1762/G1764A (Ser →) | 58 (75) | 70 (92) | 0.0028 |
| Procore 領域の変異 (%) | | | |
| G1898A | 42 (54) | 41 (54) | 0.87 |

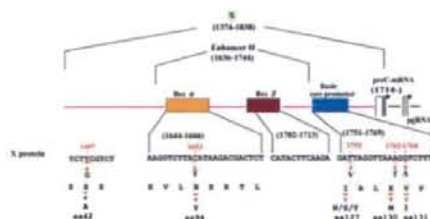
D. 考察

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、HCC グループと non-HCC グループの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、1497 変異、1653 変異、1753 変異が肝癌予測因子となった。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box αに位置しており、CからTへの変異はTCTTACATAAGAからTCTTATATAAGAと変化し完全なパリ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1497のTからVへの変異はX蛋白の43番目アミノ酸をセリンからアラニンへ、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。



なお、preS欠失と肝癌の関連については過去にも報告はされている。本研究では単変量でHCCグループにおいてnon-HCCグループに対して有意に頻度

が高くみられたため、preS欠失と肝癌に関連が有る可能性はあるが、多変量解析では有意ではなかったため、1497変異、1653変異、1753変異にくらべて肝癌に対するインパクトは比較的少ないのではないかとと思われる。

E. 結論

1762/1764変異に1497変異、1653変異、1753変異等が加わること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. Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Hino K, Sakaida I, Mizokami M. Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in uPA/SCID Mouse with Human Hepatocytes. *Gastroenterology*. 136(2):652-662. 2009.
2. Yuen MF, Tanaka Y, Fong DYT, Fung J, Wong DKH, Yuen JCH, But DYK, Chan AOO, Wong BCY, Mizokami M, Lai CL. Independent Risk Factors and Predictive Score for the Development of Hepatocellular

- Carcinoma in Chronic Hepatitis B. *J Hepatol.* 50(1):80-88. 2009.
3. Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol.* 82(16):8241-8242. 2008.
 4. Togashi H, Hashimoto C, Yokozawa J, Suzuki A, Sugahara K, Saito T, Yamaguchi I, Badawi H, Kainuma N, Aoyama M, Ohya H, Akatsuka T, Tanaka Y, Mizokami M, Kawata S. What can be revealed by extending the sensitivity of HBsAg detection to below the present limit? *J Hepatol.* 49(1):17-24. 2008.
 5. Tanaka Y, Sanchez LV, Sugiyama M, Sakamoto T, Kurbanov F, Tatematsu K, Roman S, Takahashi S, Shirai T, Panduro A, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes. *Virology.* 376(2):408-415. 2008.
 6. Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, Oynsuren T, Mizokami M. Virological and clinical implication of core promoter C1752/V1753 and T1764/G1766 mutations in hepatitis B virus genotype D infection in Mongolia. *J Gasrotol Hepatol.* 23(3):474-481. 2008.
 7. 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.* 57(1):98-102. 2008.
- 2、学会発表
1. 2008 肝臓学会総会
B型肝炎ウイルス T1497V, C1653T, T1753V 変異と肝癌との関連性～153 例の B 型肝炎ウイルス全塩基配列の解析～新海登, 田中靖人, 伊藤清頭, 向出雅一, 長谷川泉, 大野智義, 朝比奈靖浩, 泉並木, 八橋弘, 城卓志, 溝上雅史.
 2. 18th APASL 2008 Conference (APASL 2008 Korea). Complete genomic analyses of 153 hepatitis B virus genotype C2 strains in Japan reveal association of T1497V, C1653T and T1753V mutations with hepatocellular carcinoma. Noboru Shinkai, Yasuhiro Tanaka, Kiyooki Ito, Motokazu Mukaide, Izumi Hasegawa, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, Hiroshi Yatsuhashi, Etsuro Orito, Takashi Joh, and Masashi Mizokami.

III. 研究成果の刊行一覧

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 |
|---------------------------------|---|---------------|------------------------------|-------------------------|-----|------|-------|
| 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 | 増永和也 | 肝疾患 Review 2008-2009 | 日本メディカルセンター | 東京 | 2008 | 85-91 |
| Sakai H, Itoh T, Gojobori T. | Processed Pseudogenes and Their Functional Resurrection in the Human and Mouse Genomes. | | Encyclopedia of Life Science | John Wiley & Wons, Ltd. | | 2008 | 1-6 |
| 長尾由実子, 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 改訂2版 | 南山堂 | 東京 | 2008 | 18-20 |

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 |
|--|---|------------------|--------|-----------|------|
| Sugiyama M, <u>Tanaka Y</u> , Kurbanov F, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Hino K, Sakaida I, Mizokami M. | Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in uPA/SCID Mouse with Human Hepatocytes. | Gastroenterology | 136(2) | 652-662 | 2009 |
| Kurbanov F, <u>Tanaka Y</u> , Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. | When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? | J Virol. | 82(16) | 8241-8242 | 2008 |

| | | | | | |
|--|--|------------------------------|------------|---------|------|
| <u>Tanaka Y</u> , Sanchez LV, Sugiyama M, Sakamoto T, Kurbanov F, Tatematsu K, Roman S, Takahashi S, Shirai T, Panduro A, Mizokami M. | Characteristics of hepatitis B virus genotype G coinfecting with genotype H in Chimeric Mice Carrying Human Hepatocytes. | Virology. | 376(2) | 408-415 | 2008 |
| Elkady A, <u>Tanaka Y</u> , Kurbanov F, Oynsuren T, Mizokami M. | Virological and clinical implication of core promoter C1752/V1753 and T1764/G1766 mutations in hepatitis B virus genotype D infection in Mongolia. | J Gasrotol Hepatol. | 23(3) | 474-481 | 2008 |
| Nishida N, Koike A, Tajima A, Ogasawara Y, Ishibashi Y, Uehara Y, Inoue I, <u>Tokunaga K</u> | Evaluating the performance of Affymetrix SNP Array 6.0 platform with 400 Japanese individuals. | BMC Genomics. | 9 (1) | 431 | 2008 |
| Miyagawa T, Nishida N, Ohashi J, Kimura R, Fujimoto A, Kawashima M, Koike A, Sasaki T, Tanii H, Otowa T, Momose Y, Nakahara Y, Gotoh J, Okazaki Y, Tsuji S, <u>Tokunaga K</u> | Appropriate data cleaning methods for genome-wide association study. | Journal of Human Genetics | 53 (10) | 886-893 | 2008 |
| 西田奈央、 <u>徳永勝士</u> | ゲノムワイド SNP タイピング技 術の現状と将来 | 医学のあゆみ | 225 (9) | 721-725 | 2008 |

| | | | | | |
|---|--|-----------------------|-------------------------------|----------|------|
| 小池麻子、西田奈央、 徳永勝士 | ゲノムワイド関連解析データベ ースの開発 | 蛋白核酸酵素 | 53(7) | 882-887 | 2008 |
| Fukuchi S, Homma K, Sakamoto S, Sugawara H, Tateno, <u>Gojobori T</u> , Nishikawa K. | The GTOPI database in 2009: updated content and novel features to expand and deepen insights into protein structures and functions. | Nucleic Acids Res. | 37 (Data base issue) | D333-337 | 2009 |
| Sugawara H, Ikeo K, Fukuchi S, <u>Gojobori T</u> , Tateno Y. | DDBJ Dealing with Mass Data Produced by the Second Generation Sequencer. | Nucleic Acids Res. | 37 (Data base issue) | D16-18 | 2009 |
| Shimada MK, Matsumoto R, Hayakawa Y, Sanbonmatsu R, Gough C, Yamaguchi-Kabata Y, Yamasaki C, Imanishi T, <u>Gojobori T</u> . | VarySysDB: a human genetic polymorphism database based on all H-InvDB transcripts. | Nucleic Acids Res. | 37 (Data base issue) | D810-815 | 2009 |
| Jin L, Kryukov K, Clemente J, Komiyama T, Suzuki Y, Imanishi T, Ikeo K, <u>Gojobori T</u> . | The evolutionary relationship between gene duplication and alternative splicing. | Gene. | 427 (1-2) | 19-31 | 2008 |
| Yamaguchi-Kabata Y, Shimada MK, Hayakawa Y, Minoshima S, Chakraborty R, <u>Gojobori T</u> , Imanishi T. | Distribution and effects of nonsense polymorphisms in human genes. | PLoS One | 3(10) | e3393 | 2008 |

| | | | | | |
|---|--|--------------------|-------------------------|----------|------|
| Howe D, Costanzo M, Fey P, <u>Gojobori T</u> , Hannick L, Hide W, Hill DP, Kania R, Schaeffer M, St Pierre S, Twigger S, White O, Yon Rhee S. | The future of biocuration. | Nature | 455 (7209) | 47-50 | 2008 |
| Genome Information Integration Project and H-Invitational 2 Consortium: Yamasaki C, Imanishi T, <u>Gojobori T</u> , et al. | The H-Invitational Database (H-InvDB), a comprehensive annotation resource for human genes and transcripts. | Nucleic Acids Res. | 36 (Data base issue) | D793-799 | 2008 |
| Matsuya A, Sakate R, Suzuki M, <u>Gojobori T</u> , Imanishi T, Itoh T. et al. | Evola: Ortholog database of all human genes in H-InvDB with manual curation of phylogenetic trees. | Nucleic Acids Res. | 36 (Data base issue) | D787-792 | 2008 |
| Sugawara H, Ogasawara O, Okubo K, <u>Gojobori T</u> , Tateno Y. | DDBJ with New System and Face. | Nucleic Acids Res. | 36 (Database issue) | D22-24 | 2008 |
| Trinks J, Cuestas ML, Tanaka Y, Mathet VL, Minassian ML, Kurbanov F, Simmonds P, <u>Mizokami M</u> , Oubiña JR. | Two simultaneous hepatitis B virus epidemics among injecting drug users and men who have sex with men in Buenos Aires, Argentina: characterization of the first D/A recombinant from the American continent. | J Viral Hepat. | 15(11) | 827-838 | 2008 |

| | | | | | |
|---|--|------------------|--------------|---------------------|------|
| Khan A, Tanaka Y, Saito H, Ebinuma H, Sekiguchi H, Iwama H, Wakabayashi G, Kamiya T, Kurbanov F, Elkady A, <u>Mizokami M.</u> | Transmission of Hepatitis B virus (HBV) Genotypes among Japanese Immigrants and Natives in Bolivia. | Virus Res. | 132 (1-2) | 174-180 | 2008 |
| Khan A, Kurbanov F, Tanaka Y, Elkady A, Sugiyama M, Dustov A, <u>Mizokami M.</u> | Epidemiological and clinical evaluation of hepatitis B, hepatitis C and delta hepatitis viruses in Tajikistan. | J Med Virol. | 80(2) | 268-276 | 2008 |
| Ura S, <u>Honda M.</u> , Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. | Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. | Hepatology | Nov | Epub ahead of print | 2008 |
| Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, <u>Honda M.</u> , Kaneko S, Tang ZY, Wang XW. | EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. | Gastroenterology | 136(3) | 1012-1024 | 2009 |
| Sakai Y, <u>Honda M.</u> , Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S. | Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. | Cancer Res. | 68(24) | 10267-10279 | 2008 |

| | | | | | |
|--|---|-----------------------------------|-------------|---------|------|
| Minagawa H, Yamashita T, <u>Honda M</u> , Tabuse Y, Kamijo K, Tsugita A, Kaneko S. | Comparative analysis of proteome and transcriptome in human hepatocellular carcinoma using 2D-DIGE and SAGE. | Protein J. | 27 (7-8) | 409-419 | 2008 |
| Yamashita T, <u>Honda M</u> , Takatori H, Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S. | Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. | J Hepatol. | 50(1) | 100-110 | 2009 |
| Yamashita T, <u>Honda M</u> , Kaneko S. | Application of Serial Analysis of Gene Expression in cancer research.(Review) | Curr Pharm Biotechnol. | 9(5) | 375-382 | 2008 |
| Mizukoshi E, <u>Honda M</u> , Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S. | Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. | J Hepatol. | 49(6) | 946-954 | 2008 |
| Teramoto R, Minagawa H, <u>Honda M</u> , Miyazaki K, Tabuse Y, Kamijo K, Ueda T, Kaneko S. | Protein expression profile characteristic to hepatocellular carcinoma revealed by 2D-DIGE with supervised learning. | Biochim Biophys Acta. | 1784 (5) | 764-772 | 2008 |
| Minagawa H, <u>Honda M</u> , 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 |

| | | | | | |
|---|--|-----------------------------|-------|-----------|------|
| <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 Hepatol. | 48 | 736-742 | 2008 |
| Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, <u>Kurosaki M</u> , Enoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. | Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. | Gastroenterology | 134 | 1396-1405 | 2008 |
| <u>Kurosaki M</u> , Izumi N. | External validation of FIB-4: diagnostic accuracy is limited in elderly populations. | Hepatology. | 47(1) | 352 | 2008 |
| <u>Nagao Y</u> , Kawasaki K, Sata M. | Insulin resistance and lichen planus in patients with HCV-infectious liver diseases. | J Gastroenterol Hepatol. | 23 | 580-585 | 2008 |
| <u>Nagao Y</u> , Matsuoka H, Kawaguchi T, Ide T, Sata M. | HBV and HCV infection in Japanese dental care workers. | Int J Mol Med. | 21 | 791-799 | 2008 |