

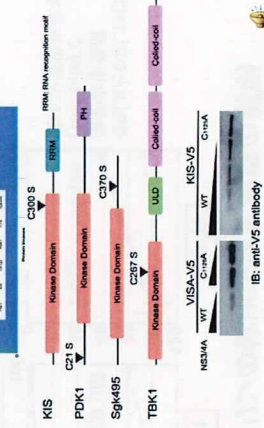
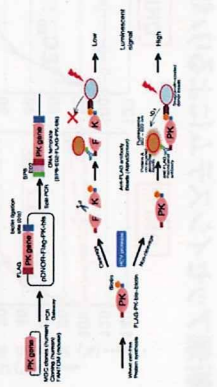
HCV プロテアーゼで切断され機能変化をきたす宿主因子の探索

病原性発現機構の解析
持続感染機構の解析

310種類のPKから、NS3-4Aプロテアーゼで切断されるPKを6種類同定し、4種類のPKについて細胞内での切断部位を同定した

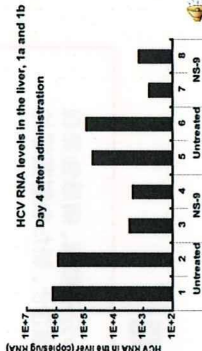
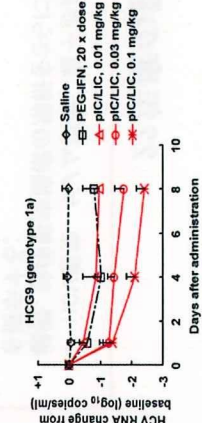
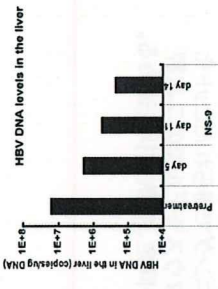
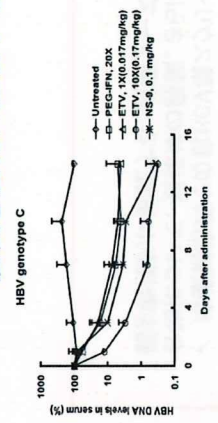


プロテインキナーゼ (PK)ライブラリーを基盤としたHCV宿主タンパク質同定の手法



Poly I:Cとカチオニククリポソーム LIC-101との複合体NS-9はキメラマウスモデルでHCVとHBVの複製を強力に阻害する

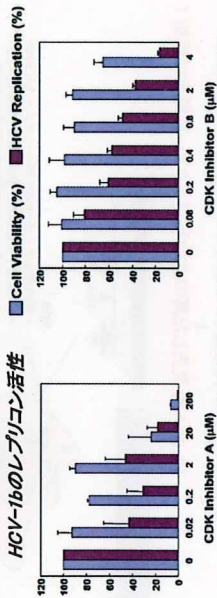
阻害剤の探索



CDK阻害剤はHCVの複製、産生を抑制する

阻害剤の探索

HCV-1bのレプリコン活性



ヒト肝臓キメラマウス感染HCV-1b

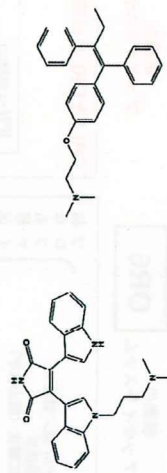


CDK (N=4): CDK inhibitor A 25 mg/kg, iv
IFN (N=3): PEG-IFN (Pegasyra) 30 ug/kg, sc
CDK+IFN (N=3): CDK inhibitor A + PEG-IFN

CDK (N=3): CDK inhibitor A 50 mg/kg, iv
IFN (N=3): PEG-IFN (Pegasyra) 30 ug/kg, sc
CDK+IFN (N=3): CDK inhibitor A + PEG-IFN

HCV感染増殖細胞によるランダムスクリーニングから新たに見出された抗HCV化合物

阻害剤の探索



Bisindolylmaleimide
IC₅₀ = 0.1 μM
TC₅₀ = 30 μM
複製阻害
複製と侵入阻害

Tamoxifen
IC₅₀ = 5 μM
TC₅₀ > 30 μM
複製と侵入阻害

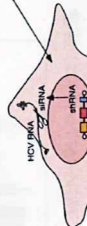
多目的型非増殖性アデノウイルスベクターの開発

アデノウイルスベクターによる肝炎治療の可能性
 (患所) 肝腫への遺伝子導入効率が極めて高い
 (短所) ベクターの免疫原性による細胞毒性 → 原因ウイルスタンパク質の同定 (pX)
 → EFプロモーターにより回避可能

安全性が確認されれば治療への応用は可能
 RNA干渉による肝炎ウイルス治療法の可能性
 非増殖性アデノウイルスベクター: ウイルス由来のタンパク質の発現は最小限
 ウイルス関連RNA (VA RNAs) のみは野生型と同程度に発現
 shRNA や miRNA と同じ経路でプロセッサされるため shRNA の効果を減弱
VA RNAs を欠した真の非増殖型ベクターの開発に成功!



多目的型 shRNA 高度発現ベクター

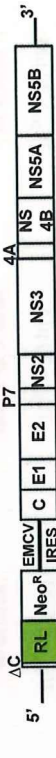


特徴
 ・目的遺伝子と shRNA を同一ベクター上に挿入
 ・VA 遺伝子非発現型 → shRNA の発現を最大化
 ・dsRed 搭載により発現細胞の可視化が可能

shRNA と IFN を搭載したベクターを用いて効果を検討

HCV複製を定量化できる新規細胞アッセイシステムの開発

ORN/C-5B (HCV-O : genotype 1b)



ルシフェラーゼ活性を測定するだけで HCV複製を定量化できる
 RL: Renilla Luciferase

HuH-7細胞由来
OR6
 従来のアッセイシステム

L123細胞由来
ORL8 **ORL11**
 新規のアッセイシステム

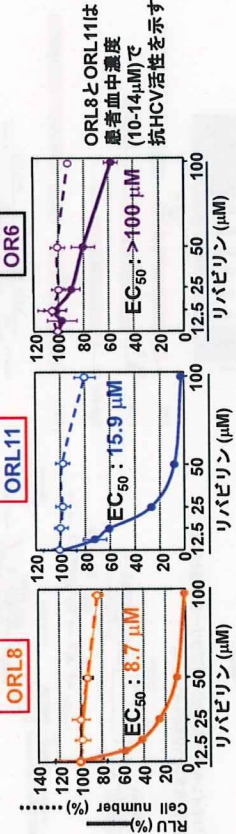
HuH-7
 ・日本人/57歳/男性
 ・肝細胞癌由来
 ・1982年に樹立 (岡山大学)
L123
 ・日本人/56歳/男性
 ・肝細胞癌由来
 ・1987年に樹立 (国立がんセンター)

ORL8とORL11は抗HCV剤に対して高感受性を示す

	OR6	ORL8	ORL11
IFN-α (IU/ml)	0.40	0.13	0.30
フルバスタチン (μM)	1.22	0.28	0.32
ミリオチン (nM)	>40	5.2	3.6

EC₅₀値 (72時間アッセイ)

新規アッセイシステムによるリバビリンの抗HCV活性機序の解明



リバビリンの抗HCV活性は、ゲアノシンの添加により、キサンセルされた

リバビリン (μM)
 ゲアノシン (μM)
 アデノシン (μM)

リバビリンはIMPDDHを阻害することにより抗HCV活性を示すことを明らかにした

22年度の課題

- ✓ HCV感染・ゲノム複製・粒子形成の分子機構、病原性発現機構、持続感染機構の解析をさらに発展させ、新たな創薬標的を提示する。
- ✓ 培養細胞系での抗HCV薬スクリーニングで得られたヒット化合物について、類縁体の評価、さらにマウスモデルでの二次評価を積極的に実施する。創薬シーズの同定、特許取得を進める。

平成 21 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：Claudin-1 を標的とした C 型肝炎ウイルス感染阻害法の開発とその臨床応用に向けた疫学調査

課題番号：H20-肝炎-若手-012

研究代表者：磯田 勝広

I. 研究の意義

本研究は、最近新規同定された C 型肝炎ウイルス (HCV) 受容体、claudin-1 (CL-1) に着目し、独自の CL binder [アンタゴニスト] 創出技術を用いて HCV 感染阻害薬を開発すると共に、疫学的に C 型肝炎の炎症・悪化と CL-1 の発現パターンの連関解析を行うことにより、近未来に臨床応用可能な C 型肝炎の画期的予防・治療薬の創製を試みるものであり、国民の健康増進、バイオ製薬メーカーの育成、我が国の知的財産の確保に大きく貢献できる

II. 研究の目的、期待される成果

本研究は、独自の CL-4 アンタゴニスト、C-CPE を用いた CL binder 技術と人工機能性蛋白質迅速創製技術を有効活用し、世界初の『CL-1 を介した HCV 感染阻害法』を開発することを目的とする。

HCV 治療では耐性ウイルスの出現が大きな課題となっており、インターフェロン、リバビリン療法では高ウイルスキャリアに対する著効率は著しく低い。現在までに HCV 感染受容体として CD81、SR-BI、LDL-R 等が同定され、これら宿主因子を標的とした HCV 感染阻害法の構築が試みられてきたものの、未だ有効な阻害法は確立されていない。本研究で開発する CL-1 binder は、既存の感染阻害法との組み合わせにより耐性ウイルス出現の抑制、高ウイルスキャリアに対する治療効果が期待され、国民の健康増進、我が国の医療費の抑制、バイオ製薬メーカーの育成、我が国の知的財産の確保等に多大な貢献が期待される。

III. 2 年間の研究成果

・研究代表者 (磯田勝広)

(1) CL-1 アンタゴニスト探索系として 5 種類の CL 発現細胞および CL 蛋白質発現系を構築し、さらに CL をウイルス膜上に提示した CL 発現出芽バキュロウイルス (BV) を作製した。

(2) 7 mer 環状ペプチド提示ファージライブラリの中から CL-1 結合性ファージを取得した。

(3) 阪大徹研松浦善治教授、阪大医竹原徹郎准教授、感染研脇田隆字部長との共同研究体制を整備した。

・研究分担者 (角田慎一)

(1) C-CPE を prototype として用いた CL-1 アンタゴニスト創出に資する C-CPE 構造変異体ライブラリを 2 種類構築した。

(2) CL-1 発現バキュロウイルスを用いたスクリーニング系の構築。

・研究分担者 (近藤昌夫)

(1) CL 発現 BV を用いた CL binder スクリーニング系を構築した。

(2) C-CPE 構造変異体提示ファージライブラリの中から CL-1 結合性ファージを取得した。

(3) CL-1 結合性ファージのシーケンスデータを基に CL-1 結合性分子を取得した。

(4) CL-1 結合性分子を prototype として用いて新たな C-CPE 構造変異体ライブラリを作製した。

(5) 新 C-CPE 構造変異体ライブラリの中から CL-1 結合性ファージを複数取得した。

(6) 東大先端研浜窪隆雄先生との共同研究体制を構築し、抗 CL-1 抗体の作製に着手した。

IV. 22年度の課題

2年間の成果を踏まえ、最終年度は、引き続きCL-1 binderの作製を進め、CL-1 binderのHCV感染阻害活性を評価し、HCV感染阻害活性を有するCL-1 binderを作製することが最重要課題である。また、CL-1 binderによるHCV感染阻害活性が観察された段階で、医薬基盤研、大阪大学を中核とする先端医療開発特区と密接に連携し、C型肝炎とCL-1発現の連関解析実施に向けたプロトコルの作成、倫理委員会への届出を行い、可及的速やかに臨床研究に着手できるよう準備を進める。

V. 行政施策への貢献の可能性

周知のように、インターフェロン療法は、耐性ウイルスの出現、間質性肺炎等の副作用発現により投与の中断を余儀なくされる患者がいること、依然として高ウイルス量患者には効かないことが臨床上の課題となっている。CL-1 binderを利用したHCV感染阻害法の確立により、既存の療法との併用による相加的・相乗的治療効果が期待されること、副作用に伴うインターフェロン療法中断患者、高ウイルス量患者に対する治療効果が期待されることから、国民の健康寿命の増進、完治に伴う医療費の削減等において厚生労働行政に多大な貢献が期待される。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者(磯田勝広)

1. Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii M, Horiguchi, Y., Mizuguchi H, Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., **Isoda, K.**, Yagi, K., Watanabe, Y. and Kondoh, M., Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1639-1648, 2008.
2. **Isoda, K.**, Kagaya, N., Akamatsu, S., Hayashi, S., Tamesada, M., Watanabe, A., Kobayashi, M., Tagawa, Y., Kondoh, M., Kawase, M., Yagi, K., Hepatoprotective effect of vitamin B12 on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Bio. Pharm. Bull.*, 31, 309-311, 2008.
3. 佐伯理恵, 角谷秀樹, 吉田孟史, 深坂昌弘, **磯田勝広**, 鈴木亮, 近藤昌夫, 渡邊善照, 丸山一雄, 八木清仁: ウエルシュ菌エンテロトキシン断片を利用した claudin-4 ターゲッティング法の開発., 日本薬学会第128年会, 横浜, 2008年3月.

研究分担者(角田慎一)

1. Imai, S., Yoshida, Y., Okamura, T., Nagano, K., Abe, Y., Yoshikawa, T., Kamada, H., Nakagawa, S., **Tsunoda, S.**, Tsutsumi, Y. : The specific effect of 2-Methoxyestradiol on lymphatic vascular endothelial cells., *Pharmazie*, 64, 214-216, 2009.
2. Nagano, K., Imai, S., Mukai, Y., Nakagawa, S., Abe, Y., Kamada, H., **Tsunoda, S.**, Tsutsumi, Y. : Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library., *Pharmazie*, 64, 238-241, 2009.
3. Mukai, Y., Nakamura, T., Yoshioka, Y., **Tsunoda, S.**, Kamada, H., Nakagawa, S., Yamagata, Y., Tsutsumi, Y. : Crystallization and preliminary X-ray analysis of TNF-TNFR2 complex, *Acta Crystallogr.*, 65, 295-298, 2009.
4. Yoshikawa, T., Sugita, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Nagano, K., Nabeshi, H., Shibata, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Kamada, H., **Tsunoda, S.**, Tsutsumi, Y. : The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains., *Biomaterials*, 30, 3318-23, 2009.
5. Mukai, Y., Nakamura, T., Yoshioka, Y., Shibata, H., Abe, Y., Nomura, T., Tani, M., Ohta, T., Nakagawa, S., **Tsunoda, S.**, Kamada, H., Yamagata, Y., Tsutsumi, Y. : Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists., *J. Biochem.*, 146, 167-72, 2009.
6. Kayamuro, H., Yoshioka, Y., Abe, Y., Katayama, K., Yoshida, T., Yamashita, K., Yoshikawa, T., Hiroi, T., Itoh, N., Kawai, Y., Mayumi, T., Kamada, H., **Tsunoda, S.**, Tsutsumi, Y. : TNF superfamily member, TL1A, is a potential mucosal vaccine adjuvant., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 384, 296-300,

2009.

7. Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Kamada, H., Shibata, H., Sugita, T., Abe, Y., Nagano, K., Nomura, T., Minowa, K., **Tsunoda, S.**, Tsutsumi, Y. : Arsenic trioxide has the inhibitory effect on transmission of human T-cell leukemia virus type 1., *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 1286-8, 2009.
8. Kayamuro, H., Abe, Y., Yoshioka, Y., Katayama, K., Yoshida, T., Yamashita, K., Yoshikawa, T., Hiroi, T., Itoh, N., Kawai, Y., Kamada, H., Nagano, K., **Tsunoda, S.**, Tsutsumi, Y. : The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses., *Biomaterials.*, 29, 5869-76, 2009
9. Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii M, Horiguchi, Y., Mizuguchi H, Tsutsumi, Y., **Tsunoda, S.**, Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. and Kondoh, M., Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1639-1648, 2008.
10. Shibata, H., Yoshioka, Y., Ohkawa, A., Minowa, K., Mukai, Y., Abe, Y., Taniai, M., Nomura, T., Kayamuro, H., Nabeshi, H., Sugita, T., Imai, S., Nagano, K., Yoshikawa, T., Fujita, T., Nakagawa, S., Yamamoto, A., Ohta, T., Hayakawa, T., Mayumi, T., Vandeenabeele, P., Aggarwal, BB., Nakamura, T., Yamagata, Y., **Tsunoda S.**, Kamada, H., Tsutsumi, Y. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist. *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007, 2008.
11. Sugita, T., Yoshikawa, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Imai, S., Nagano, K., Yoshida, Y., Shibata, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Kamada, H., **Tsunoda S.**, Tsutsumi Y. Comparative study of the protein transduction domains-mediated molecular transduction. *Br. J. Pharmacol.*, 153, 1143-1152, 2008.
12. Yoshikawa, T., Sugita, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Nagano, K., Nabeshi, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Abe, Y., Kamada, H., **Tsunoda, S.**, Tsutsumi, Y., Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus. *J. Mol. Biol.*, 380, 777-782, 2008.
13. Mukai, Y., Shibata, H., Nakamura, T., Yoshioka, Y., Abe, Y., Nomura, T., Taniai, M., Ohta, T., Ikemizu, S., Nakagawa, S., **Tsunoda, S.**, Kamada, H., Yamagata Y., Tsutsumi Y. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. *J. Mol. Biol.*, in press.
14. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 菱輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 鎌田春彦, **角田慎一**, 堤康央 : アンタゴニスト活性を有するI型受容体指向性TNF変異体の評価 : 関節リウマチモデルに対する治療効果および安全性の検討., 第24回DDS学会, 東京 2008年6月.
15. 渡辺 光, 吉岡靖雄, 森重智弘, 鎌田春彦, 向 洋平, **角田慎一**, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作 : フェージ表面提示法を用いた活性増強型リンフォトキシン・の創製とその特性評価., 第8回 日本蛋白質科学会年会, 東京, 2008年6月.

研究分担者 (近藤昌夫)

1. 八木清仁、近藤昌夫、磯田勝広、堀口安彦 ; 発明の名称 : 粘膜ワクチン、特願 2009-24776
2. Saeki R, **Kondoh M (Corresponding author)**, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y and Yagi K. (2009) A novel tumor-targeting using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol*, 76:918-926.
3. Matsuhisa K, **Kondoh M (Corresponding author)**, Takahashi A and Yagi K. (2009) Tight junction modulators and drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, (2009) 6, 509-515.
4. **Kondoh M (Corresponding author)**, Takahashi A, Saeki R and Yagi K (2009) Claudin as a novel drug delivery system. *Drug Delivery System*, 24:532-537.
5. Yamamoto Y, Fujii M, Watanabe K, Tsukamoto M, Shibata Y, **Kondoh M** and Watanabe Y. (2009) Effect of powder characteristics on oral tablet disintegration. *Int J Pharm*, 365:116-120.
6. **Kondoh M (Corresponding author)**, Yoshida T, Kakutani H and Yagi K. (2008) Targeting tight junction proteins-significance for drug development. *Drug Discov Today*, 13:180-186.
7. Takahashi A, Komiya E, Kakutani H, Yoshida T, Fujii M, Horiguchi Y, Mizuguchi H, Tsutsumi Y, Tsunoda S, Koizumi N, Isoda K, Yagi K, Watanabe Y and **Kondoh M (Corresponding author)**. (2008) Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem Pharmacol*,

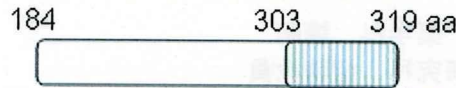
- 75:1639-1648.
8. **Kondoh M (Corresponding author)** and Yagi K. (2007) The CLAUDIN family as a new approach for drug delivery. *Drugs Fut*, 32:1053-1059.
 9. **Kondoh M (Corresponding author)** and Yagi K. (2007) Progress in absorption enhancers based on tight junction. *Expert Opin Drug Deliv*, 4:275-286.
 10. Harada M, **Kondoh M (Corresponding author)**, Ebihara C, Takahashi A, Komiya E, Fujii M, Mizuguchi H, Tsunoda S, Horiguchi Y, Yagi K and Watanabe Y. (2007) Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Biochem Pharmacol*, 73:206-214.
 11. **Kondoh M (Corresponding author)** and Yagi K. (2007) Tight junction modulators: promising candidates for drug delivery. *Curr Med Chem*, 14:2482-2488.
 12. Ebihara C, **Kondoh M (Corresponding author)**, Harada M, Fujii M, Mizuguchi H, Tsunoda S, Horiguchi Y, Yagi K and Watanabe Y. (2007) Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin for modulation of tight junction. *Biochem Pharmacol*, 73:824-830.
 13. Harada M, **Kondoh M (Corresponding author)**, Masuyama A, Fujii M, Nakanishi T, Utoguchi N, Yagi K and Watanabe Y. (2007) Effect of forskolin on the expression of claudin-5 in human trophoblast BeWo cells. *Pharmazie*, 62:291-294.
 14. Koji Matsuhisa, Ryota Okude, **Masuo Kondoh** and Kiyohito Yagi, A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator. 36rd annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July, 2009, Copenhagen, Denmark.
 15. **Masuo Kondoh**, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Kiyohito Yagi, Claudin as a target molecule for mucosal absorption of peptide drug. 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA.
 16. Toshiaki Yamaura, Azusa Takahashi, Hideki Kakutani, **Masuo Kondoh**, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, Development of a novel screening system for claudin binder using baculovirus display. 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA
 17. 近藤昌夫、生体バリアを利用した薬物送達研究、日本薬剤学会第25年会、平成21年5月、静岡（招待講演）
 18. 近藤昌夫、生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究、第25回日本DDS学会学術集会、平成21年7月、東京（招待講演）
 19. 近藤昌夫、八木清仁、生体バリアの分子基盤を利用した経粘膜DDS、第25回日本DDS学会学術集会、平成21年7月、東京（招待講演）
 20. 近藤昌夫、八木清仁、Claudinを利用した創薬研究の可能性、彩都バイオサイエンスセミナー、平成21年10月、大阪（招待講演）
 21. 近藤昌夫、八木清仁、創薬ターゲットとしてのタイトジャンクションの可能性、創剤フォーラム 第15回シンポジウム「タイトジャンクションをめぐる最近の研究成果と創薬への応用」、平成21年10月、東京（招待講演）

VII. III (2年間の研究成果)の概要図等

平成20-21年度研究成果の概要

Claudin-1 binder探索系構築のため、①C-CPE構造変異体ライブラリ、②claudin-1スクリーニング系の構築などを行い、③claudin-1 binderを取得した。

①C-CPE構造変異体ライブラリの作製



Ser Ser³⁰⁵ Tyr Ser Gly Asn Tyr³¹⁰ Pro Tyr Ser Ile Leu³¹⁵ Phe Gln Lys Phe³¹⁹

①-1 ライブラリ1の作製:

アラニン置換によりClaudin-4結合性が低下したTyr306、Tyr310、Tyr312、Leu315などをランダムなアミノ酸に置換したC-CPE誘導体提示ファージライブラリを作製した。

①-2 ライブラリ2の作製:

アラニン置換によりClaudin-4結合性が上昇したSer304、Ser305、Ser307、Asn309、Ser313、Lys318などをランダムなアミノ酸に置換したC-CPE誘導体提示ファージライブラリを作製した。

②Claudin-1スクリーニング系の構築

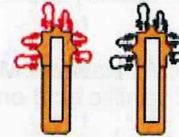
②-1 Claudin発現細胞の作製:

Claudin-1、-2、-3、-4、-5発現細胞を作製した。



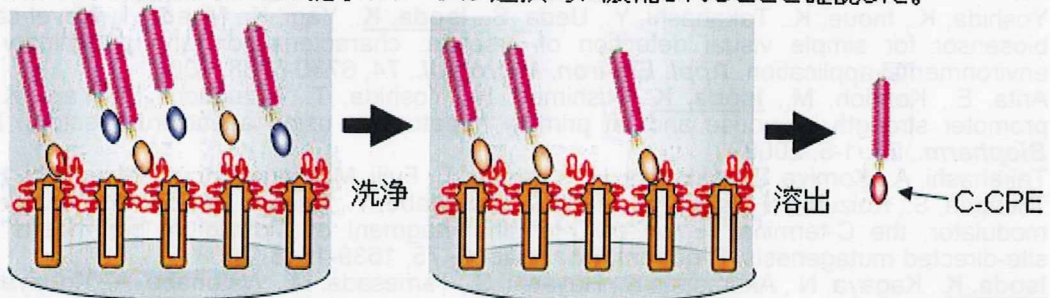
②-2 Claudin発現バキュロウイルスの作製:

Claudin-1、-4発現バキュロウイルスを作製した。



②-3 Claudin-4 binderを利用したスクリーニング系の評価:

Claudin-4 binder(C-CPE)提示ファージ、claudin-4発現細胞、claudin-4発現バキュロウイルスを用いて、claudin-4 binder提示ファージが選択的に濃縮されることを確認した。



③Claudin-1 binderの取得

ライブラリ1および2、claudin-1発現バキュロウイルスを用いてスクリーニングを行い、ライブラリ2の中からclaudin-1結合性分子を2種類取得した。さらに、本分子をprototypeとして用いて新規ライブラリを作製し、claudin-1 binderのスクリーニングを行い、claudin-1 binder候補クローンを複数見出した。

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

平成 17 年 3 月：大阪大学大学院 薬学研究科 博士課程修了
 平成 17 年 4 月～10 月：国立循環器病センター研究所 流動研究員
 平成 17 年 10 月～平成 19 年 3 月：大阪大学 薬学研究科 助手
 平成 19 年 4 月～平成 21 年 3 月：大阪大学大学院 薬学研究科 助教
 平成 19 年 4 月～平成 21 年 3 月：医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト（堤康央プロジェクトリーダー）協力研究員
 平成 21 年 4 月～現在：帝京平成大学 薬学部 薬学科 講師
 平成 21 年 4 月～現在：大阪大学大学院 薬学研究科 招聘教員

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

国立循環器病センター研究所在職中は、宮田敏行部長の下、肝炎時に変動する遺伝子群の解析を行った。大阪大学大学院薬学研究科に異動後、八木清仁教授の下、C 型肝炎研究、近藤昌夫准教授および医薬基盤研堤康央プロジェクトリーダー（現阪大院薬教授、医薬基盤研リーダー併任）の下、claudin binder 研究に着手した。当該申請課題は、上述した先生に加え、阪大医竹原徹郎准教授、阪大微研松浦善治教授、国立感染研脇田隆宇部長にご指導を仰ぎつつ、C 型肝炎ウイルス感染阻害法の開発を試みるものである

・主な研究課題

- (1) Claudin-1 を標的とした C 型肝炎阻害薬の開発
- (2) Claudin-4 を標的とした粘膜ワクチンの開発
- (3) 肝臓に対するナノマテリアルの安全性評価

・これまでの研究実績

1. Itoh A., **Isoda K.**, Kondoh M., Kawase M., Kobayashi M., Tamesada M., Yagi K., Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 1215-1219, 2009.
2. Nishimori H., Kondoh M., **Isoda K.**, Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K., Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72, 626-629, 2009.
3. Nishimori H., Kondoh M., **Isoda K.**, Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K., Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72, 496-501, 2009.
4. Yoshida, K., Inoue, K., Takahashi, Y., Ueda, S., **Isoda, K.**, Yagi, K., Maeda, I., Novel carotenoid-based biosensor for simple visual detection of arsenite: characterization and preliminary evaluation for environmental application. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74, 6730-6738, 2008.
5. Arita, E., Kondoh, M., **Isoda, K.**, Nishimori, H., Yoshida, T., Mizuguchi, H., Yagi, K., Evaluation of promoter strength in mouse and rat primary hepatocytes using adenovirus vectors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 70, 1-6, 2008.
6. Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii, M., Horiguchi, Y., Mizuguchi, H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., **Isoda, K.**, Yagi, K., Watanabe, Y., Kondoh, M., Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 1639-1648, 2008.
7. **Isoda, K.**, Kagaya, N., Akamatsu, S., Hayashi, S., Tamesada, M., Watanabe, A., Kobayashi, M., Tagawa, Y., Kondoh, M., Kawase, M., Yagi, K., Hepatoprotective effect of vitamin B12 on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 309-311, 2008.
8. Ikeda, E., Yagi, K., Kojima, M., Yagyuu, T., Ohshima, A., Sobajima, S., Tadokoro, M., Katsube, Y., **Isoda, K.**, Kondoh, M., Kawase, M., Go, M.J., Adachi, H., Yokota, Y., Kirita, T., Ohgushi, H., Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*, 76, 495-505, 2008.
9. Hayashi, S., Itoh, A., **Isoda, K.**, Kondoh, M., Kawase, M., Yagi, K., Fucoidan partly prevents CCl4-induced liver fibrosis. *Eur. J. Pharmacol.*, 580, 380-384, 2008.
10. Fujimoto, H., Wakabayashi, M., Yamashiro, H., Maeda, I., **Isoda, K.**, Kondoh, M., Kawase, M., Miyasaka, H., Yagi, K., Whole-cell arsenite biosensor using photosynthetic bacterium Rhodovulum sulfidophilum. Rhodovulum sulfidophilum as an arsenite biosensor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 332-338, 2006.
11. **Isoda, K.**, Arita, E., Kojima, M., Ikkaku, M., Tashiro, F., Yamato, E., Miyazaki, J., Kawase, M., Kondoh, M., Yagi, K., Protection against CCl4-induced injury in liver by adenovirally introduced thioredoxin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350, 157-161, 2006.

上記を含め、現在までに25報の原著論文、総説、特許等を公表済みである（印刷中を含む）。

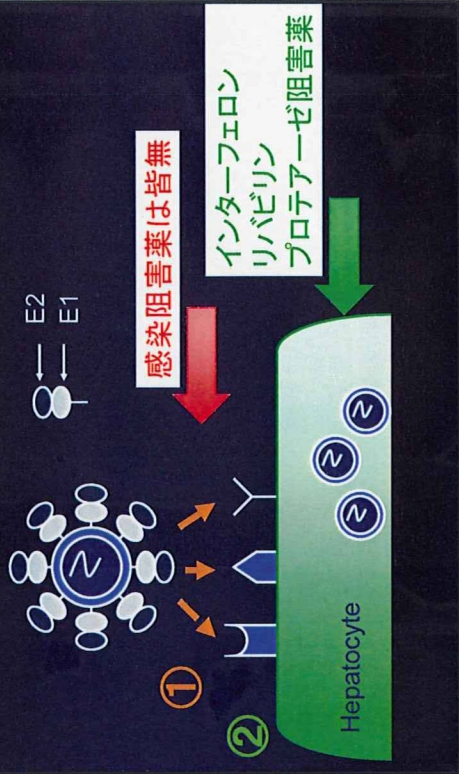
平成22年1月20日

平成21年度厚生労働省科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

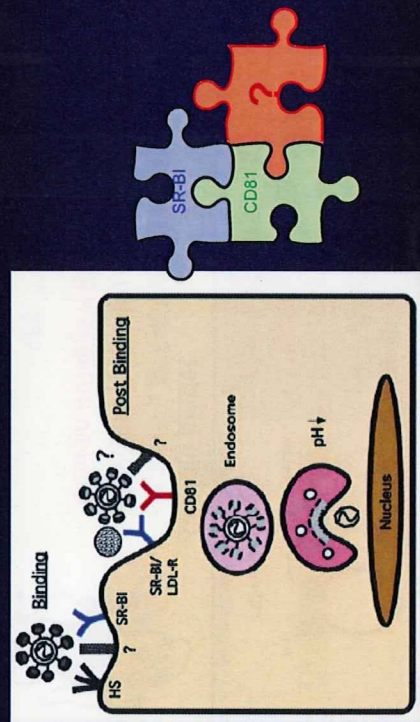
Claudin-1を標的とした C型肝炎ウイルス感染阻害法の開発と その臨床応用に向けた疫学調査

帝京平成大学 薬学部
磯田 勝広

C型肝炎治療薬の現状



HCV感染受容体



Hepatology, 44, 527, 2006

Claudin-1はHCV感染受容体

Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry

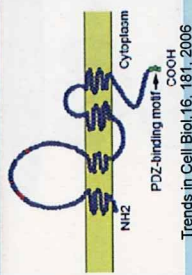
Matthew J. Evans¹, Thomas von Hahn^{1*}, Donna M. Tschernig¹, Andre W. Theodora Hatziloannou¹, Jane A. McKeating¹, Paul D. Bieniasz¹ & Charlene Patton¹, Penno Wolk¹

Nature (Feb 25, 2007)



Blocking antibodies, ligands or antagonists are useful for probing the function of cellular molecules involved in viral entry. Unfortunately, all available CLDN1-specific antibodies recognize the intracellular C-terminal segment of the protein and are thus not useful for such studies. After an unsuccessful attempt to raise antibodies against CLDN1 E1 (data not shown), we identified a site in the C-terminal

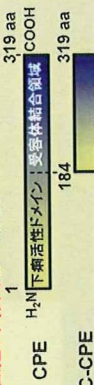
本研究の目的



- Claudin**
- 分子量~23 kDaの四回膜貫通蛋白質
 - Tight junctionのバリア機能の本体
 - 20種類以上の分子が存在
 - 発現、バリア機能に組織特異性



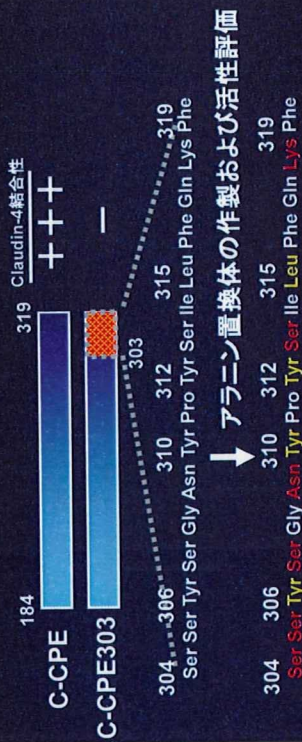
- Claudin binder**
- ウエルシュ菌下痢毒素(CPE)の受容体結合領域
 - 分子量14 kDaのポリペプチド
 - Claudin-4の細胞外領域に結合



J Biol Chem, 283, 268, 2008

C-CPEをprototypeとして用いたclaudin-1 binderの作製

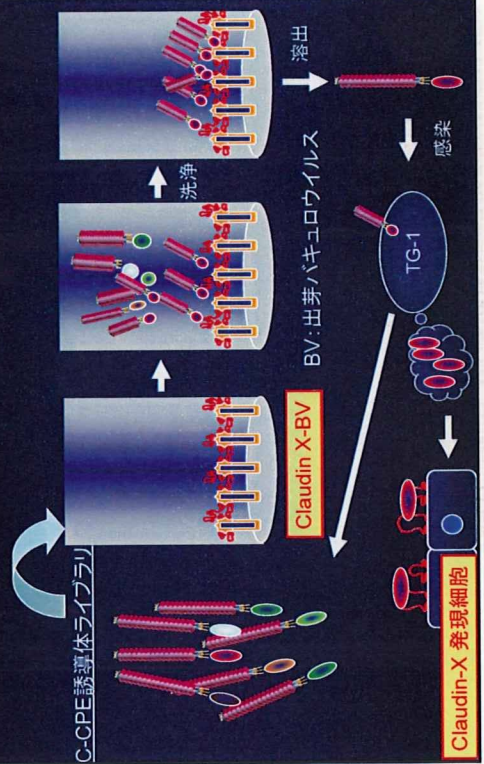
C-CPEの機能ドメイン解析



黄色: Claudin-4結合性が減弱
赤色: Claudin-4結合性が亢進

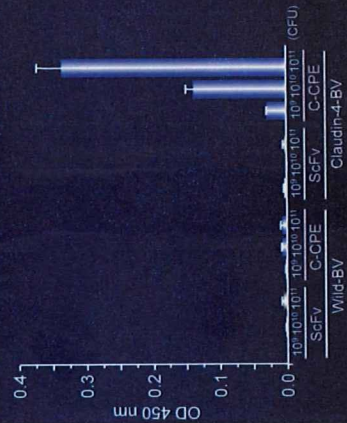
Harada et al. Biochem Pharmacol. 2007; Ebihara et al. Biochem Pharmacol. 2007; Takahashi et al. Biochem Pharmacol. 2008.

Claudin binderスクリーニングシステム

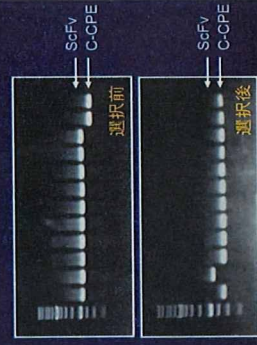


出芽バキュロウイルス発現系を利用した Claudin binderスクリーニング系の構築

Claudin-4結合性



Claudin-4結合性フアージ選択性



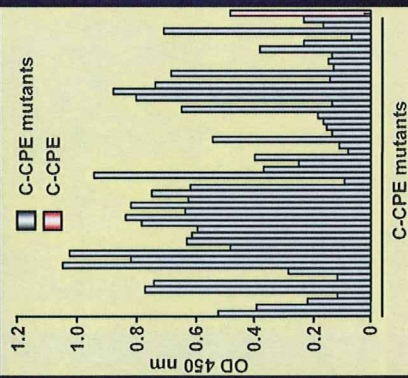
Claudin binderのスクリーニング

C-CPE phage library

304 305 307 309 313 318
C-CPE S S S N S K

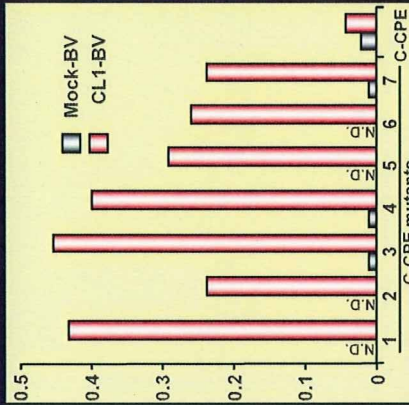
Clone 1	V	C	A	R	A	P	C	H	R	A	V	L	P	G	F	S	S	K
2	C	H	V	L	P	H	Q	A	K	H	R	P	R	L	N	T	Q	S
3	C	A	G	H	L	S	D	T	P	R	N	Q	M	F	R	L	N	T
4	A	R	A	G	H	P	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q
5	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
6	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
7	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
8	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
9	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
10	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
11	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
12	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
13	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
14	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
15	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
16	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S
17	A	R	A	G	H	P	T	S	G	S	N	T	F	N	R	T	Q	S

Claudin-1結合性ファージ

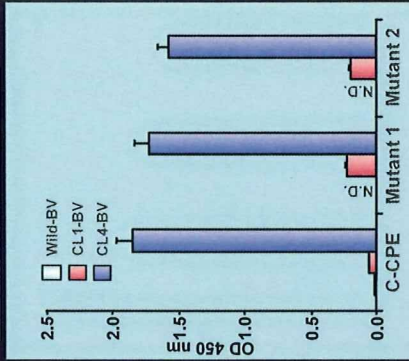


Claudin-1結合ファージのスクリーニング

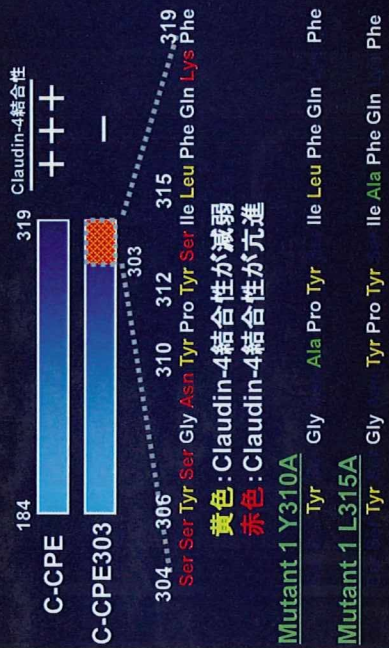
Claudin-1結合ファージ



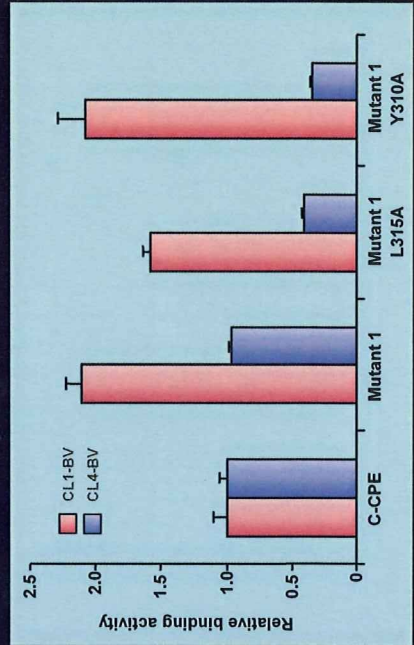
Claudin-1蛋白質結合性



Claudin-1 binderの作製

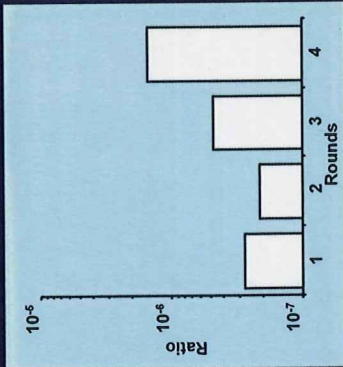


Claudin-1 binderの取得

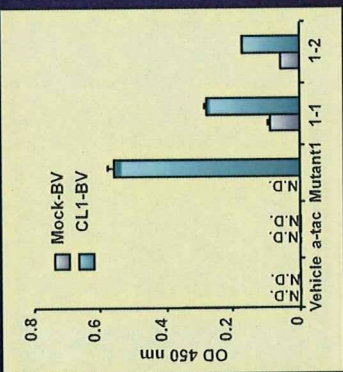


Claudin-1 結合性ペプチドの作製

ライブラリの濃縮率



Claudin-1結合性ファージ



研究成果のまとめ

① C-CPE構造変異体ライブラリの作成



② Claudin-1 binder探索系の構築



③ Claudin-1 binderの取得



今後の予定

- ① Claudin-1 binderの創製
- ② Claudin-1 binderのHCV感染阻害活性評価
- ③ 疫学的解析の準備および実施

平成 21 年度 肝炎等

克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題： 肝炎の予防および治療対策に関する費用対効果分析課題番号： H20-肝炎-一般-013研究代表者： 井出 博生**I. 研究の意義**

(1)わが国にはB型、C型を合わせて250万人のウィルスキャリアがいると推計されているが、WHOによると、わが国はB型肝炎ウィルスワクチンの universal vaccination が導入されていない世界29カ国の内の1カ国である。

(2)多くの先進国ではワクチン接種をはじめとしたB型肝炎の予防、治療に関する費用対効果分析が行われているが、わが国ではごく一部を対象とした分析しか行われていない。

II. 研究の目的、期待される成果

(1)B型肝炎ウィルスの母子感染、輸血・血液製剤による感染の防止については考えうる対策が実施されており、現在の社会的問題は①主として性交渉を通じた感染の予防、②キャリアに対する適切な治療の提供である。

(2)本研究では、上記の①および②について考えられる対策（ワクチン接種、ステージに応じた諸々の検査法や治療法）に関する費用対効果分析を行う。ワクチン接種、検査法、治療法の費用対効果が明らかになれば、特に経済的な側面から望ましい肝炎対策への資源配分のあり方を検討することができる。

(3)本研究は肝炎対策の経済的な側面のみを分析するものであり、直接的に研究結果を予防対策等の政策、治療ガイドラインに反映させることはできないが、結果を意識啓発等に利用することができる。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者（井出博生）

(1)1990年代以降に実施されたB型肝炎の予防および治療対策に関連した費用対効果分析のレビューを行った。国民の中における感染率が日本と同程度かそれ以下の国では universal vaccination の費用対効果が高いこと、感度分析の結果からはワクチン費用を主とする接種コストの影響が大きいことがわかった。予防に関してワクチン接種以外の方法（教育等）に関する費用対効果分析を行った研究もあったが、ごく少数であった。一方で分析モデルに関しては、十分に手法、基礎的なデータの質が担保された研究ばかりではないことが明らかとなった。

(2) B型肝炎ワクチンの全員接種を目指す universal vaccination と、ハイリスクグループを接種対象とする selective vaccination、現行の状態が継続される場合の推移をシミュレーションするためのモデルを構築した。これまでに世界で発表されている同種の研究に残されている最大の課題は、単一のコホートにおける費用対効果の分析のみを行っており、集団免疫の効果が考慮されていないことにあるが、この効果を取り入れるモデルを構築した。その他、われわれの研究ではマルコフモデルではなくマイクロシミュレーションを取り入れるなどの工夫を行っている。今回構築したモデルは、他の事象にも転用可能である。

・研究分担者(新秀直)

(1) シミュレーションを実行する上では疫学データ等が必要であるが、文献などを参照したとしても、わが国で利用可能なそれらのデータには限りがある。この課題を解決すべく、他研究班に対して DPC 関連データの情報利用の依頼、研究者らが所属する医療機関のデータ使用の許可を得て、劇症・急性肝炎の発生頻度、肝炎に起因する疾病に要する医療費等のデータを収集した。

IV. 22年度の課題

(1) 平成 21 年度までにシミュレーション上、感染者数の推移に関する結果は得られる見込みであるので、これと対比させるための費用関連のデータ(医療費、労働力損失等)に関するデータを収集する。文献、また平成 21 年度に試みた大規模データベースの利用によってデータが得られない場合には、専門家に対する聞き取り調査等を行う。

(2) 感度分析として複数パターンのシミュレーションを行うなどして得た結果について、妥当性の外部評価等を行い、精度を向上させる。

V. 行政施策への貢献の可能性

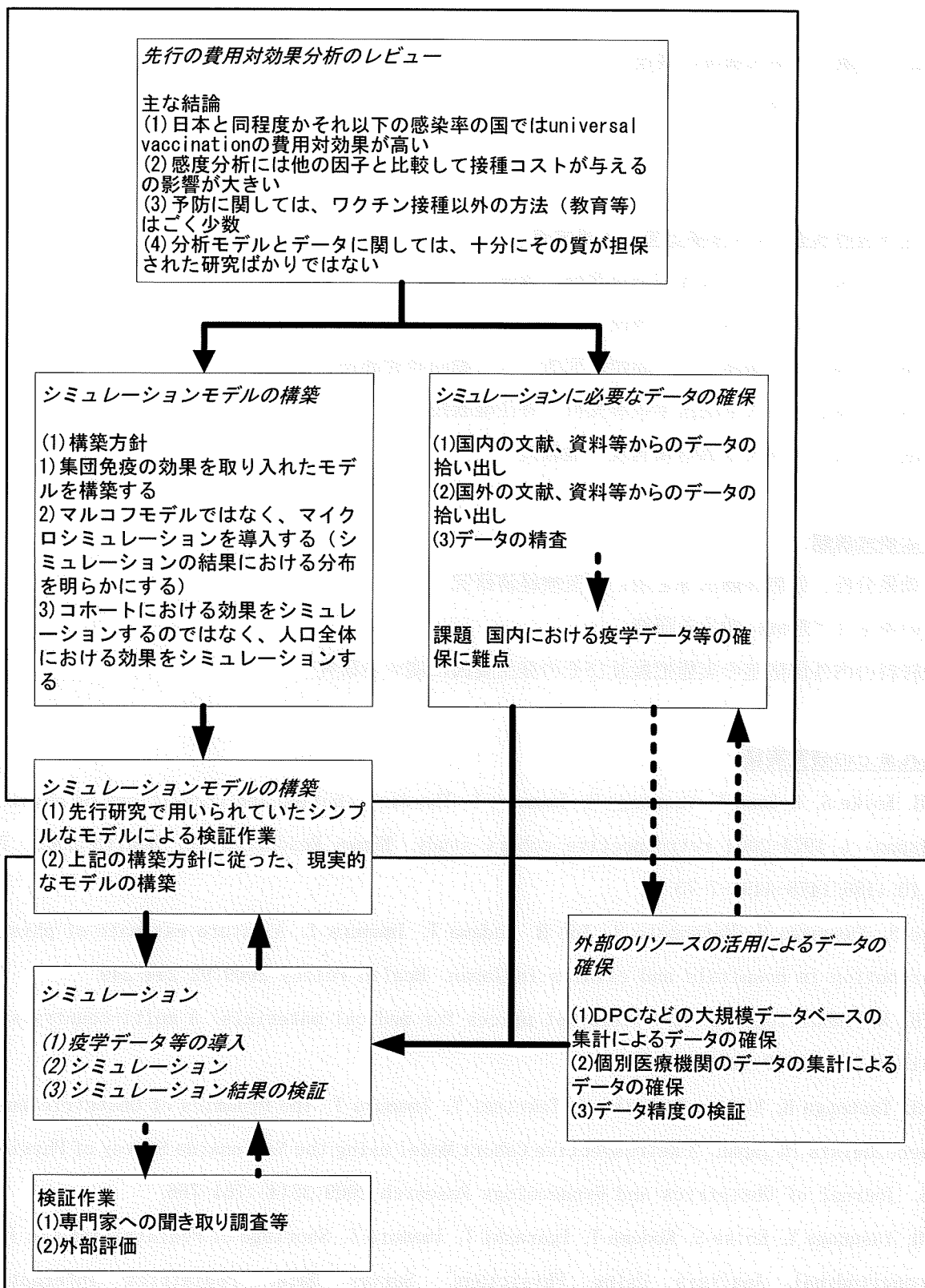
(1) 一般に、B型肝炎の予防に関しては、ワクチン接種が最も費用対効果が高い方法であるとされているが、わが国の環境下でこのことは検証されていない。universal vaccination を政策として導入することの是非が論じられているが、少なくとも費用対効果は必須の検討項目である。

(2) ワクチン接種に対する不安感を本研究の結果から払拭することは難しいかもしれないが、本研究の結果および諸外国における対策の実施状況を紹介することで、universal vaccination が国民に受け入れられる土壌を形成することができる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

特になし

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等



○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

東京大学医学部附属病院

Harvard School of Public Health

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

大江和彦 東京大学大学院医学系研究科 教授

今村知明 奈良県立医科大学 教授

金子隆一 国立社会保障・人口問題研究所 人口動向研究部長

康永秀生 東京大学大学院医学系研究科 特任准教授

小池創一 東京大学医学部附属病院 准教授

・主な研究課題

費用効果分析、仮想評価法等を用いた医療経済研究

医師のキャリア形成に関する研究

医療材料の内外価格差の実態把握及びその発生要因に関する研究

・これまでの研究実績

Ide H, Koike S, Kodama T, Yasunaga H, Imamura T. The distribution and transitions of physicians in Japan: a 1974-2004 retrospective cohort study. *Human Resources for Health* 2009, 7:73. doi:10.1186/1478-4491-7-73

Koike S, Yasunaga H, Matsumoto S, Ide H, Kodama T, Imamura T. A future estimate of physician distribution in hospitals and clinics in Japan. *Health Policy* 2009;92:244-249

Ide H, Mollahaliloglu S. How firms set prices for medical materials: A multi-country study. *Health Policy* 2009;92(1):73-78

Ide H, Yasunaga H, Kodama T, Koike S, Taketani Y, Imamura T. The Dynamics of Obstetricians and Gynaecologists in Japan: A Retrospective Cohort Model using the Nationwide Survey of Physicians data. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2009;35(4):761-766.

Ide H, Yasunaga Y, Koike S, Kodama T, Igarashi T, Imamura T. Shortage of Pediatricians in Japan: a Longitudinal Analysis Using Physicians' Survey Data. *Pediatrics International* 2009;51:645-649.

Koike S, Matsumoto S, Kodama T, Ide H, Yasunaga H, Imamura T. Estimation of physician supply by specialty and the distribution impact of increasing female physicians in Japan. *BMC Health Services Research* 2009; 9:180

肝炎の予防および治療対策に関する 費用対効果分析 (H20-肝炎-一般-013)

研究代表者
井出博生 (東京大学医学部附属病院)

背景

- WHOによると、わが国はB型肝炎ウイルスワクチンのUniversal Vaccinationが導入されていない世界29カ国の内の1カ国である。
- 多くの先進国ではワクチン接種をはじめとしたB型肝炎の予防、治療に関する費用対効果分析が行われており、政策にも反映されているが、わが国ではC型肝炎ウイルスに関連したごく一部の分析しか行われていない。
- 先進国では費用対効果分析 (Cost Effectiveness Analysis) や、これを含む先ずるComparative Effectiveness Analysis (CEA) が政策的意思決定に導入される機運が高まっている。

目的、期待される成果

- 本研究では、B型肝炎ウイルス感染の予防に関する費用対効果分析を行う。
- 本研究を行うことによって、特に経済的な側面から望ましい肝炎対策のあり方を検討することができる。
- また、必ずしも直接的に研究結果を予防対策等の政策、治療ガイドラインに反映させることはできないかもしれないが、結果を意識啓発等に利用することができる。

先行研究と今回の研究の相違点

先行研究

- ある1世代(主に1年間に生まれた新生児)を仮定
- HB感染確率はシミュレーションの間不変と仮定

今回の研究

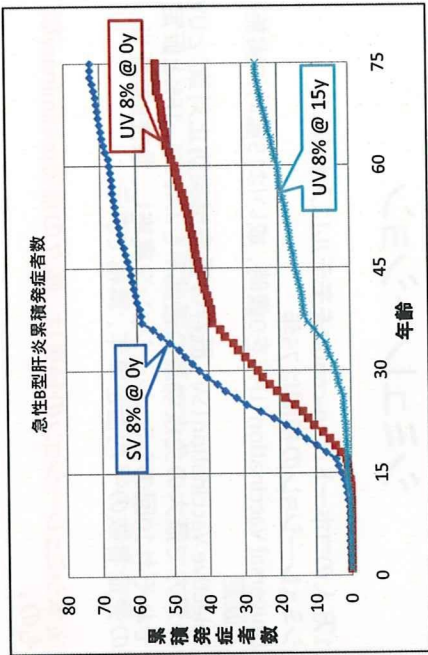
- デフォルトモデルでは、先行研究同様に、ある1世代(主に新生児)を仮定
- デフォルトモデルの拡張版では、(1) 上述の確率はダイナミックに変動すると仮定、(2) herd immunity effect (集団免疫) の効果を取り入れるために、non-cohort、更には複数世代の cohort モデルに包含 (B型肝炎に関する費用対効果分析では世界的に先行研究なし、現在、本研究で構築したモデルをテスト中)
- 日本で既の実施されている垂直感染防止対策、日本人の性行動などを取り入れて、日本の実情に即したモデルを構築

シミュレーション

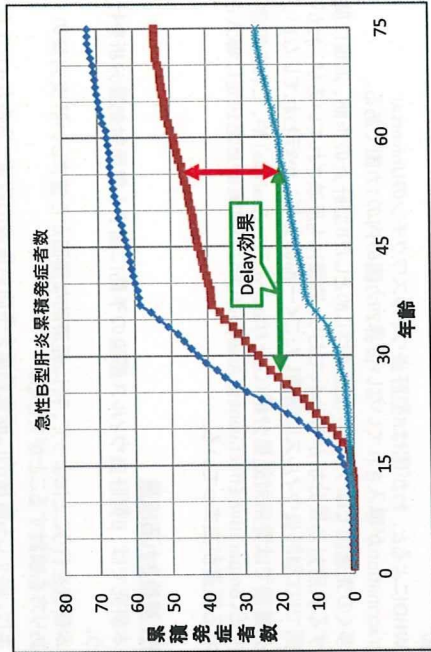
- 1万人のコホート (non-cohort) をモデルに入れない
- シミュレーションの期間は75年
- Universal Vaccination (UV) を0歳時、或いは15歳時に実施と仮定
- Selective Vaccination (SV、既存の垂直感染防止対策) とUVの双方で最大の免疫効果の逡減率を2%、8%、16%と仮定
- それぞれ10回のシミュレーションを実施し、急性B型肝炎の発症者数の平均値を単年、累積で表示

※本シミュレーションの結果は、諸々の点でpreliminaryなもの。

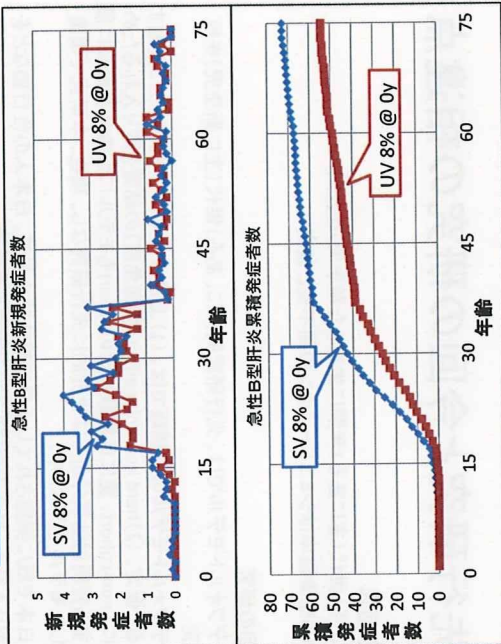
UV年齢変更による効果



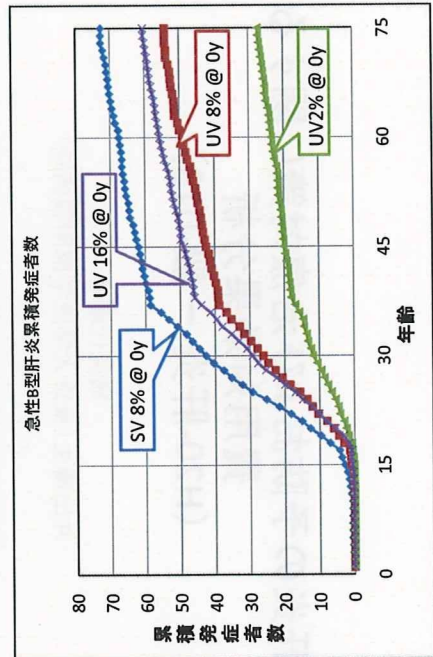
Delay効果



ワクチン接種方法変更による効果



免疫効果の逓減率の変化による効果



コメント

- ここでは急性性B型肝炎発症者数を示したが、感染によつて肝硬変、肝がんなどの病態への移行があり、それぞれの状態に移行する者の数、費用等を併せて考える必要がある。
- ここに示した結果は、費用対効果の評価という点で、SVを否定するものではない。なぜならば、SVとUVに要する費用は全く異なり(先行研究では、SVの方が費用が低いとされている)、ここでは費用の検討を行っていないからである。
- UVには、単に感染者数を減少させるだけではなく、感染時期をdelayさせる効果もある。⇒ delayによる効果は、労働力損失、罹患期間の短縮による医療費の削減などを考えれば明らかである。

今後の計画

- 疫学データなどとの照合によるモデルの評価 ⇒ モデルおよびモデル中のパラメータの改善
- 拡張モデルによるシミュレーション、拡張モデルの発展
- 「費用対効果分析の実施 ⇒ 費用対効果分析には、ワクチン接種費用、医療費、労働力損失などのコストを把握することも必要
- 疫学的な実態の把握 ⇒ DPCデータから劇症肝炎の実数を把握する試みを実施

わが国におけるワクチン政策の検討に必要な要素(例)

- ワクチン自体の価格
- ワクチン接種の実施率(完遂率)
- 免疫効果の減衰の程度
- 現状の新規感染者数(率)
- 国際的な人の移動の影響

劇症肝炎の実数把握 -DPCを用いた推計

1. 背景
 - DPCに参加している医療機関数は、平成21年度で1,552(全病院数は8,862)であり、病床数は480,051(全病床数は913,234)である。
 - データの収集期間は各年度で半年(7月1日～12月31日)に遡院した患者)である。
 - この大規模なデータベースには、疫学調査や症例登録の精度は期待できないが、疾患や治療法の実数の把握、非常に稀な疾患の発生頻度を把握するために有用である。
2. 試行的な検索
 - 「主簿病名」、「入院の契機となった簿病名」、「医療資源を最も投入した簿病名」のいずれかに「劇症肝炎」などと記載された症例を検索した。
 - このデータからは、生年月日、入院経路、転帰、手術等の内容等がわかる。
 - その他関連のデータを利用することで、入院時の投薬・注射、処置、検査などの詳細、医療費を得ることが可能である。

3. 平成20年度データの要約

生年	男性		女性		計	%
	人数	%	人数	%		
～1940年代	47	36	83	43%		
～1950年代	21	10	31	16%		
～1960年代	18	8	26	13%		
～1970年代	7	16	23	12%		
～1980年代	4	0	4	2%		
～1990年代	6	4	10	5%		
～2000年代	11	7	18	9%		
合計	114	81	195			

退院時転帰	男性		女性		計	%
	人数	%	人数	%		
治療	50	43%	27	33%	77	3%
寛解	4	1%	1	1%	5	1%
不寛	4	9%	9	13%	13	7%
増悪	4	1%	1	5%	5	3%
死亡	34	31%	31	65%	65	33%
死亡(その他の理由)	7	3%	3	10%	10	5%
その他	14	5%	5	19%	19	10%
合計	114		81		195	

- 入院経路
 - 院内出生(1)、一般入院(190)、その他の病棟からの転棟(4)
 - 他院からの紹介 あり(113)、なし(79)、不明(3)
- 予定/緊急
 - 予定(39)、緊急(153)、不明(3)
- 救急車による搬送
 - あり(62)、なし(130)、不明(3)
- 生体部分肝移植実施例
 - 男性(7)、女性(7)

平成 21 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中の B 型肝炎ウイルス再活性化への対策に関する研究

課題番号：H20-肝炎-若手-014

研究代表者：楠本 茂

I. 研究の意義

(1) 本研究が対象とする、リツキシマブ+ステロイド併用化学療法による治療を行う B 細胞性非ホジキンリンパ腫のうち 20-25%が HBs 抗原陰性ハイリスク群に相当し、それらハイリスク群の HBV 再活性化のデータは限られており、その対策方法は確立されていない。

(2) 本研究は世界で初めての HBV-DNA モニタリングによる多施設共同前方視的臨床研究となる。本研究を通して HBV-DNA モニタリングによる標準的対策法が確立できれば、世界に発信できる極めて重要な臨床研究となりうる。

II. 研究の目的、期待される成果

<目的> HBV-DNA モニタリングによる多施設共同前方視的研究では、HBs 抗原陰性ハイリスク群悪性リンパ腫に対するリツキシマブ+ステロイド併用化学療法治療中の HBV 再活性化の頻度を明らかにすることおよび HBV-DNA を早期に検出し抗ウイルス薬を投与する対策法 (“preemptive therapy”) を確立するためのデータを集積する。保存検体を用いた付随研究では、1) 超高感度 real-time detection PCR 法により微量の HBV-DNA 検出を試み、早期診断の臨床的有用性を検証する。2) HBV 再活性化した症例に関しては、HBV-DNA の遺伝子配列を決定することで、輸血後肝炎との鑑別のみならず、再活性化ハイリスク群および劇症化に寄与する遺伝子型や遺伝子変異の同定を試みる。

<期待される成果>

(1) HBV-DNA モニタリングによる HBV 再活性化対策が確立できれば、肝炎・肝障害による入院、劇症肝炎による死亡、リンパ腫治療中止による再発・再燃を最小化することができる。また、ウイルス耐性化や医療経済への負担を軽減できる。

(3) HBV 再活性化の問題は、リツキシマブ+ステロイド併用化学療法だけでなく、長期の免疫抑制を要する自己免疫疾患例や臓器移植の領域においても問題となっており、本研究における対策は“モデルケース”となることが期待できる。

III. 2年間の研究成果

- 1) HBV-DNA モニタリングに関する前方視的臨床研究の実施計画書作成および試験開始
- 2) 症例登録：120 例 (平成 20 年 8 月～平成 21 年 11 月、登録継続中：目標症例数 321 例)
- 3) HBV 再活性化に関連する因子の検討 (臨床経過、genotype, gene mutation の測定)