

林和彦、片野義明、中野功、石上雅敏、本多隆、舘佳彦、土居崎正雄、清水潤一、石津洋二、小野幸矢、及部祐加子、林寛子、豊田秀徳、熊田卓、浦野文博、吉岡健太郎、後藤秀実:C型慢性肝炎におけるNS3領域の変異についての検討 第97回日本消化器病学会総会 東京 2011.5

石上雅敏、大西康晴、伊藤孝司、片野義明、木内哲也、後藤秀実:肝移植におけるレシピエント年齢のインパクト—貴重な医療資源であるグラフトを有効に分配するための一考察 第47回日本肝臓学会総会ワークショップ8 肝移植—現状と今後の課題 東京 2011.6

舘佳彦、片野義明、中野功、石上雅敏、林和彦、本多隆、土居崎正雄、清水潤一、石津洋二、小野幸矢、及部祐加子、林寛子、後藤秀実、鮫島庸一:標準的BMIを有するC型慢性肝炎患者における肝脂肪化のPEG-IFN α -2b、RBV併用療法の治療効果への関連性についての検討 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011.6

森井正哉、片野義明、後藤秀実:BCAA製剤内服による肝硬変患者の肝脂肪化に与える影響について 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011.6

石上雅敏、片野義明、後藤秀実:Genotype2、3型高ウイルス症例におけるPEG-IFN+Ribavirin併用療法におけるSVRに至らなかった症例での要因の検討 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011.6

本多隆、片野義明、林寛子、及部祐加子、小野幸矢、石津洋二、清水潤一、土居崎正雄、舘佳彦、林和彦、石上雅敏、中野功、石川哲也、後藤秀実:ペグインターフェロン、リバビリン併用療法における凝固因子の検討 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011.6

石津洋二、及部祐加子、林寛子、小野幸矢、清水潤一、土居崎正雄、舘佳彦、本多隆、林和彦、石上雅敏、片野義明、後藤秀実:高フェリチン血症を伴う慢性C型肝炎患者の臨床的特徴 第47回日本肝臓学会総会 東京 2011.6

Ishigami M., Onishi Y., Ito K., Katano Y., Kiuchi T., Goto H. Risk factors of LDLT in patients with liver cirrhosis in resent era of comprehensive indication; Significance of recipient age and preoperative fasting blood glucose. The 17th International Liver Transplantation Society Valencia 2011.6

石津洋二、片野義明、後藤秀実:C型慢性肝炎患者における鉄過剰とHFE遺伝子変異、hepcidinとの関連性 第15回日本肝臓学会大会 シンポジウム 14 代謝性・遺伝性肝疾患研究の進歩 福岡 2011.10

舘佳彦、片野義明、中野功、石上雅敏、林和彦、本多隆、葛谷貞二、土居崎正雄、石津洋二、及部祐加子、増田寛子、中野聡、後藤秀実:C型慢性肝炎患者におけるIL28B遺伝子多型及びCore70アミノ酸置換の肝脂肪化への影響とPEG-IFN、RBV併用療法への関連性 第15回日本肝臓学会大会 福岡 2011.10

増田寛子、中野聡、及部祐加子、石津洋二、土居崎正雄、舘佳彦、本多隆、林和彦、石上雅敏、片野義明、後藤秀実:C型慢性肝炎のインターフェロン治療後著効例の発癌の検討 第15回日本肝臓学会大会 福岡 2011.10

本多隆、片野義明、中野聡、増田寛子、及部祐加子、小野幸矢、石津洋二、土居崎正雄、葛谷貞二、舘佳彦、林和彦、石上雅敏、中野功、石川哲也、後藤秀実:高齢者C型慢性肝炎におけるペグインターフェロン/リバビリン併用療法の発癌抑制効果 第53回日本消化病学会大会 福岡 2011.10

Honda T., Katano Y., Kuzuya T., Tachi Y., Hayashi K., Ishigami M., Nakano I., Goto H. Efficacy of combination therapy peginterferon alfa-2b and ribavirin on prevention of hepatocellular carcinoma in older patients with chronic hepatitis C. The 62nd American Association for the Study of Liver Diseases San Francisco 2011.11

Hayashi K., Katano Y., Honda T., Ishigami M., Goto H., Toyoda H., Kumada T. Association between a single-nucleotide polymorphism of interleukin 28B and mutations in the NS5A region of hepatitis C virus genotype 2 with response to pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin combination therapy. The 62nd American Association for the Study of Liver Diseases San Francisco 2011.11

Tachi Y., Ishigami M., Hayashi K., Honda T., Katano Y., Kuzuya T., Goto H. The substitutions in amino acid 70 in the hepatitis C virus genotype 1b core region correlate with liver steatosis and insulin resistance in non-obese patients with chronic hepatitis C. The 62nd American Association for the Study of Liver Diseases San Francisco 2011.11

片野義明、林和彦、後藤秀実:1型高ウイルス量C型慢性肝炎に対する新薬を考慮した治療戦略 第39回日本肝臓学会西部会 シンポジウム1 テーラーメイド医療時代のC型肝炎治療戦略 岡山 2011.12

林和彦、片野義明、中野聡、増田寛子、及部祐加子、石津洋二、葛谷貞二、館佳彦、石上雅敏、中野功、豊田秀徳、熊田卓、後藤秀実:C型慢性肝炎(genotype2)に対するペグインターフェロン α 2b・リバビリン併用療法の効果とインターフェロン感受性決定領域、IL28Bについて 第39回日本肝臓学会西部会 岡山 2011.12

増田寛子、中野聡、及部祐加子、石津洋二、葛谷貞二、館佳彦、本多隆、林和彦、石上雅敏、片野義明、後藤秀実:C型慢性肝炎のインターフェロン治療後の発癌の検討 第39回日本肝臓学会西部会 岡山 2011.12

樹状細胞と抗 PD-1 抗体を用いた肝癌に対する免疫療法の検討

研究分担者 江口 潤一 昭和大学医学部消化器内科 助教

研究要旨

肝癌患者は全身状態の悪化により免疫抑制状態に陥っていることが多く、免疫療法で癌を治療するには、より効果的な抗腫瘍免疫を誘導する必要がある。本研究では肝癌に対する樹状細胞療法に抗 PD-1 抗体を併用する免疫治療について検討した。マウス肝癌細胞株の皮下腫瘍モデルにおいて樹状細胞療法と抗 PD-1 抗体を併用したところ、樹状細胞単独療法と比較して有意に高い抗腫瘍効果が得られることがわかった。樹状細胞療法に抗 PD-1 抗体を併用して治療したマウスの腫瘍内には CD4、CD8 および CD11c 陽性細胞が多く浸潤していることが証明された。樹状細胞と抗 PD-1 抗体を併用することにより、強い腫瘍特異的細胞傷害活性が誘導された。抗 PD-1 抗体を併用することにより、樹状細胞の抗腫瘍作用を増強することが可能であり、今後これらの併用療法の臨床への応用が期待できると考えられた。

A. 研究目的

肝細胞癌患者のほとんどが肝硬変あるいは線維化の進行した慢性肝炎を合併しているため、全身状態の悪化している症例をしばしば認める。そのため進行例においては集学的治療を十分に行うことができないことが多く、副作用の少ない有効な治療法の開発が急務である。免疫療法もその一つとして期待されているが、担癌患者では免疫機能が低下しているため、強く効果的な抗腫瘍免疫を誘導する必要がある。今回我々は生体において活性化リンパ球を沈静化する負のシグナルの伝達に参与する PD-1 を阻害する事により、従来の免疫療法をより効果的にすること

が可能であると考えた。本研究では強い抗腫瘍効果を持つ樹状細胞療法に抗 PD-1 療法を併用した免疫療法に対する評価を行うことを目的とする。

B. 研究方法

肝癌細胞株として、マウス肝癌細胞株 BNL を用いた。In vivo の治療モデルとして、野生株を皮下接種しあらかじめ皮下腫瘍を形成したマウスに、樹状細胞 3×10^6 cells と抗 PD-1 抗体 (250 μ g/mouse) とを治療目的に投与した後、野生株腫瘍の大きさを測定した。また、同治療モデルで野生株腫瘍内に浸潤している免疫細胞を、免疫組織染色で観察した。さらに、

樹状細胞と抗 PD-1 抗体で免役したマウスの脾細胞を用いて、⁵¹Cr-release 法で腫瘍特異的細胞傷害活性を測定した。

(倫理面への配慮)

昭和大学動物実験委員会に動物実験実施申請書を提出し、倫理規定と照合された結果、実験実施の承認を得た。

C. 研究結果

樹状細胞と抗 PD-1 抗体を併用して治療することにより、樹状細胞や抗 PD-1 抗体単独治療と比較し、野生株腫瘍の増大が有意に抑制された($p=0.033$ vs. 抗 PD-1 抗体単独治療群、 $p=0.048$ vs. 樹状細胞単独治療群)。樹状細胞と抗 PD-1 抗体で治療したマウスの野生株腫瘍内には、CD4、CD8 および CD11c 陽性細胞が多く浸潤していた。さらに樹状細胞と抗 PD-1 抗体で免役したマウスの脾細胞からは、他の治療群と比較して、より強力な腫瘍特異的細胞傷害活性を誘導することが可能であった。

D. 考察

抗原提示細胞として、生体内の免疫を誘導する樹状細胞の抗腫瘍作用を、抗 PD-1 抗体は増強することが明らかとなった。これらの治療は、今後の臨床への応用も期待できると考えられた。

E. 結論

樹状細胞と抗 PD-1 抗体の併用療法は、マウス肝癌に対し抗腫瘍効果が認められ、

今後、臨床応用が期待できると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kajiwara A, Doi H, Eguchi J, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Omori R, Hiroishi K, Imawari M. IL-4 and CpG therapy suppresses the outgrowth of tumors by activating tumor-specific Th1-Ttype immune responses. *Oncology Reports* (in press)

2. 学会発表

1) Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S, Hiraide A, Sakaki M, Doi H, Omori R, Kajiwara A, Imawari M. Efficacy and mechanism of Dendritic cell based immunotherapy in combination with Programmed cell death 1 blockade on murine hepatocellular carcinoma model. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.

2) Sasagawa A, Kajiwara A, Ohmori R, Ishii S, Eguchi J, Hiroishi K, Imawari M. Expression of inhibitory molecules on peripheral blood lymphocytes are up-regulated in autoimmune hepatitis. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. San Francisco. 2011.

3) 江口潤一、広石和正、井廻道夫. 消化器癌に対する免疫療法の検討. 第 53 回日本消化器病学会大会. 福岡. 2011.

- 4) 大森里紗、江口潤一、梶原敦、土肥弘義、坂木理、平出綾子、石井成明 広石和正、井廻道夫. IFN- α と抗 PD-1 抗体を用いた消化器癌に対する免疫療法の検討. 第 53 回日本消化器病学会大会. 福岡. 2011.
- 5) 石井成明、広石和正、江口潤一、平出綾子、大森里紗、梶原敦、井廻道夫. マ

ウス肝癌に対するサイトカイン遺伝子導入 allogenic 癌細胞による免疫療法. 第 47 回日本肝臓学会総会. 東京. 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書

ウイルス性肝炎・肝がんにおける抗原特異的な免疫制御に関する研究

研究分担者 中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨： 独自に確立した世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースに基づいて、肝がん特異的な14種類のがん抗原におけるHLA-A24モチーフ拘束性の細胞障害性Tリンパ球（CTL）抗原ペプチド27個を同定してきた。そこで、抗原ペプチドに対するCTLの反応性をELISPOT法などハイスループットな手法を用いて検討した。対象とした肝がん患者のうち77.4%にいずれかのペプチドに対する陽性反応を認めた。なかでもcyclophilin B, SART2, SART3, p53, MRP3, AFP, hTERTに対する反応が高頻度に認められた。さらに、GMPグレードのペプチドワクチンを作製して肝がん患者に対する安全性臨床研究を施行し、NCI-CTCグレード3以上の有害事象が出現しないことを確認した。これより、肝がん患者における免疫原性の高い抗原ペプチドが同定されるとともに、ペプチドワクチンの安全性が示唆された。

A. 研究目的

肝がんの発がんや治療後の再発を制御する戦略として、腫瘍抗原特異的な免疫反応によって抗腫瘍効果を誘導する手法の有用性が示唆されている。我々は世界最大規模の肝臓発現遺伝子データベースに基づいて、肝がん特異的な14種類のがん抗原におけるHLA-A24モチーフ拘束性の細胞障害性Tリンパ球（CTL）抗原ペプチド27個を同定してきた。そこで、抗原ペプチドに対するCTLの反応性をELISPOT法などハイスループットな手法を用いて検討した。さらに、GMPグレードのペプチドワクチンを作製して安全性臨床研究を実施した。

B. 研究方法

HLA-A24陽性の肝がん患者および対照としてC型慢性肝炎患者、健常者について検討した。14種類のがん抗原（ART1, ART4, Cyp-B, Lck, MAGE-A1, MAGE-A3, SART1, SART2, SART3, Her-2/neu, p53, MRP3, AFP, hTERT）におけるHLA-A24モチーフ拘束性の抗原ペプチド27個を用いて末梢血より細胞障害性Tリンパ球（CTL）を誘導し、肝がん細胞株に対する障害活性を測定した。また、ELISPOTアッセイによってCTLの割合を測定した。

一部のエピトープについてGMPグレードのペプチドワクチンを作製して、肝がんの二次発がんや進展した病態に対する安全性を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたっては、倫理性・安全性の確保に十分配慮した。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従

うとともに、実施機関の「医学部倫理審査委員会」の審査体制のもとに行った。また、個人情報保護の観点からすべてのサンプル及び結果は番号化した。

C. 研究結果

- 1) 肝がん患者の77.4%において、27個のペプチドのいずれかにCTL反応（ELISPOTなど）を認めた。また、23個（85.2%）のペプチドがいずれかの患者に認識された。
- 2) 検討したがん抗原の中では、cyclophilin B, SART2, SART3, p53, MRP3, AFP, hTERTに対する反応が高頻度（10-19%）に認められた。
- 3) 5種類のがん抗原（hTERT, AFP, SART2, SART3, MRP3）に対するGMPグレードのペプチドワクチンを作製して、安全性臨床研究を実施した。
- 4) ラジオ波焼灼療法（RFA）後にペプチドワクチンhTERTを2週間間隔×3回皮下投与する臨床研究では、0.03→3.0mgへのドーズエスカレーションを行い、NCI-CTCグレード3以上の有害事象が出現しないことを確認した。
- 5) ペプチドワクチンhTERTを投与した症例において、CTL反応の亢進する例を観察した。
- 6) 進行肝がん症例に対するペプチドワクチンAFPの安全性臨床研究を開始した。

D. 考察

肝がんに対する特異的な免疫反応を同定することは、新規の標的治療の開発につながるものと考えられる。これまでAFPタンパ

クに対する免疫治療の試みがなされ、CTL反応を誘導することに成功はしたものの、腫瘍縮小効果は得られなかったと報告されている。そこで、本研究では新たな標的となる抗原ペプチドエピトープの同定を検討した。

肝がん患者においてCTL陽性反応を高率に誘導するペプチドエピトープがスクリーニングされた。このうち既報および自験の基礎検討に基づいて、5種類のがん抗原に対するペプチドワクチンを作製した。これらを患者に投与することによって、ペプチドエピトープに対するCTLをはじめとする免疫反応が誘導されて、がん細胞の増殖抑制、細胞死が誘導されるという理論に基づいている。このうち本年度は、おもに投与量に関する安全性を確認する臨床研究を施行した。

ペプチドワクチンの実用化における投与方法については、投与量だけではなく、投与経路、投与回数、標準治療（手術、局所治療、化学療法）との組み合わせ、アジュバントの選択など多くの課題を克服する必要性が指摘されている。

E. 結論

肝がん患者における免疫原性の高い抗原ペプチドが同定されるとともに、本研究に用いたペプチドワクチンhTERT, AFPの安全性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 163: 165-177.
- 2) Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S: Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011; 53: 1206-1216.
- 3) Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki

T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group: Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 141: 128-140.

- 4) Takata Y, Nakamoto Y, Nakada A, Terashima T, Arihara F, Kitahara M, Kakinoki K, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S: Frequency of CD45RO+ subset in CD4+CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2011; 307: 165-173.
- 5) Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S: Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 2011; 81: 281-290.

2. 学会発表

- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: Differential Dynamics of the NF-kappaB subunits RELA and RELB in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. 第62回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California): Hepatology 54 (4, Suppl.) 1300A; 一般; poster: Nov. 8, 2011
- 2) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase of CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma and its impact for prognosis of patients. 第62回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California): Hepatology 54 (4, Suppl.) 1400A; 一般; poster: Nov. 8, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得： なし
2. 実用新案登録： なし
3. その他： なし

厚生労働省科学研究費
肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野）
分担研究報告書

ソラフェニブによる肝がん細胞のオートファジー誘導について

研究分担者： 竹原徹郎 大阪大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨： C型肝炎は肝線維化の進行とともに発癌のリスクが高くなることが知られており、肝がんは肝不全と並んで C型肝炎患者の予後を規定する重要な因子である。しかし早期肝癌に対しては局所治療をはじめとした治療法の進歩により予後の改善が認められているものの、進行肝癌は未だ予後が厳しいのが現状である。近年進行肝癌において、ソラフェニブの投与による生存期間の延長が明らかにされ認可された。しかし実際に PR や CR を得られる症例は少ないのが現状であり、その治療効果の改善は重要な課題である。そこで我々は肝癌のソラフェニブ抵抗性の一因として、オートファジーの関与を検討した。肝癌細胞株にソラフェニブを添加したところ、オートファジー経路の活性化が認められた。ソラフェニブ添加下では肝癌細胞の mTORC1 活性が抑制されており、オートファジー亢進の一因と考えられた。またオートファジーを阻害するとソラフェニブの効果が増強され、ソラフェニブによって誘導されるオートファジーは肝癌の細胞死誘導を阻害すると考えられた。肝がんのソラフェニブ抵抗性のメカニズムの一つとしてオートファジーの関与が認められ、オートファジー阻害が治療のターゲットとなりうることを示された。

共同研究者

清水 聡 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

現在ソラフェニブは肝癌に対して認可されている唯一の分子標的治療薬であり、Raf キナーゼや VEGF 受容体チロシンキナーゼの抑制を介して、細胞増殖の抑制さらには血管新生の阻害に寄与するとされている。しかしその治療効果は未だ限定的であり、

治療抵抗性の機序の解明は重要な課題の一つである。これまで我々はソラフェニブ抵抗性の機序に関してアポトーシスに着目し、研究を行ってきた。そして、Bcl-xL がソラフェニブ抵抗性の一因であるとともに、Bcl-xL 阻害薬である ABT-737 の併用がソラフェニブの治療効果を増強すると報告した。本来オートファジーは、蛋白やオルガネラの代謝回転や飢餓状態におけるエネルギー供給に重要な役割を担う細胞内分解系の一

つである。一方で、過剰な活性化により自己消化を起こし、その結果、細胞死を誘導するという役割も併せ持っているため、近年各種癌におけるオートファジーの役割が注目されている。肝癌においても、オートファジー関連遺伝子である BECN1 の発現量と予後との相関やオートファジーを介した TGF β の増殖抑制効果など、オートファジーに関する報告が相次いでいる。しかしソラフェニブがオートファジーに与える影響については十分な解析はなされておらず、未だ明確ではない。そこで我々はソラフェニブのオートファジーに対する影響およびその役割を明確にするべく研究を開始した。

B. 研究方法

肝癌細胞株 Huh7 にソラフェニブを添加し、オートファゴソーム蓄積の指標である LC3-II の経時的な変化をウェスタンブロット法にて検討した。またオートファジー経路の活性を評価するため、蛍光の変化によりオートファジーの進行をモニタリングできる mRFP-GFP-LC3 発現プラスミドを用いた解析を行った。オートファジー阻害実験では、オートファジーの誘導に必須の分子である ATG7 に対する siRNA を用いた実験とオートファゴソームの分解を阻害するクロロキンを用いた実験をそれぞれ行った。その際、肝癌細胞株の viability は WST 法を用い、アポトーシス経路の活性化については上清中の Caspase3/7 活性の測定により評価を行った。また *in vivo* においてソラフェニブがオートファジーに与える影響を検討するためにヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いた検討を行った。

C. 研究成果

肝癌細胞株 Huh7 の培養上清中にソラフェニブを添加し LC3-II の発現量をウェスタンブロット法にて検討したところ、ソラフェニブ添加1時間後より LC3-II が誘導され、24 時間後まで経時的に LC3-II の増加が認められた。続いて Huh7 に mRFP-GFP-LC3 を強制発現した後ソラフェニブを添加したところ、核周囲にオートファゴソームと考えられる黄色の点状構造物に混じって、赤色の点状構造物が誘導された。これはオートファジーの進行に伴い GFP のみが不活化し、結果蛍光シグナルが赤に変化した LC3-II の凝集と考えられ、オートファジーがオートライソソームまで進行していることが示された。

次にソラフェニブがオートファジーを誘導する機序を解明するべくオートファジーの制御に重要な役割を果たすとされている mTOR シグナリングの活性について検討した。肝癌細胞株 Huh7 にソラフェニブを添加すると mTOR シグナリング関連分子である S6K および 4E-BP1 の経時的な脱リン酸化が認められた。S6K および 4E-BP1 は mTORC1 の基質として知られているが、mTORC1 より上流のシグナル伝達分子である Akt のリン酸化はソラフェニブ作用下において亢進していた。以上より、ソラフェニブは mTORC1 の活性を抑制していると考えられた。オートファジー関連分子である ATG7 分子や BECN1 分子の発現量についても同様に検討を行ったが、ソラフェニブはこれらの発現に明らかな影響を与えなかった。

続いてソラフェニブ添加時に肝癌細胞株に誘導されるオートファジーの役割を検討

するべく、オートファジー阻害実験を行った。まず ATG7 に対する siRNA を用いた阻害実験を行ったところ、siRNA によるオートファジーの阻害のみでは細胞の viability やアポトーシス誘導に明らかな影響を与えなかった。しかし siRNA によるオートファジーの阻害下でソラフェニブを添加するとソラフェニブ単独群に比してソラフェニブのアポトーシス誘導効果を有意に増強し、viability を有意に減少させた。続いてオートファジー阻害剤であるクロロキンをを用いた阻害実験を行った。すると、クロロキンは濃度依存的にソラフェニブによるアポトーシス誘導作用を増強し、viability を減少させた。

In vivo におけるこれらの効果を検討するために、皮下腫瘍モデルを用いた検討を行った。ヌードマウスの背部に Huh7 皮下腫瘍を作成し、その皮下腫瘍が 1cm まで増大した時点でソラフェニブ投与群とコントロール群の 2 群に振り分け薬剤を 1 週間投与した。薬剤投与後、腫瘍部におけるオートファジーの活性をウェスタンブロット法により検討したところ、ソラフェニブ投与群において腫瘍部での LC3-II の発現が亢進しており、オートファジーが亢進しているものと考えられた。

続いて、この皮下腫瘍モデルにおいてオートファジー阻害剤クロロキンの併用がソラフェニブの抗腫瘍効果に与える影響を検討した。前述の実験と同様にヌードマウスに Huh7 皮下腫瘍を作成し腫瘍径が 1cm になった時点で、ソラフェニブ単剤投与群とソラフェニブ/クロロキン併用投与群の 2 群に振り分け 1 週間の投薬を行った。結果、ソラフェニブ/クロロキン併用投与群におい

てはソラフェニブ単剤投与群と比して有意に腫瘍の増大が抑制された。

D. 考察と結論

今回ソラフェニブがオートファジー経路の活性化を誘導していること、またその機序としてソラフェニブによる mTORC1 活性の抑制が明らかとなった。またソラフェニブによって誘導されるオートファジーは癌細胞において細胞死回避機構として働いていると考えられ、in vitro/皮下腫瘍モデルいずれにおいてもオートファジー経路を阻害することによりソラフェニブの抗腫瘍効果を高めることができた。

E. 研究発表

論文発表

1. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. in press.
2. Kodama T, Takehara T, Hikita H, Shimizu S, Shigekawa M, Tsunematsu H, Li W, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Kubota S, Takigawa M, Tomimaru Y, Tomokuni A, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver

- fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 121: 3343-3356, 2011.
3. Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Shimizu S, Tsujimoto Y, Hayashi N. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. *Hepatology.* 54: 240-251, 2011.
4. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Ohkawa K, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs negatively regulates Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 52: 698-704, 2010.
- #303 Requirement of BH3-only activator proteins Bid and Bim for apoptosis by genetic ablation of Bcl-xL is completely different between hepatocytes and platelets. Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Shigekawa M, Tsunematsu H, Nishio K, Nawa T, Shimizu S, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Kanto T, Hiramatsu N, Takehara T.
- #1959 Multi-kinase inhibitor sorafenib induces autophagy which confers anti-cancer drug resistance to human hepatoma cells. Shimizu S, Tsunematsu H, Kodama T, Hikita H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T.

学会発表

The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 62nd Annual Meeting, November 4 -8, 2011, San Francisco, CA

Oral

#206 Continuous hepatocyte apoptosis is sufficient for liver cancer development. Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Li W, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N, Takehara T

Poster

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

ALT 正常 C 型肝炎に対する Peg-IFN/Ribavirin 併用療法の肝発癌抑制効果について

研究分担者 平松 直樹 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 講師

研究要旨：Peg-IFN/RBV 併用療法を施行された C 型肝炎慢性肝疾患 1996 例（平均年齢：56.3±10.8 歳、平均観察期間：26.8±12.5 ヶ月）を対象とし、Kaplan-Meier 法、Log-rank 検定、Cox 比例ハザードモデルを用いて累積発癌率、肝発癌に関与する因子を検討した。

〔成績〕肝発癌に関与する因子についての多変量解析では、55 歳未満群に比し、55-65 歳群（Hazard ratio;HR:5.2）、65 歳以上群（HR:10.3）では高齢に伴って有意に発癌率が高く、男性（HR:2.9）、血小板 12 万未満群（HR:1.8）で有意に発癌が高率であった。治療効果別では、無効群に比し、再燃群（HR:0.40）、著効群（HR:0.27）で有意に発癌率が低かった。また、65 歳以上においても、性別、血小板数、治療効果は肝発癌に有意に関与し、無効群に比し、再燃群（HR:0.29）、著効群（HR:0.24）では有意に発癌率が低かった。一方、非著効群では、平均 ALT 値が 30IU/ml 以下群において、30IU/ml 超群に比し有意に肝発癌率が低率であった（ $p < 0.01$ ）。

〔結論〕Peg-IFN/RBV 併用療法の著効・再燃例では肝発癌が抑制され、非著効例では、ALT の低値維持が肝発癌抑制に重要であることが示唆された。

A. 研究目的

本邦における ALT 正常 C 型肝炎例に対する抗ウイルス治療ガイドラインでは、基本的に ALT31~40IU/L の症例については抗ウイルス療法、ALT30IU/L 以下の症例については定期的な経過観察を推奨している。今回、同ガイドラインにおける各群の抗ウイルス療法による発癌抑制効果を明らかにし、治療適応の妥当性について検討した。

B. 研究方法

大阪大学ならびに関連施設において、2004 年 12 月から 2009 年 12 月に Peg-IFN/RBV 併用療法を施行された C 型肝炎慢性肝疾患 4640 例のうち、ALT 値 40IU/L 以下の 809 例を解析対象とした。平均年齢は 56.7 歳、男性

269 例、女性 540 例、平均血小板数は 18.8 万、PEG-IFN/RBV 併用療法開始からの平均観察期間は 36.2 カ月であった。ガイドライン通り、ALT 値、血小板値で 4 つの群（A 群；ALT ≤ 30IU/L、 $15 \times 10^4 / \text{mm}^3 \leq \text{PLT}$ 、B 群；ALT ≤ 30IU/L、 $\text{PLT} < 15 \times 10^4 / \text{mm}^3$ 、C 群； $30 < \text{ALT} \leq 40 \text{IU/L}$ 、 $15 \times 10^4 / \text{mm}^3 \leq \text{PLT}$ 、D 群； $30 < \text{ALT} \leq 40 \text{IU/L}$ 、 $\text{PLT} < 15 \times 10^4 / \text{mm}^3$ ）に分類し、累積発癌率を解析した。累積発癌率、肝発癌に関与する因子は、Kaplan-Meier 法、Log-rank 検定を用いて検討した。

C. 研究結果

Genotype1 型では血小板 15 万/ μL 以上の群（A 群+C 群）に比し、PLT15 万/ μL 未満の群（B 群+D 群）では有意に著効率が低かった。血

血小板 15 万/ μ L 以上の群では、3 年累積発癌率は抗ウイルス療法の治療効果に関わらず、低率 (0~1.5%) であった。一方、血小板 15 万/ μ L 未満の群では ALT 値の 30IU/L 超、30IU/L 以下にかかわらず、NR 群に比し、SVR 群、Relapse 群で有意に発癌が抑制され、NR 群の 3 年累積発癌率が 9.5% であったのに対し、SVR 群、Relapse 群では発癌例を認めなかった。

D. 考察

ガイドラインでは、ALT31~40IU/L の症例を主に治療の対象としているが、本研究の結果からは、血小板 15 万/ μ L 未満が治療の適応の指標と考えられた。血小板 15 万/ μ L 以上の症例では、抗ウイルス療法の治療効果に関わらず、3 年発癌は低率であり、次世代の抗ウイルス療法まで待機可能と考えられた。一方、血小板 15 万/ μ L 未満の症例は現時点での抗ウイルス療法の対象であると考えられた。

E. 結論

ALT 正常 C 型肝炎症例に対する PEG-IFN/RBV 併用療法では、PLT15 万/ μ L 未満の著効または再燃例で発癌抑制効果を認め、同療法の適応と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表:

- 1) Hiramatsu N, Inoue Y, Oze T, Kurashige N, Yakushijin T, Mochizuki K, Miyagi T, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Takehara T, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Hayashi N. Efficacy

of pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for hepatitis C patients with normal ALT levels; a matched case-control study. *J Gastroenterol.* 2011 Nov;46(11): 1335-43.

- 2) Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* in press

2. 学会発表:

- 1) 平松直樹、竹原徹郎、林 紀夫. “難治性 C 型肝炎に対する新薬を踏まえた PegIFN/Ribavirin 併用療法の適応と限界” パネルディスカッション「C型肝炎治療 -新たな時代へ」第 47 回日本肝臓学会総会 (東京) 2011
- 2) 平松直樹、竹原徹郎、林 紀夫. “難治性 C 型肝炎に対する新薬を踏まえた Peg-IFN/Ribavirin 併用療法の適応と限界” シンポジウム「C型肝炎治療の新たな展開」第 15 回日本肝臓学会大会、第 53 回日本消化器病学会大会 (福岡) 2011

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

原発性肝癌における TIE2 陽性単球の意義

研究分担者 考藤 達哉 大阪大学大学院医学系研究科樹状細胞制御治療学寄附講座准教授

研究の要旨

肝癌は血流の豊富な腫瘍であり、その発生、進展、転移に血管新生が重要な役割を果たしている。TIE2 陽性単球 (TEM) は、種々の癌の血管新生に関与することが報告されている。本研究では、血液中や肝癌組織における TEM を同定し、肝癌患者における TEM と病態との関連性や肝癌による TEM の誘導機序を明らかにすることを目的とした。TEM は肝癌群において、末梢血中、肝癌組織中ともに肝硬変に比べて有意に増加していた。TEM 頻度は、肝癌における血管新生の程度 (micro-vessel) と正相関していた。TEM 頻度は、手術や局所治療後に低下し再発症例では再上昇した。また TEM は、TIE2 陰性単球から造血因子と炎症性サイトカインによって誘導された。以上の結果より、TEM は肝癌の発生、再発と密接に関連しており、その誘導機序の解明は、血管新生に関与する治療標的の同定に繋がる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝癌は血流の豊富な腫瘍であり、その発生、進展、転移に血管新生が重要な役割を果たしている。肝癌における腫瘍血管の形成機序に関しては、流血中に存在する血管内皮細胞の前駆細胞が関与するという報告があるが、組織への遊走や浸潤機序、血管への分化過程の詳細は世界的にも明らかではない。また、種々の癌患者において、免疫抑制作用を持つ制御性 T 細胞や骨髄系抑制細胞が増加、活性化しており、癌の増大、転移や治療抵抗性に関与している可能性がある。本研究では、肝癌患者を対象として、血液中や癌組織における血管内皮細胞や免疫細胞の頻度、分布、機能解析を行い、血管新生の前駆細胞の同定やそれらの癌組織への遊走、浸潤の機序、肝癌組織での細胞分化や抗腫瘍免疫細胞の機能低下の機序、免疫抑制細胞の誘導の機序を解明することを目的とする。これによって、血管新生と免疫抑制の制御に基づく肝癌に対する新規治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

肝癌 (HCC) と診断された HCV 陽性患者を対象とした。また慢性肝疾患患者 (慢性肝炎、肝硬変)、健康成人を比較対照とした。末梢血 PBMC 中、肝癌浸潤リンパ球中の TIE2 陽性単球 (TEM) の頻度や表現型を解析した。切除肝癌組織を用いて、TEM の癌組織での局在を検討した。また肝癌部、非癌部組織の血管新生を CD34 陽性細胞の染色で評価し (Micro vessel density, MVD)、TEM との関連性を検討した。末梢血から TIE2 陰性単球をソーティングし、種々の造血因子、サイトカインに

よる TEM 誘導の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は大阪大学医学部倫理委員会、臨床試験部審査評価委員会の承認を受けており、事前に被験者の同意を得ており倫理的問題はないと考える。

C. 研究結果

HCC 群において、末梢血中 TIE2 陽性単球 (TEM: CD14+CD16+TIE2+) は他群に比べて有意に増加していた。肝癌組織浸潤リンパ球中の TEM 頻度は、同一患者での末梢血と比べ有意に増加しており、TEM は血中から肝癌組織へ浸潤・集積する可能性が示唆された。また TEM は肝癌部の血管支持組織周囲に集積していた。血中、組織中の TEM 頻度と CD34 陽性細胞頻度 (MVD) は有意に正相関しており、肝癌における血管新生に TEM が関与する可能性が示唆された。また、in vitro の検討では、M-CSF と TNF- α 刺激によって、CD16 陰性 TIE2 陰性単球から CD16+TIE2+単球 (TEM) が誘導された。

D. 考察

肝癌患者では末梢血、癌組織中で TEM の頻度が増加しており、その誘導機序として肝癌由来の造血因子や癌に伴う炎症が関与する可能性が示唆された。

E. 結論

TEM は肝発癌に伴って増加しており、肝癌における血管新生に関与する可能性が示唆さ

れた。TEM 誘導機序の解明は、血管新生制御を目指す新たな治療標的の同定に繋がる可能性がある。

F.健康危険情報 なし

G.研究発表

1. 論文発表

1) Sakakibara, M., Kanto, T. *, Hayakawa, M., Kuroda, S., Miyatake, H., Itose, I., Miyazaki, M., Kakita, N., Higashitani, K., Matsubara, T., Hiramatsu, N., Kasahara, A., Takehara, T. and Hayashi, N., Comprehensive immunological analyses of colorectal cancer patients in the phase I/II study of quickly matured dendritic cell vaccine pulsed with carcinoembryonic antigen peptide. *Cancer Immunol Immunother* **60**: 1565-1575, 2011.

2) Wakita, T. *, Suzuki, T., Evans, M. J., Shimotohno, K., Chayama, K., Matsuura, Y., Hijikata, M., Moriishi, K., Seya, T., Enomoto, N., Koike, K., Kato, N., Kanto, T. and Hotta, H., Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17th international meeting on hepatitis C virus and related viruses. *Gastroenterology* **141**: e1-5, 2011.

3) Tomimaru, Y., Eguchi, H., Nagano, H.*, Wada, H., Kobayashi, S., Marubashi, S., Tanemura, M., Tomokuni, A., Takemasa, I., Umeshita, K., Kanto, T., Doki, Y. and Mori, M., Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2011.

4) Yamamoto, M., Tatsumi, T., Miyagi, T., Tsunematsu, H., Aketa, H., Hosui, A., Kanto, T., Hiramatsu, N., Hayashi, N. and Takehara, T.*, alpha-Fetoprotein impairs activation of natural killer cells by inhibiting the function of dendritic cells. *Clin Exp Immunol* **165**: 211-219, 2011

5) Tsunematsu, H., Tatsumi, T., Kohga, K., Yamamoto, M., Aketa, H., Miyagi, T., Hosui, A., Hiramatsu, N., Kanto, T., Hayashi, N. and Takehara, T.*, Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2011.

2.学会発表

1) Matsubara T, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Higashitani K, Kakita N, Miyazaki M, Hiramatsu N, Kasahara A, Takehara T. Pro-angiogenic receptor TIE2-expressing monocytes/TEM as novel diagnostic biomarker for

hepatocellular carcinoma

The Liver Meeting AASLD 62d Annual Meeting and Postgraduate Course
San Francisco, CA, USA, 2011

2) Kakita N, Kanto T, Miyazaki M, Yoshio S, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Sakakibara M, Hiramatsu N, Kasahara S, Takehara T, Hayashi N. Enhanced ability of IL28A and IL28B induction in plasmacytoid dendritic cells in chronic hepatitis C patients with major allele of IL28B single nucleotide polymorphism. The Liver Meeting AASLD 62d Annual Meeting and Postgraduate Course
San Francisco, CA, USA, 2011

H.知的財産権の出願・登録状況
特に予定なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
上田啓次 (上田)	B型肝炎のウイルス学	化学療法の領域					印刷中

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
Oze T (林)	Indications and limitations for aged patients with chronic hepatitis C in pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin combination therapy.	J Hepatol	54	604-611	2011
Tatsumi T (林)	Hepatitis C virus-specific CD8+ T cell frequencies are associated with the responses of pegylated interferon-alfa and ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C virus infection.	Hepatol Res	41	30-38	2011
Tatsumi T (林)	α -galactosylceramide activates antitumor immunity against liver tumor.	Hepatol Res	41	160-169	2011
Inoue Y (林)	Amino acid substitution in the core protein has no impact on relapse in hepatitis C genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin.	J Med Virol	83	419-427	2011
Shigekawa M (林)	Involvement of STAT3-regulated hepatic soluble factors in attenuation of stellate cell activity and liver fibrogenesis in mice.	Biochem Biophys Res Commun	406	614-620	2011

Kodama T (林)	BH3-only activator proteins, Bid and Bim, are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: Molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets.	J Biol Chem	286	13905-13913	2011
Hikita H (林)	Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice.	Hepatology	54	240-251	2011
Oze T (林)	The efficacy of extended treatment with pegylated interferon plus ribavirin in patients with HCV genotype 1 and slow virologic response in Japan.	J Gastroenterol	46	944-952	2011
Miyagi T (林)	Differential alteration of CD56-bright and CD56-dim NK cells in frequency, phenotype and cytokine response in chronic hepatitis C virus infection.	J Gastroenterol	46	1020-1030	2011
Oze T (林)	Efficacy of re-treatment with pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for patients with chronic hepatitis C in Japan.	J Gastroenterol	46	1031-1037	2011
Kodama T (林)	Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice.	J Clin Invest	121	3343-3356	2011
Sakakibara M (林)	Comprehensive immunological analyses of colorectal cancer patients in the phase I/II study of quickly matured dendritic cell vaccine pulsed with carcinoembryonic antigen peptide.	Cancer Immunol Immunother.	60	1565-1575	2011.

Ishida H (林)	Alteration in microRNA expression profile in HCV-infected hepatoma cells: Involvement of miR-491 in regulation of HCV replication via the PI3 kinase/Akt pathway.	Biochem Biophys Res Commun	412	92-97	2011
Hiramatsu N (林)	Efficacy of pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for hepatitis C patients with normal ALT levels: a matched case-control study.	J Gastroenterol	46	1335-1343	2011
Kamada Y (林)	Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high fat and high cholesterol diet.	Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol	301	G1031-G1043	2011
Tsunematsu H (林)	Fibroblast growth factor-2 enhances NK sensitivity of hepatocellular carcinoma cells.	Int J Cancer	130	356-364	2011
Shimizu S (林)	Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma.	Int J Cancer			in press
Kanto T (林)	Dynamics of regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells as immune markers for virological response in pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients.	J Gastroenterol			in press
Oze T (林)	Reducing Peg-IFN doses causes later virologic response or no response in HCV genotype 1 patients treated with Peg-IFN alfa-2b plus ribavirin.	J Gastroenterol			in press
Kohga K (林)	Interleukin-1 β enhances the production of soluble MICA in human hepatocellular carcinoma.	Cancer Immunol Immunother			in press

Yamamoto M (林)	α -Fetoprotein impairs activation of natural killer cells by inhibiting the function of dendritic cells.	Clin Exp Immunol			in press
Ito K (野村)	The rs8099917 polymorphism, when determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated alpha interferon/ribavirin therapy in Japanese patients than other single nucleotide polymorphisms associated with interleukin-28B.	J Clin Microbiol.	49	1853-1860	2011
Chayama K (野村)	Factors predictive of sustained virological response following 72 weeks of combination therapy for genotype 1b hepatitis C.	J Gastroenterol.	46	545-555	2011
Kainuma M (野村)	Pegylated interferon α -2b plus ribavirin for Japanese chronic hepatitis C patients with normal alanine aminotransferase.	Hepatol Res.	42	33-41	2011
Nomura H (野村)	Occurrence of clinical depression during combination therapy with pegylated interferon alpha or natural human interferon beta plus ribavirin	Hepatol Res.			in press
Matsuura K (野村)	Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial	Hepatol Res.	41	505-511	2011
野村秀幸 (野村)	C型肝炎の抗ウイルス療法の実際	Medical Practice	28	1435-1439	2011
野村秀幸 (野村)	C型急性肝炎の動向と診断・治療	日本臨床	69	161-164	2011
野村秀幸 (野村)	新しいプロテアーゼ阻害剤: MK7009	肝胆膵	63	1219-1223	2011