

2. 学会発表

1. Teraoka Y, Ide K, Tahara H, Basnet N, Morimoto H, Ohdan H. Genetic induction of mouse CD47 on rat insulinoma cells prevents macrophage-mediated xenograft rejection through CD47-SIRP α inhibitory signaling in mice. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
2. Igarashi Y, Ohdan H. Liver sinusoidal endothelial cells expressing carbohydrates render reactive immature B cells tolerant through PD-1/PDL-1 pathway. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
3. Hotta R, Tanaka Y, Doskali M, Ohira M, Hiraga N, Chayama K, Ohdan H. A possible adoptive immunotherapy with PBMC-Derived CD56+ cells for preventing HCV re-infection after liver transplantation. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
4. Tanaka Y, Tashiro H, Takanashi S, Chayama K, Ohdan H. Cellular Alloreactivity prior to interferon-based antiviral therapy is predictive of chronic rejection in liver transplantation recipients with recurrent hepatitis. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
5. Banshodani M, Onoe T, Tahara H, Igarashi Y, Tanaka Y, Ide K, Ohdan H. Specific suppression of allospecific T cells via the PD-1/PD-L1 pathway in an allogeneic liver endothelium repopulation model. American Transplant Congress 2011. 2011.4.30-5.4. Philadelphia, USA.
6. Tazawa H, T Irei, Y Tanaka, Y Igarashi, M Yamashita, H Tashiro, H Ohdan. Pivotal role of invariant NKT cell - B cell interaction in antibody production against transplant-associated carbohydrate epitopes. Basic Science Symposium. 2011.6.2-3. Boston, USA.
7. Ohdan H. Adoptive immunotherapy for inducing anti-HCC and anti-HCV activity after liver transplantation. 21st World congress of the international association of surgeons, gastroenterologists and oncologists. 2011.11.9-12. 東京.
8. Onoe T, Tanaka Y, Hashimoto S, Ide K, Banshodani M, Igarashi Y, Kobayashi T, Amano H, Tashiro H, Ohdan H. Continuous portal infusion of PGE1 attenuates portal hypertension and alloimmune responses in adult-to-adult living donor liver transplantation. CAST 2011. 2011.9.25-28. ソウル, 韓国.
9. Tanaka Y, Tashiro H, Ide K, Onoe T, Ishiyama K, Ohdan H. Tailoring immunosuppressive therapy on the basis of immune monitoring by a multiparametric mixed lymphocyte reaction assay reduces infectious complications and mortality in living-donor liver transplantation. CAST 2011.

2011. 9. 25-28. ソウル, 韓国.

10. Araki K, Tanaka Y, Ohdan H. A novel method for intracellular profiling of stat activation pattern in T cells responding to allostimulation. CAST 2011. 2011. 9. 25-28. ソウル, 韓国.

11. 井手健太郎, 尾上隆司, 番匠谷将孝, 田澤宏文, 寺岡義布史, 堀田龍一, 山下正博, 橋本慎二, 平田文宏, 森本博司, 田代裕尊, 大段秀樹. 胆汁中 CX3CL1 測定による移植肝グラフトの評価. 第 111 回日本外科学会定期学術集会. 2011. 5. 26-28. 東京.

12. 田代裕尊, 相方浩, 谷本新学, 天野尋暢, 大下彰彦, 小林剛, 茶山一彰, 大段秀樹. C 型慢性肝炎関連肝細胞癌切除後の PEG-IFN 療法による予後改善効果. 第 47 回日本肝臓学会総会. 2011. 6. 2-6. 3. 東京.

13. 堀田龍一, 田中友加, Marlen Dorskali, 五十嵐友香, 安部智之, 森本博司, 寺岡義布史, 山下正博, 田澤宏文, 番匠谷将孝, 井手健太郎, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. 末梢血からリモデリングした活性化 CD56⁺細胞の HCV 増殖抑制効果. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011. 7. 22-7. 23. 仙台.

14. 五十嵐友香, 大段秀樹. 肝類洞内皮細胞は PDL-1/PD-1 pathway を介し B 細胞の糖鎖抗原特異的抗体産出を抑制する. 第 47 回日本移植学会総会. 2011. 10. 4-6. 仙台.

15. 堀田龍一, 石山宏平, 大平真裕, 五十嵐友香, 田中友加, 井手健太郎, 尾上隆司, 田代裕尊, 大段秀樹. HCC を合併した肝移植患者に対する術後補助療法の確立 —活性化 NK 細胞療法の臨床経過報告—. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011. 7. 22-7. 23. 仙台.

16. 寺岡義布史, 井手健太郎, 森本博司,

田中友加, 尾上隆司, 石山宏平, 五十嵐友香, 田澤宏文, 大段秀樹. レシピエント種 CD47 遺伝子導入によるマクロファージ性拒絶抑制効果の in vivo 検証. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011. 7. 22-7. 23. 仙台.

17. 田代裕尊, 茶山一彰, 大段秀樹. ドナー由来活性化リンパ球細胞療法による生体肝移植後の敗血症予防. 第 29 回日本肝移植研究会. 2011. 7. 22-7. 23. 仙台.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

In vitro, in vivo増殖系を用いたC型肝炎ウイルス増殖のメカニズムの解析と 創薬への応用

研究分担者 国立感染症研究所・ウイルス第二部 部長 脇田 隆宇

研究要旨 本研究ではC型肝炎ウイルス（HCV）の in vitro および in vivo 増殖系を用いたウイルス増殖メカニズムの解析をおこない、その結果を創薬へ応用することを目的とする。そのために、新たなウイルス培養増殖系の確立を目指す。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）新規感染者は激減したものの、その原因ウイルスであるHCVのキャリアは約100～200万人がいまだに存在すると推定されている。その多くが肝硬変から肝臓癌へ移行する。HCV感染に対する治療法はインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが、その有効率は40-50%程度である。昨年新たな抗ウイルス薬としてプロテアーゼ阻害薬が承認され、治療の有効率は向上すると考えられるが、さらなる治療薬の開発が必要である。肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善するのみならず、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。HCVの in vitro および in vivo 増殖系を用いたウイルス増殖メカニズムの解析をおこない、その結果を創薬へ応用することを目的とする。そのために、新たなウイルス培養増殖系の確立を目指す。

B. 研究方法

1. 新規キメラマウスによる HCV 感染実験

重度複合免疫不全マウスの NOG マウスとウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベータートランスジェニックマウス（AL-uPA マウス）のすべての表現型を有するマウス（uPA-NOG マウス）にヒト肝細胞を移植し、肝細胞の生着後、肝炎ウイルスを接種する。

（倫理面への配慮）

各種研究材料の取り扱い及び組換え DNA 実験は、適切な申請を行い承認を受ける。また、本研究で使用するヒト由来試料はすでに樹立された細胞株であり倫理面での問題はないと考えられるが、新たにヒト組織などを使用する必然性が生じた場合には、文部科学省等でまとめられた「ヒトゲノム、遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び、平成13年3月29日付 12文科振第266号文部科学省研究振興局長通知に則り、当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、提供試料、個人情報を厳格に管理保存する。

C. 研究結果

NOGマウスは、重度複合免疫不全マウスで、2種類の免疫不全マウスを結びつけて作製されたマウスである。一つは、NOD/ShiJic-*scid*マウスで、やせ形糖尿病モデルマウスであるNOD/Shiマウスに、CB-17-*scid*系統の*scid* (*Prkdc^{scid}*) 突然変異遺伝子を10世代戻し交配によって導入した系統である。もう一つがIL2レセプターガンマ鎖ノックアウトマウスで、X染色体のIL2レセプターガンマ鎖遺伝子の第7,8エクソンを破壊することによって作製された、ヒトのXSCIDモデルマウスである。このIL2レセプターガンマ鎖ノックアウトマウスのIL2レセプターガンマ鎖*null*遺伝子を、NOD/ShiJic-*scid*マウスへ戻し交配によって導入したものがNOGマウスであり、実中研で樹立された。マウスアルブミンプロモーターによりウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーターを発現するトランスジェニックマウスが樹立された (AL-uPAマウス)。このマウスは生後肝不全を発症する。AL-uPAマウスはNODマウスをもとに作製され、さらにNOGマウスと戻し交配し、ホモ化したものがuPA-NOGマウスである (S uemizu et al, BBRC 2008 377:248-252)。このuPA-NOGマウスを実験室の末水博士より供与いただいた。凍結ヒト初代培養肝細胞をuPA-NOGマウスに経脾臓的に移植して作製したヒト肝細胞移植uPA-NOGマウスにHCVを接種したところ持続的な感染が成立した。

D. 考察

新たなキメラマウスを用いて、HCVの感染実験を試みた。ウイルスの持続感染が成立することから、感染したウイルスの性質を今後解析していく。抗ウイルス活性を有する低分子化合物の*in vivo*での薬効や、感染防御実験などについても実施していく予定である。

E. 結論

新規キメラマウスを用いて HCV の感染実験をおこなった。HCV はマウス肝臓に持続的に感染が成立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1: Weng L, Kohara M, Wakita T, Shimotohno K, Toyoda T. Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase. *Gene*. 2012 496(2):79-87.
- 2: Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, Wakita T. Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1. *J Virol*. 2012 86(4):2143-52.
- 3: Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, Wakita T, Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M. Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novel phenanthridinone derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 415(4):714-9.
- 4: Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26620.
- 5: Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog*. 2011 7(10):e1002289.

- 6: Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem*. 2011 286(43):37264-73.
- 7: Okamoto Y, Masaki T, Murayama A, Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, Wakita T, Kato T. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 410(3):404-9.
- 8: Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2011 92(Pt 9):2082-7.
- 9: Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine*. 2011 29(29-30):4821-8.
- 10: Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*. 2011 54(2):425-33.
- 11: 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(1):128-40,140.e1-2.
- 12: Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*. 2011;6(6):e21284.
2. 学会発表および講演など
1. 脇田隆宇, 「新型シーケンサで展開するウイルスゲノム研究」、ランチョンセミナー、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(2011, 12.14)
2. 相崎英樹、鈴木哲朗、脇田隆宇、HCV感染に伴う宿主細胞の脂質代謝の変化と代謝産物のメタボロミクス解析、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)、シンポジウム1「ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤」
3. 加藤孝宣、政木隆博、脇田隆宇、HCV JFH-1キメラ株を用いたNS5a阻害剤の株特異的抗ウイルス活性の評価、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)、シンポジウム1「C型肝炎治療の新たな展開」
4. 鈴木哲朗、脇田隆宇、HCV JFH-1株のチンパンジー感染実験で得られた適応変異株の機能解析、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)、パネルディスカッション4「肝疾患動物モデルと translational research」

5. 武田緑、池田正徳、有海康雄、脇田隆宇、加藤宜之、2種類のヒト肝細胞株を用いた HCV 感染レポーターアッセイ系の開発、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)、
6. 相崎英樹、多田有希、松本喜弘、後藤耕司、渡士幸一、鈴木亮介、田中純子、鈴木哲朗、岡部信彦、脇田隆宇、1999年から2009年における日本のC型急性肝炎の発生状況、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)
7. 加藤孝宣、村山麻子、政木隆博、相崎英樹、脇田隆宇、国内献血検体を用いたC型肝炎ウイルス陽性血漿パネルの作製とウイルス量測定法の評価、第47回日本肝臓学会総会、ホテルグランパシフィック、(2011, 6.2-3)
8. 村山麻子、三代俊治、脇田隆宇、加藤孝宣、C型肝炎ウイルス粒子の産生効率の良いHuH-7細胞サブクローンの分離と同定、第15回日本肝臓学会大会、福岡国際会議場、(2011, 10.20-21)
9. T Wakita. Hepatitis C Virus Infection and Replication, annual meeting of Prof. Juei-Low Sung's Research Foundation, Taipei, Taiwan (2011, 8.6)
10. T Wakita. HCV RNA replication and drug development. The 8th APASL Single Topic Conference Beijing, China (2011, 10.7)
11. T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Singapore-Japan Forum on Emerging Concepts in Microbiology, National University of Singapore, Singapore (2011 Nov 15-16)
12. T Wakita. Hepatitis C virus replication in vitro and persistent infection in vivo: mechanistic analysis and antiviral development, Challenges to overcome Emerging Infectious Diseases in South-eastern Asia, Siran Kaikan, Kyoto University. Kyoto (2012 Jan 13)
13. T Wakita. Hepatitis C virus replication models and anti-viral development, The 1st International Symposium on Latent TGF-beta Activation Reaction, RIKEN Kobe Inst, Ctr. For Delop Biol, Auditorium, Kobe (2012 Feb 25)
14. Takebe, Y., Uenishi, R., Tani, H., Suzuki, R., Hase, S., Akazawa, D., Takagi, M., Tsuchiura, T., Nagasawa, K., Suzuki, T., Irie, K., Shinya, K., Wakita, T., Matsuura, Y., Patel, A., Small molecules that elicit anti-HCV activity through down-modulation of HCV entry receptors, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
15. N Watanabe, K Futai, H Suga, T Wakita, E2 binding peptide identified by RAPID system inhibited HCV infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)
16. K Goto, T Kimura, K Watashi, R Suzuki, S Yamagoe, T Miyamura, K Moriya, H Yotsuyanagi, K Koike, T Suzuki, T Wakita, H Aizaki, Identification of novel NS5A-associated proteins in the host-cell membrane fraction and their role in HCV life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses.

Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

17. R Suzuki, T Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, H Aizaki, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SIGNAL PEPTIDASE COMPLEX 1 THAT INTERACTS WITH HEPATITIS C VIRUS NS2 PROTEIN AND IS INVOLVED IN THE VIRAL ASSEMBLY, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

18. J Law, D Hockman, S Frey, R Khoshy, T Wakita, J Bukh, C Rice, M Houghton, Does a vaccine derived from a single HCV strain elicit broadly cross-neutralising antibodies in humans?, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

19. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, T Wakita, T Kato, Development of chimeric hepatitis C virus expressing NS5A from strains of genotypes 1 and 2: virus production and susceptibility to NS5A inhibitor, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

20. M Fukasawa, Y Shirasago, K Saito, Y Murakami, H Fukazawa, T Suzuki, R Suzuki, T Wakita, K Hanada, J Chiba, Isolation of a highly infectious hepatitis C virus with adaptive mutations, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle

Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

21. H Yokokawa, D Akazawa, M Moriyama, N Nakamura, T Kato, K Ishii, T Wakita, Development of purification method for HCV particles using chromatographic technique, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

22. M Esumi, S Kikuta, H Yamaguchi, S Nakajima, M Ishibashi, T Wakita, Serum and trypsin inhibitors inhibit the early step of hepatitis C virus infection, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

23. M Moriyama, D Akazawa, H Yokokawa, K Nishimura, N Nakamura, H Mochizuki, T Kato, K Ishii, T Wakita, Immunological memory response to induce neutralizing immunoglobulin in HCV particles-immunized mice, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

24. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

25. N Uchida, K Watashi, R Suzuki, H Aizaki, J Chiba, T Wakita, Halopemide inhibited a post-assembly step in hepatitis C virus life cycle, 18th International Meeting on Hepatitis C and

Related Viruses. Seattle Sheraton Hotel, Seattle, USA (2011, Sep. 8-12)

26. N Watanabe, A Murayama, M Saeed, T Date, T Kato, H Aizaki, T Wakita, Identification and analysis of envelope N-glycans required for HCV lifecycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

28. Y Okamoto, T Masaki, A Murayama, A Nomoto, T Wakita, T Kato, Strain Specific Susceptibility to The Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

29. R Suzuki, K Saito, M Matsuda, K Watashi, Y Matsuura, T Wakita, T Suzuki, H Aizaki, Identification of a host factor that interacts with hepatitis C virus NS2 protein and is involved in the viral assembly, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

30. A Murayama, N Sugiyama, S Yoshimura, M Ishihara-Sugano, T Wakita, T Kato, Efficient HCV production system using HuH-7 subclone with high virus assembly efficiency, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

31. H Aizaki, Y Matsumoto, K Goto, K Watashi, R Suzuki, M Fukasawa, K Hanada, S Sato, N Takahashi, Y Matsuura, K Motojima, T Miyamura, T Suzuki, T Wakita, Identification of lipid droplet-associated membrane proteins that are involved in HCV production, XV International Congress of Virology.

Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

32. Y Matsumoto, K Watashi, R Suzuki, T Matsuura, T Suzuki, T Miyamura, K Wake, T Wakita, H Aizaki, Antiviral activity of glycyrrhizic acid against hepatitis C virus in vitro, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

33. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Identification of small molecules affecting late steps of hepatitis C virus life cycle, XV International Congress of Virology. Sapporo Convention Center, Sapporo, Japan (2011, Sep. 11-16)

34. K Watashi, N Uchida, R Suzuki, H Aizaki, T Wakita, Screening of small molecules affecting the production of hepatitis B virus, 2011 International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct 9-12, Holliday Inn Walt Disney World Resort, FL USA

G. 知的所有権の出願・登録状況

なし

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)
創薬と新規治療法開発に資するヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス制御に関する研究
分担研究報告書(平成23年度)

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた新規抗HCV薬の効果判定
研究分担者 今村道雄 広島大学病院 消化器・代謝内科 助教

研究要旨：C型肝炎患者に対し telaprevir の使用が可能となり治療成績の向上が期待されているが、telaprevir には耐性株出現の問題点がある。本研究ではC型肝炎患者あるいはHCV感染動物モデルにおいて telaprevir 投与前後の耐性株の dynamics を検討した。2,250 mg/日の telaprevir 内服中、breakthrough を生じた症例において direct sequence にて投与12週目にA156F変異株が検出されたため、NS3 156番を次世代シーケンサーを用いて deep sequence にて解析した。Telaprevir 投与前、99.9%は野生型であったが、A156F変異株が0.6%とわずかに存在していた。投与6週目にbreakthrough を発症し12週目には野生型は0.3%に減少しA156F変異が92.6%に増加していた。投与12週目の血清をヒト肝細胞キメラマウスに感染させたところ血中HCVは99.9%がA156F変異株となった。このマウスにIFNを投与したところ野生型HCV感染マウスに比べ治療効果が高く、投与1週間後には血中HCVは陰性化しており telaprevir 耐性株は野生型に比べ複製能が低下していることが示唆された。未治療のHCV患者血清を感染させたマウスにおいても telaprevir 投与前すでに0.07%のV36A変異が検出され、この変異株は telaprevir 投与後に52%に増加し breakthrough が生じた。HCVクローンを感染させたマウスでは、telaprevir 投与前に耐性株は検出されなかったが、telaprevir の投与2週間後にはV36A変異が出現した。これらの結果より、薬剤耐性HCVはウイルスの selection および mutation いずれからも出現し得ることが示唆された。

A. 研究目的

C型肝炎患者あるいはHCV感染動物モデルにおいて telaprevir 投与前後における耐性株の dynamics を次世代シーケンサーにて解析する。

B. 研究方法

Telaprevir内服中(2,250 mg/日)、breakthrough を生じたC型肝炎患者の血中HCVのNS3領域のアミノ酸配列をdirect sequenceあるいは次世代シーケンサーによるdeep sequenceによって解析した。またこの患者に出現した耐性変異あるいは野生型のHCVを感染させたヒト肝細胞キメラマウスにInterferonまたはtelaprevirを投与しマウス血中HCV RNAの測定(real-time PCR)あるいはHCV NS3領域のアミノ酸解析を行った。

C. 結果

Genotype 1b型HCV患者に2,250 mg/日の telaprevirを投与したところ投与2週目には血中ウイルスは陰性化した。6週目には再陽性化し12週目には5 log copy/mLに上昇し投与中止した。NS3領域のdirect sequenceにて12週目にA156F変異が検出されたため、NS3 156番をdeep sequenceにて解析した。Telaprevir投与前、99.9%は野生型であったが、A156F変異株が0.6%とわずかに存在していた。投与12週目には野生型は0.3%に減少しA156F変異が92.6%に増加していた。投与12週目の患者血清をヒト肝細胞キメラマウスに静脈内投与したところマウス血中HCVは陽性化した。投与8週間後のマウス血中HCVは99.9%が

A156F変異株であった。このマウスに1500 IU/gのIFN- α を連日投与したところ投与1週後にマウス血中HCVは陰性化し野生型HCV感染マウスに比べ明らかにIFNの効果が高かった。

野生型HCV感染マウスに200 mg/kgのtelaprevirを1日2回4週間投与したところ血中HCVは一旦低下したが投与中再上昇した。投与4週後の血清を用いたdirect sequenceにてV36A変異が検出されたためNS3 36番をdeep sequenceにて解析した。投与前99.9%は野生型であったがV36A変異が0.07%存在していた。投与2週目には野生型は71.7%に減少しV36A変異が18.5%と増加していた。投与4週目には野生型は22%に減少しV36A変異が52.2%と増加、さらにV36G変異が25.6%出現していた。

HCVクローンを感染させたマウスに200 mg/kgのtelaprevirを1日2回2週間投与した。投与2週後の血清を用いたdirect sequenceにてV36A変異が検出されたためNS3 36番をdeep sequenceにて解析した。クローン感染のため投与前は野生型が100%であったが、投与2週目には野生型は88.9%に減少し11%のV36A変異が出現していた。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた検討により、C型肝炎患者あるいはHCV感染マウスにおけるtelaprevir耐性株の詳細なdynamics解析が可能であった。Telaprevir耐性株は野生型HCVに比べIFNの治療効果が高く、複製能が低下しているものと思われた。C型肝炎患者およびHCV感染マウスのいずれにおいてもtelaprevir投与前からわずかに耐性変異が検出された。またHCVクローンを感染させたマウスからも耐性変異が検出された。これらの結果より、薬剤耐性HCVはウイルスのselectionおよびmutationいずれからも出現し得ることが示唆された。

E. 結論

HCV感染動物モデルおよび次世代シーケンサーを用いたdeep sequenceは、telaprevir投与によって出現する耐性株のdynamicsの検討に有用である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Hiraga N, Imamura M, Abe H, Nelson Hayes C, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone in vivo. *Hepatology* 54:781-8, 2011
- (2) Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M. Animal model for study of human hepatitis viruses. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(1):13-18.

2. 学会発表

- Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi T, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Rapid Emergence of Telaprevir Resistant Hepatitis C Virus Strain From Wild Type Clone in Vivo. 12th AASLD, San Francisco. November 4, 2011
- Imamura M, Abe H, Hiraga N, Tsuge M, Takahashi S, C. Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Impact of Viral Amino Acid Substitutions and Host IL28B polymorphism on Replication and Susceptibility to Interferon of Hepatitis C Virus. The 62th Annual Meeting of the American Association for

the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

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
Sainz B Jr, Barretto N, Martin DN, Hiraga N, <u>Imamura M</u> , Hussain S, Marsh KA, Yu X, <u>Chayama K</u> , Alrefai WA, Uprichard SL.	Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor.	Nat Med	18(2)	281-5	2012
Hiraga N, Abe H, <u>Imamura M</u> , Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Nakamura Y, Kamatani N, <u>Chayama K</u>	Impact of viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus.	Hepatology	54(3)	764-71	2011
Hiraga N, <u>Imamura M</u> , Abe H, Nelson Hayes C, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, <u>Chayama K</u> .	Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone in vivo.	Hepatology	54(3)	781-88	2011
<u>Chayama K</u> , Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, <u>Imamura M</u> .	Animal model for study of human hepatitis viruses.	J Gastroenterol Hepatol.	26	13-18s	2011
Tsuge M, Fujimoto Y, Hiraga N, Zhang Y, Ohnishi M, Kohno T, Abe H, Miki D, <u>Imamura M</u> , Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Miya F, Tsunoda T, <u>Chayama K</u>	Hepatitis C virus response in the liver of the human hepatocyte chimeric mouse.	PLoS One.	6	e23856.	2011
Tsuge M, Takahashi S, Hiraga N, Fujimoto Y, Zhang Y, Mitsui F, Abe H, Kawaoka T, <u>Imamura M</u> , Ochi H, Hayes CN, <u>Chayama K</u> .	Effects of hepatitis B virus infection on the interferon response in immunodeficient human hepatocyte chimeric mice.	J Infect Dis	2	224-8	2011

Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, <u>Imamura M</u> , <u>Chayama K</u> , Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, <u>Wakita T</u> , Kato T.	In Vivo adaptation of hepatitis C virus for efficient virus production and evasion of apoptosis.	Hepatology	54(2)	425-33	2011
Ohara E, Hiraga N, <u>Imamura M</u> , Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Tanaka S, <u>Chayama K</u>	Elimination of Hepatitis C Virus by Short Term NS3-4A and NS5B Inhibitor Combination Therapy in Human Hepatocyte Chimeric Mice.	J Hepatol	54(5)	872-8	2011
Abe H, <u>Imamura M</u> , Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, <u>Yoshizato K</u> , Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, <u>Chayama K</u>	ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo.	J Hepatol	55(1)	11-8	2011
<u>Yoshizato K</u> , Tateno C, Utoh R.	Mice with Liver Composed of Human Hepatocytes as an Animal Model for Drug Testing.	Curr Drug Discov Technol.	9	63-76	2012
Sekiya Y, Ogawa T, <u>Yoshizato K</u> , Ikeda K, Kawada N.	Suppression of hepatic stellate cell activation by microRNA-29b.	Biochem Biophys Res Commun.	412(1)	74-9	2011
Sekiya Y, Ogawa T, Iizuka M, <u>Yoshizato K</u> , Ikeda K, Kawada N.	Down-regulation of cyclin E1 expression by microRNA-195 accounts for interferon- β -induced inhibition of hepatic stellate cell proliferation.	J Cell Physiol.	226(10)	2535-42	2011
Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama	Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice.	Am J Pathol.	179(2)	1050-60	2011

H, Ikeda K, <u>Yoshizato K</u> , Kawada N.					
Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda T, <u>Yoshizato K</u> .	Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver.	Endocrinology.	152 (4)	1479-91	2011
Y Iwasaki, Y Shiratori, S Hige, S Nishiguchi, H Takagi, M Onji, H Yoshida, N Izumi, Y Kohgo, K Yamamoto, N Sato, A Shibuya, H Saito, M Sata, K Suzuki, <u>S Kaneko</u> , M Moriyama, and M Omata.	A randomized trial of 24 versus 48 weeks of peginterferon α -2a in patients infected with chronic hepatitis C virus genotype 2 or low viral load genotype 1: a multicenter national study in Japan.	Hepatol Int	-	-	(in press)
H Sunagozaka, M Honda, T Yamashita, R Nishino, H Takatori, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, <u>S Kaneko</u> .	Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma.	Int J Cancer	129(7)	1576-85	2011
Y Takata, Y Nakamoto, A Nakada, T Terashima, F Arihara, M Kitahara, K Kakinoki, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, <u>S Kaneko</u> .	Frequency of CD45RO(+) subset in CD4(+)CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma.	Cancer Lett	307(2)	165-73	2011
M Honda, K Takehana, A Sakai, Y Tagata, T Shirasaki, S Nishitani, T Muramatsu, T Yamashita, Y Nakamoto, E Mizukoshi, Y Sakai, T Yamashita, M Nakamura, T Shimakami, M Yi, SM Lemon, T Suzuki, T Wakita, <u>S Kaneko</u> ; Hokuriku Liver Study Group.	Malnutrition Impairs Interferon Signaling through mTOR and FoxO pathways in Patients with Chronic Hepatitis C.	Gastroenterolog y	141(1)	128-140	2011
T Yamashita, M Honda, <u>S Kaneko</u> .	Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection.	J Gastroenterol Hepatol	26(6)	960-4	2011

E Mizukoshi, Y Nakamoto, K Arai, T Yamashita, A Sakai, Y Sakai, T Kagaya, T Yamashita, M Honda, <u>S Kaneko</u> .	Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma.	Hepatology	53(4)	1206-16	2011
Ando M, Takahashi Y, Nishikawa M, Watanabe Y, <u>Takakura Y</u> .	Constant and steady transgene expression of interferon- γ by optimization of plasmid construct for safe and effective interferon- γ gene therapy.	J Gene Med.	In press		2012
Takahashi Y, Nishikawa M, Takiguchi N, Suehara T, <u>Takakura Y</u> .	Saturation of transgene protein synthesis from mRNA in cells producing a large number of transgene mRNA.	Biotechnol Bioeng.	108(10)	2380-2389	2011
Kambara H, Fukuhara T, Shiokawa M, Ono C, Ohara Y, Kamitani W, and <u>Matsuura Y</u> .	Establishment of a novel permissive cell line for propagation of hepatitis C virus by the expression of microRNA122.	J.Virol.	86	1382-1393	2012
Taguwa S, Kambara H, Fujita N, Noda T, Yoshimori T, Koike K, Moriishi K, and <u>Matsuura Y</u> .	Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus.	J.Virol.	85	13185-13194	2011
Katoh H, Mori Y, Kambara H, Abe T, Fukuhara T, Morita E, Moriishi K, Kamitani W, and <u>Matsuura Y</u> .	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA.	J.Virol.	85	10976-10988	2011
Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, and <u>Matsuura Y</u> .	Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus.	Virology	412	211-219	2011

Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi M, and <u>Matsuura Y.</u>	Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules.	PLoS One	6	e15967	2011
Fukuhara T, Tani H, Shiokawa M, Goto Y, Abe T, Taketomi A, Shirabe K, Maehara Y, and <u>Matsuura Y.</u>	Intracellular delivery of serum-derived hepatitis C virus.	Microbes Infect.	13	405-412	2011
Mori Y, and <u>Matsuura Y.</u>	Structure of hepatitis E viral particle.	Virus Res.	61	59-64	2011
Weng L, Kohara M, <u>Wakita T.</u> Shimotohno K, Toyoda T.	Detergent-induced activation of the hepatitis C virus genotype 1b RNA polymerase.	Gene.	496(2)	79-87.	2012
Murayama A, Kato T, Akazawa D, Sugiyama N, Date T, Masaki T, Nakamoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Yokosuka O, Nomoto A, <u>Wakita T.</u>	Production of Infectious Chimeric Hepatitis C Virus Genotype 2b Harboring Minimal Regions of JFH-1.	J Virol.	86(4)	2143-52.	2012
Salim MT, Aoyama H, Sugita K, Watashi K, <u>Wakita T.</u> Hamasaki T, Okamoto M, Urata Y, Hashimoto Y, Baba M.	Potent and selective inhibition of hepatitis C virus replication by novelphenanthridinone derivatives.	Biochem Biophys Res Commun.	415(4)	714-9.	2011
Sugiyama M, Tanaka Y, <u>Wakita T.</u> Nakanishi M, Mizokami M.	Genetic Variation of theIL-28B Promoter Affecting Gene Expression.	PLoS One.	6(10)	e26620.	2011
Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, <u>Wakita T.</u> Meurs EF.	Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response.	PLoS Pathog.	7(10)	e1002289.	2011
Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, <u>Wakita T.</u> Suzuki T.	Role of the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles.	J Biol Chem.	286(43)	37264-73.	2011
Okamoto Y, Masaki T, Murayama A,	Development of recombinant	Biochem	410(3)	404-9.	2011

Munakata T, Nomoto A, Nakamoto S, Yokosuka O, Watanabe H, <u>Wakita T</u> , Kato T.	hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2.	Biophys Res Commun.			
Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, <u>Wakita T</u> , Suzuki T.	Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus.	J Gen Virol.	92(Pt 9)	2082-7.	2011
Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, <u>Wakita T</u> .	Production and characterization of HCV particles from serum-free culture.	Vaccine.	29(29-30)	4821-8.	2011
Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, <u>Wakita T</u> , Kato T.	In vivo adaptation of hepatitis C virus in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis.	Hepatology.	54(2)	425-33.	2011
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, <u>Wakita T</u> , Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group.	Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C.	Gastroenterol.	141(1)	128-40, 40.e1-2.	2011
Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, <u>Wakita T</u> , Shimotohno K, Seya T.	Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV).	PLoS One.	6(6)	e21284.	2011
Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K, <u>Ohdan H</u> .	Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection.	Ann Surg Oncol.	19(2)	418-425	2012

Kuroda S, Tashiro H, Igarashi Y, Tanimoto Y, Nambu J, Oshita A, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, <u>Ohdan H.</u>	Rho inhibitor prevents ischemia-reperfusion injury in rat steatotic liver.	J Hepatol.	56(1)	146-152	2012
Wang C, Wang H, Ide K, Wang Y, Van Rooijen N, <u>Ohdan H</u> , Yang YG.	Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRP α capable of binding to human CD47.	Cell Transplant.	20	1915-1920	2011
Tashiro H, Ishiyama K, Ohira M, Igarashi Y, Tahara H, Ide K, Onoe T, Tanaka Y, <u>Ohdan H.</u>	Impact of adjuvant immunotherapy using liver allograft-derived lymphocytes on bacteremia in living-donor liver transplantation.	Transplantation.	92(5)	575-580	2011
Ide K, Tanaka Y, Onoe T, Banshodani M, Tazawa H, Igarashi Y, Basnet NB, Daskali M, Tashiro H, <u>Ohdan H.</u>	Evidence for the immunosuppressive potential of calcineurin inhibitor-sparing regimens in liver transplant recipients with impaired renal function.	J Transplant.			2011
Amano H, Hino H, Tateno C, Emoto K, Imaoka Y, Yamasaki C, Itamoto T, Tashiro H, Asahara T, <u>Ohdan H</u> , Yoshizato K.	Therapeutic potential of propagated hepatocyte transplantation in liver failure.	J Surg Res.	167(1)	e29-37	2011
Yasuo Ariumi, Misao Kuroki, Yukihiro Kushima, Kanae Osugi, <u>Makoto Hijikata</u> , Masatoshi Maki, Masanori Ikeda, Nobuyuki Kato	Hepatitis C Virus Hijacks P-body and Stress Granule Components Around Lipid Droplets.	J. Virol.	85 (14)	6882-6892	2011

Takaji Wakita, Tetsuro Suzuki, Matthew J. Evans, Kunitada Shimotohno, Kazuaki Chayama, Yoshiharu Matsuura, <u>Makoto Hijikata</u> , Kohji Moriishi, Tsukasa Seya, Nobuyuki Enomoto, Kazuhiko Koike, Nobuyuki Kato, Tatsuya Kanto, Hak Hotta	Will there be an HCV meeting in 2020? Summary of the 17 th International Meeting in Hepatitis C Virus and Related Viruses	Gastroenterology	141(1)	E1-E5	2011
Miura M, <u>Maekawa S</u> , Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N.	Analysis of viral amino acid sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis.	Hepatol Int.	Aug 17	(Ahead of print)	2011
Shindo H, <u>Maekawa S</u> , Komase K, Kadokura M, Sueki R, Miura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N.	Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients.	Hepatol Int.	Aug 17	(Ahead of print)	2011
Kadokura M, <u>Maekawa S</u> , Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N.	Analysis of the complete open reading frame of genotype 2b hepatitis C virus in association with the response to peginterferon and ribavirin therapy.	PLoS One.	6(9)	e24514	2011
Kadokura M, <u>Maekawa S</u> , Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N.	Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy.	Hepatol Int.	5(3)	789-99	2011
Takaya D, Yamashita A, Kamijo K,	A new method for induced fit	Bioorg Med	19(22)	6892-90	2011