

the Storage of Neutral Lipids, Steamboat,
CO, USA, 2010

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

(発明者) 深澤征義、花田賢太郎「培養細胞、及び、細胞構築方法」(特願 2012-154982) 出願中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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

肝がんのアポトーシス耐性におけるマイクロRNAの関与

竹原 徹郎 大阪大学大学院医学系研究科消化器内科学 教授

研究要旨：肝がんでは40%の症例においてアポトーシス抑制性Bcl-2関連蛋白であるBcl-xLの高発現がみられる。本研究では肝がんにおけるBcl-xLの発現増強にマイクロRNAが関与しているかどうかを検討した。マイクロRNAの網羅的発現解析の結果をin silicoで検討することにより、肝がん細胞株で発現が低下しかつ Bcl-xLの発現を抑制する可能性のあるマイクロRNAとして*let-7*が抽出された。肝がん細胞株に*let-7*をトランスフェクションするとBcl-xLの発現が低下した。レポーター遺伝子の発現実験により*let-7*が*bcl-xl*の3'非翻訳領域の遺伝子配列を直接標的としていることが示された。ヒト肝がん試料において*let-7*が低発現している肝がん組織ではBcl-xLの発現が亢進していた。ソラフェニブにBcl-xL阻害剤であるABT-737を併用することにより肝がん細胞株のアポトーシスが促進されBcl-xLのソラフェニブ治療抵抗性への関与が示された。*let-7*が低発現である肝がん細胞株に*let-7*を導入したところ、ソラフェニブによる抗腫瘍効果が増強した。肝がんにおいてBcl-xLが高発現するメカニズムとして、*let-7*マイクロRNAの低発現の関与が示され、治療の標的となりうることが示唆された。

共同研究者

清水 聡 大阪大学消化器内科学

A. 研究目的

がんの細胞生物学的な特徴として“無秩序な増殖”と“アポトーシス耐性”をあげることができる。前者はがん遺伝子の活性化などをその分子基盤としており、ソラフェニブなどのoncogenic kinase阻害剤はこれを標的とした薬剤である。一方、後者を標的とした肝がんの分子標的治療剤はいまだ開発されていない。我々はBcl-xLの高発現が肝がんのアポトーシス耐性の分子基盤のひとつであることを報告したが

(Takehara, et al., Hepatology 2001)、

そのメカニズムは明らかにされていない。本研究ではBcl-xLの高発現のメカニズムとしてマイクロRNAによる転写後調節に焦点をあてて、研究を行った。

B. 研究方法

Bcl-xLを標的とする可能性のあるマイクロRNAをmiRandaを用いてin silico解析を行った。Huh7肝がん細胞株とヒト肝細胞のマイクロRNA発現をチップを用いて網羅的に解析した。ルシフェラーゼ発現ベクターの3'非翻訳領域に*bcl-xl mRNA*の3'非翻訳領域を挿入し、マイクロRNA存

在下の遺伝子発現を検討した。肝がん切除時のがん部と非がん部 20 ペアについてマイクロ RNA 発現、Bcl-xL 発現をそれぞれ PCR、ウエスタンブロットで解析した。肝がん細胞株 Huh7 に let-7 マイクロ RNA を導入し、ソラフェニブの抗腫瘍効果に与える影響を検討した。

(倫理面への配慮)

ヒト試料は研究目的での使用に関する同意が得られているものを使用した。

C. 研究結果

In silico 解析により Bcl-xL の翻訳を抑制する可能性のあるマイクロ RNA として 28 種類を抽出した。このなかで正常肝細胞に比し Huh7 で低発現しているマイクロ RNA は *let-7* であった。*Let-7* を肝がん細胞株にトランスフェクションすることにより Bcl-xL の発現は低下した。ルシフェラーゼを用いたレポーター解析により、*let-7* は *bcl-xl mRNA* の 3' 非翻訳領域を直接標的としていることが示された。ヒト肝がんの 20 例中 12 例においてがん部は非がん部に比し *let-7* が低発現していたが、このような症例では、対照の 8 例に比し、有意に Bcl-xL の発現が亢進していた。肝がん細胞株に *let-7* を導入することにより、Bcl-xL の発現が低下し、スタウロsporin 誘導性アポトーシスが增強した。ソラフェニブは肝がん細胞株の Mc1-1 発現を抑制したが、その治療効果は *let-7* の導入により增強した。また Bcl-xL 阻害剤である ABT-737 を用いて同様の検討を行ったところ、肝がん細胞株の Bcl-xL を阻害することによりソラフェニブのアポトーシス誘導

効果が促進された。肝がん細胞株皮下腫瘍マウスモデルにおいても ABT-737 の併用はソラフェニブの抗腫瘍効果を增強し、Bcl-xL のソラフェニブ治療抵抗性への関与が示された。

D. 考察

我々は Bcl-xL が肝がんにおいて機能亢進するメカニズムのひとつとして脱アミド化の抑制が関与することを報告したが (Takehara T, et al., Cancer Res 2003)、発現亢進についてはマイクロ RNA が関与することを明らかにした。また Bcl-xL がソラフェニブ治療におけるアポトーシス耐性に関与していることを示した。

E. 結論

肝がんにおいて Bcl-xL が高発現する分子機序として、*let-7* マイクロ RNA の低発現が関与することを明らかにした。また *let-7* の導入ないし Bcl-xL の阻害によりソラフェニブの抗腫瘍効果を增強することができた。

F. 研究発表

1. 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. 131: 548-57, 2012.**

- 2) Hikita H, Kodama T, Shimizu S, Li W, Shigekawa M, Tanaka S, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Morii E, Hayashi N, Takehara T. Bak deficiency inhibits liver carcinogenesis: a causal link between apoptosis and carcinogenesis. **J Hepatol. 57: 92-100, 2012.**
- 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) Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. **Hepatology 52: 1310-1321, 2010.**
- 5) Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Miyagi T, Hosui A, Tatsumi T, Ishida H, Noda T, Nagano H, Doki Y, Mori M, Hayashi N. The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. **J Hepatol. 52: 698-704, 2010.**

2. 学会発表

The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 63rd Annual Meeting, November 9 - 13, 2012, Boston,

MA

Oral; #193 Oxidative stresses play a major role in cancer development in apoptosis-prone liver. Hikita H, Kodama T, Tanaka S, Saito Y, Shimizu S, Shigekawa M, Li W, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. **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; #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. **The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), 61st Annual Meeting, October 29-November 2, 2010, Boston, MA**

Poster; #519 ABT-737, a Bad mimetic Bcl-xL inhibitor, enhances the anti-tumor effect of sorafenib against hepatocellular carcinoma. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Li W, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

プロテオミクスによるウイルス性肝疾患のバイオマーカー探索と臨床的意義の検討

宇都 浩文

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科消化器疾患・生活習慣病学 講師

研究要旨：プロテオーム解析により、C型肝炎ウイルス（HCV）関連肝疾患と関連する蛋白としてManganese superoxide dismutase（MnSOD）、Apoptosis Inhibitor of Macrophage（AIM）、補体C4断片を同定した。肝細胞の酸化ストレスマーカー候補として同定したMnSODの血清濃度は健常者と比較し、HCV関連慢性肝疾患、とくに肝癌患者血清中で高値であった。HCV関連肝癌では血清MnSODが高い方が有意に予後不良であり、血清MnSODはHCV関連肝癌の予後予測マーカー候補であることを明らかにした。また、血清AIM濃度は、肝癌の無いHCV関連慢性肝疾患では肝線維化と独立して関連し、AIMは新しい肝線維化マーカー候補であると考えられた。さらに、補体C4の断片がHCV持続感染者の血清中に増加していることを見出し、*in vitro*ではHCV NS3/4A プロテアーゼがC4切断に関連すること、その切断により補体機能が低下する可能性があること、を明らかにした。このように、本研究では、プロテオミクスによりHCV関連肝疾患の予後予測マーカー、肝線維化マーカー候補を明らかにするとともに、HCV感染と補体との関連を解明する可能性のある分子機構を明らかにした。

A. 研究目的

病態と関連する新しいバイオマーカーの探索は、慢性肝疾患の病態解明につながり、新しい診断や治療法を創出できる可能性がある。さらに、新しいバイオマーカーを用いた簡便な診断法の確立が早期発見・早期治療に結びつく可能性があり、医療費抑制への貢献も期待できる。

本研究では、プロテオーム解析により同定した manganese superoxide dismutase（MnSOD）、Apoptosis Inhibitor of Macrophage（AIM、別名 CD5 もしくは Sp α ）、補体 C4 断片の C 型肝炎ウイルス

（HCV）関連慢性肝疾患における臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 酸化ストレスマーカーの同定とその臨床的意義の検討

初代培養ヒト肝細胞に過酸化水素あるいは PBS を添加し、24 時間培養後に細胞質タンパク質を抽出した。抽出した細胞質タンパク質を NBS 試薬で標識し、MALDI-TOF/MS 解析を行った。タンパク同定は MS/MS イオンサーチ法を用いた。同定した MnSOD の HCV 関連肝疾患患者血清中における

る臨床的意義を比較検討した。

2) HCV 関連肝癌患者血清中に増加する蛋白の同定とその臨床的意義の検討

血清を ProteoMinor Kit で前処理したのち、2次元電気泳動によりプロテオーム解析した。肝癌のない HCV 関連慢性肝疾患患者、非アルコール性脂肪肝炎患者、および健常者と比較して HCV 関連肝癌患者血清中に高濃度で存在するタンパクを探索した。次に、同定したタンパクの一つである AIM 値を ELISA で測定し、臨床データと比較検討した。

3) 補体 C4 と HCV NS3/4A プロテアーゼとの関連の検討

補体 C4 と HCV NS3/4A プロテアーゼを混合後、SDS-PAGE で分離し、CBB 染色を行った。また、感作羊赤血球に補体 C1、C4、C2 と C4 欠損モルモット血清を順に添加し、溶血度を測定することで補体の古典経路の活性を測定した。感作羊赤血球添加前に、C4 には NS3/4A プロテアーゼを作用させた。

(倫理面への配慮)

患者から血液などの試料を得る場合は、「試料提供者用の説明資料」を作製し、研究の内容や方法等を十分説明した後、研究協力依頼をする。個人の自由意志を尊重し、「同意書」に書面で意思を記載してもらい、同意が得られた場合のみ、試料採取等を行う。試料や臨床情報は匿名化し、個人情報保護に努める。解析結果や臨床情報等は厳重に保管し、解析はネットワークから遮断されたコンピュータを用いる。

C. 研究結果

1) 初代培養ヒト肝細胞に酸化ストレスを

負荷し、誘導されたタンパクのうちの一つを MnSOD と同定した。また、血清 MnSOD 濃度は健常者もしくは慢性肝疾患患者と比較し、肝癌患者で高かった。さらに、肝癌患者では、MnSOD 110 ng/ml 以上の症例は、それ未満の症例よりも予後不良であった。

2) 肝癌群が非肝癌群よりも高値を示したスポットを複数個検出し、そのうちの一つを AIM と同定した。また、肝癌群と非肝癌群で比較すると、ELISA で測定した肝癌群の AIM 値は非肝癌群より有意に高値であった。さらに、AIM の肝癌判別能は AFP や PIVKA-II とほぼ同等であった。一方、肝癌を合併していない C 型慢性肝炎患者では、肝生検で確認した肝線維化の程度と AIM 値は関連し、肝線維化が進展している群 (F2/F3) の AIM 値は肝線維化が軽度の群 (F0/F1) の AIM 値より有意に高値であった。また、AIM 値は肝線維化進展に独立して関与する因子で、AIM の肝線維化進行群の判別能は既存の肝線維化マーカーである IV 型コラーゲンやヒアルロン酸とほぼ同等であった。

3) 補体 C4 と NS3/4A プロテアーゼ混合液中には、約 17kDa の 2 つの蛋白と 15kDa の 1 つの蛋白断片を検出した。また、NS3/4A プロテアーゼにセリンプロテアーゼ阻害剤 (VX-950) を混合後、C4 と混合すると、C4 断片の出現が抑制された。さらに、感作羊赤血球を用いた溶血試験にて、NS3/4A プロテアーゼは濃度依存的に C4 活性を低下させ、この活性低下は VX-950 により阻止された。

D. 考察

肝疾患の病態進展には酸化ストレスが関連することから、本研究では、酸化ストレスマーカーをまず探索した。初代培養ヒト肝細胞に酸化ストレスを負荷し、肝細胞中に過剰に存在するタンパクとして MnSOD 同定し、臨床的意義を検討した。血清 MnSOD は健常者と比較し、HCV 関連肝疾患患者、とくに肝癌患者で高値であった。健常人ではフリーラジカルや活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) による酸化ストレスに対しては、酸化還元バランスを保つように、防御機構が存在する。しかし、種々の疾患では ROS が過剰に産生され、細胞内のタンパク質や核酸が変性・障害を受け、細胞内情報伝達や核内転写の変化が、病態の形成と密接に関連するといわれており、MnSOD 産生も亢進すると考えられる。我々が対象とした HCV 関連肝疾患患者では、HCV 感染、肝線維化、肝細胞機能低下など種々の病態が複合し、さらに肝癌患者ではその背景肝の病態も進展していることから、病期の進展とともに血清 MnSOD は増加したと考えられた。また、MnSOD は予後と関連することを明らかにし、MnSOD は高い方が予後は不良であった。これは、MnSOD と肝予備能が逆相関することと関連していると考えられた。

本研究では、肝癌のバイオマーカー候補の一つとして、新たに AIM を同定した。AIM は、マクロファージのアポトーシスを抑制するとともに、脂肪酸合成酵素の機能を抑制することにより脂肪細胞の脂肪滴を融解することなどが報告されている。また、AIM が肝硬変で増加する可能性があることは報告されていたが、HCV 関連慢性肝疾患

と血清 AIM 濃度との関連を詳細に検討した報告は今までになかった。本研究では、肝癌を合併していない C 型慢性肝炎での肝線維化の程度と AIM は独立して関連したことから、AIM は HCV 関連慢性肝疾患における肝線維化マーカー候補であると考えられた。また、肝癌群では非肝癌群より AIM 値は高値であったが、その AIM 値は血小板と逆相関したことから、肝癌群での AIM 上昇は背景肝である肝線維化と関連している可能性があると考えられた。しかし、HCC 群の AIM 濃度は HCC の無い慢性肝疾患における AIM 値と比較して非常に高値となっていたことから、HCC 群における AIM 値の上昇には肝線維化とは関連しない上昇機序も存在する可能性があり、腫瘍マーカーとしての意義や病態との関連は今後のさらなる検討が必要である。

HCV NS3/4A プロテアーゼは IPS-1 や TRIF といった IFN 刺激伝導系に直接作用し、宿主免疫応答を阻害していることが知られている。また、HCV core や NS5A が C4 のプロモーター領域に作用する USF-1 や IRF-1 の発現を阻害することにより、IFN γ 依存性の C4 産生を低下させ、補体活性経路を抑制することが報告されている。さらに、CD59 が培養細胞や血清由来の HCV 粒子に組み入れられることで、補体の活性化が阻止され、また、CD59 阻害剤を HCV 患者血清に反応させると、補体が活性化し、血清中の HCV 粒子の溶解が促進されることも報告されている。このように、HCV 構造蛋白が宿主免疫応答に作用し、HCV の持続感染に寄与している可能性が報告されている。しかし、HCV NS3/4A プロテアーゼが

C4 を直接切断することにより、補体の活性化を抑制するという報告はこれまでにない。今回は、肝細胞内での検討ではなく、また、患者血中（肝細胞外）で HCV NS3/4A プロテアーゼが補体に直接作用するかは明らかにしていないが、生体内での HCV 持続感染と補体との関連を解明する上で研究意義があると考えられた。

E. 結論

MnSOD は HCV 関連肝癌の診断マーカー候補であるとともに、HCV 関連肝癌の予後予測マーカー候補である。さらに、HCV 関連肝癌患者血清中から同定した AIM は、HCV 関連慢性肝疾患患者の肝線維化マーカーもしくは肝腫瘍マーカー候補と考えられた。また、HCV NS3/4A プロテアーゼは C4 を直接切断することにより、補体の活性化を抑制し、宿主免疫応答を減弱させる可能性がある。以上のことから、肝疾患のプロテオーム解析は新しい診断マーカーの探索に有用であり、病態や新しい分子機構の解明にも役立つ可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imakiire K, Uto H, Sato Y, Sasaki F, Mawatari S, Ido A, Shimoda K, Hayashi K, Stuver SO, Ito Y, Okanou T, Tsubouchi H. Difference in serum complement component C4a levels between hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels or chronic hepatitis C. *Mol Med Report*. 6 (2): 259-64, 2012.
- 2) Uto H, Mawatari S, Kumagai K, Ido A, Tsubouchi H. Clinical features of hepatitis C virus carriers with persistently normal alanine aminotransferase levels. *Hepat Mon*. 12 (2): 77-84, 2012.
- 3) Tamai T, Uto H, Takami Y, Oda K, Saishoji A, Hashiguchi M, Kumagai K, Kure T, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H. Serum manganese superoxide dismutase and thioredoxin are potential prognostic markers for HCV-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 17 (44): 4890-8, 2011.
- 4) Oda K, Ido A, Tamai T, Matsushita M, Kumagai K, Mawatari S, Saishoji A, Kure T, Ohno K, Toyokura E, Imanaka D, Moriuchi A, Uto H, Oketani M, Hashiguchi T, Tsubouchi H. Highly sensitive lens culinaris agglutinin-reactive α -fetoprotein is useful for early detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Oncol Rep*. 26 (5): 1227-33, 2011.
- 5) Uto H, Kanmura S, Takami Y, Tsubouchi H. Clinical proteomics for liver disease: a promising approach for discovery of novel biomarkers. *Proteome Sci* 8: 70, 2010.
- 6) Takami Y, Uto H, Tamai T, Sato Y, Ishida Y, Morinaga H, Sakakibara Y, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nakajima T, Okanou T, Tsubouchi H. Identification of a novel biomarker for oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2-nitrobenzenesulfonyl chloride isotope

- labeling method. *Hepatology* 40 (4): 438-45, 2010.
- 7) Kanmura S, Uto H, Sato Y, Kumagai K, Sasaki F, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Nagata K, Hayashi K, Stuver SO, Tsubouchi H. The complement component C3a fragment is a potential biomarker for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 45 (4): 459-67, 2010.
2. 学会発表
- 1) Oda K, Uto H, Tsubouchi N, Kumagai K, Sasaki F, Numata M, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H, Kusumoto K, Shimoda K, Hayashi K, Stuver S, Tanaka Y, Nishida N, Tokunaga K: Impact of a single nucleotide polymorphism upstream of the IL28B gene in subjects positive for anti-HCV antibody in an HCV hyperendemic area in Japan. The 63th liver meeting of AASLD、ボストン、2012年.
- 2) Mawatari S, Uto H, Kumagai K, Oda K, Tabu K, Ohno K, Oshige A, Imanaka D, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H, Sato Y, Suzuki T: Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibits complement activation through cleavage of complement component C4. The 63th liver meeting of AASLD、ボストン、2012年.
- 3) Yoshimine Y, Uto H, Kumagai K, Arima S, Ibusuki R, Mera K, Mawatari S, Tabu K, Nosaki T, Oda K, Tamai T, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Hepatic gene expression of the SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase is associated with the development of liver cancer in a NASH mouse model. The 63th liver meeting of AASLD、ボストン、2012年.
- 4) 有馬志穂、宇都浩文、指宿りえ、隈元亮、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁. 高血圧はコリン欠乏アミノ酸置換食による肝線維化を促進する. 第48回日本肝臓学会総会、金沢市、2012年.
- 5) 吉嶺陽造、宇都浩文、熊谷公太郎、米良久美子、有馬志穂、梶 一晃、馬渡誠一、呉 建、沼田政嗣、玉井 努、森内昭博、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁. 非アルコール性脂肪肝炎モデル (STAM)マウスの特徴と肝遺伝子発現. 第48回日本肝臓学会総会、金沢市、2012年.
- 6) 馬渡誠一、宇都浩文、呉 建、梶 一晃、熊谷公太郎、小田耕平、今中 大、最勝寺晶子、玉井 努、森内昭博、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁. C型肝炎ウイルス持続感染者の病態と補体C3、C4との関連の検討. 第48回日本肝臓学会総会、金沢市、2012年.
- 7) 米良久美子、宇都浩文、梶 一晃、馬渡誠一、有馬志穂、玉井 努、森内昭博、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁. C型慢性肝炎患者における血清AIM濃度の検討. 第109回日本内科学会講演会、京都市、2012年.
- 8) 宇都浩文、米良久美子、坪内博仁. 肝癌患者血清を用いたプロテオミクスで同定した Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) の病態への関与. 第39回日本肝臓学会西部会、岡山市、2011年.

- 9) Ibusuki R, Uto H, Arima S, Mawatari S, Iwashita Y, Hashimoto S, Maeda T, Tamai T, Moriuchi A, Setoguchi Y, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Human neutrophil peptide-1 aggravates hepatic fibrosis in a nonalcoholic steatohepatitis mouse model. The 62th liver meeting of AASLD、サンフランシスコ、2011年.
- 10) 米良久美子、宇都浩文、佐藤悠子、浜辺綾香、馬渡誠一、熊谷公太郎、呉建、玉井 努、森内昭博、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁. C型肝炎ウイルス関連肝細胞癌患者における血清CD5Lの臨床的意義. 第15回日本肝臓学会大会、福岡市、2011年.
- 11) 宇都浩文、指宿りえ、坪内博仁. ヒト好中球ペプチド-1はNASH動物モデルの肝線維化を促進する. 第15回日本肝臓学会大会、福岡市、2011年.
- 12) 玉井 努、宇都浩文、小田耕平、最勝寺晶子、橋口正史、熊谷公太郎、呉建、馬渡誠一、森内昭博、桶谷 眞、井戸章雄、坪内博仁. 血清 MnSOD と Thioredoxin はHCV関連肝癌の予後を予測する. 第47回日本肝臓学会総会、東京都、2011年.
- 13) Tamai T, Uto H, Takami Y, Kumagai K, Kure T, Mawatari S, Moriuchi A, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Clinical significance of serum MnSOD levels in patients with hepatitis C virus (HCV)-related chronic liver disease. The 7th Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) Single Topic Conference. 千葉市、2010年.
- 14) Kumamoto R, Uto H, Tanoue S, Arima S, Kure T, Kumagai K, Tamai T, Moriuchi A, Sakiyama T, Oketani M, Ido A, Tsubouchi H: Dietary fructose rather than dietary fat affects liver tumor incidence induced by diethylnitrosamina administration. The 61th liver meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). ボストン、2010年.
- 15) 佐藤悠子、宇都浩文、高見陽一郎、佐々木文郷、熊谷公太郎、最勝寺晶子、小田耕平、呉 建、馬渡誠一、玉井努、森内昭博、桶谷 眞、井戸章雄、中島知明、岡上 武、坪内博仁: ALTが正常を維持するC型肝炎ウイルス持続感染者の血清プロテオミクス. 日本ヒトプロテオーム機構第8回大会. 浦安市、2010年.
- 16) 宇都浩文. HCV抗体陽性者多発地区における疫学調査から学んだもの. 第46回日本肝臓学会総会 サテライトシンポジウム. 山形市、2010年.
- G. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
特になし

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

ウイルス肝炎の治療反応性・病態進展における新規バイオマーカーの検索

前川 伸哉 山梨大学大学院医学工学総合研究部・肝疾患地域先端医療システム学講座 講師

研究要旨：C型慢性肝疾患において、病態進展・抗ウイルス治療反応性を予測する正確なバイオマーカーの確立が急務である。本研究では、簡便に測定可能な血中のchemokine /cytokineに着目し、Genotype 1b型のC型慢性肝炎に対するPEG-interferon (PEG-IFN) +ribavirin (RBV) 併用療法における治療効果に関連する宿主因子として、Sandwich ELIZA法を用いた網羅的半定量解析、ならびにBeads Array法を用いた精密定量によって、治療開始前血清中RANTES濃度がPEG-IFN+RBV併用療法の反応性に関連すること、さらに治療前RANTESは既存の治療反応性規定因子に関連のない独立した因子であることを示し、PEG-IFN/RBV併用療法における網羅的解析から抗ウイルス治療反応性におけるRANTESの有用性を明らかとした。一方最終年度である2012年度は肝発癌への関与が報告されたMICA・DEPDC5 SNPsに着目し、両SNPの肝病態進展におけるバイオマーカーとしての意義について検討した。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対する薬剤治療は、近年大きく進歩し、特にゲノタイプ1bに対してはペグインターフェロン・リバビリン・テラプレビル3剤併用療法が中心となっており、成績は大きく向上した。しかしながら、この新しい治療においても反応性に乏しい症例の存在や皮疹などの強い副作用などの問題を認めており、正確な治療効果の予測は未だ重要な課題である。実際には3剤併用療法難治例は実は従来のペグインターフェロンとリバビリンの無効例であることが明らかとなりつつあるため、従来の2剤療法における無効例を正確に予測することが、新しい3剤療法においても重要な課題となっている。

これらの治療の中心に存在するI型インターフェロンは、細胞膜のレセプターを介してシグナルが伝達され、多様な分子との相互作用において総体としての抗ウイルス効果を発現することが考えられる。我々は本研究班においてこの効果発現の過程において様々なサイトカイン/ケモカインが関与する可能性を想定し、網羅的解析、および精密定量から治療効果と密接に関連する因子を検討した。

一方、C型慢性肝炎に関して治療反応性予測に加え、肝病態進展予測のバイオマーカーの開発が臨床的に強く望まれている。このような中、HCV由来肝癌に関与するSNPとして、近年MICA、DEPDC5が報告されたが、両SNPの有用性について未だ十分な追試は

されておらず、またこれらのSNPの有無によってC型慢性肝炎の臨床的特徴に変化が認められるのか明らかとなっていない。本班研究では、治療反応性、並びに病態進展に關与するバイオマーカーの検索を目的として検討を行った。

B. 研究方法

(1)ペグインターフェロンとリバビリン治療を行ったゲノタイプ 1b・高ウイルス量 HCV 症例 96 例を対象として、治療前の血中 chemokine/cytokine 濃度と治療効果の關連を検討した。

(2)ゲノタイプ 1b・高ウイルス量 HCV 症例 389 例を対象として、MICA、DEPDC5 の SNP と臨床背景因子、HCC との關連について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は山梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

(1)治療開始前血清を用いて網羅的に 36 種類のサイトカインの発現を sandwich ELISA 法により半定量的に測定し、各サイトカインの ROC 曲線より最適カットオフ値を求め解析したところ、SVR 率に有意差が認められたのは RANTES と IL-8 であったが、Beads Array 法を用いて精密定量により検証したところ、最終的に治療効果と關連する因子は RANTES であった。すなわち RANTES 高値群では SVR 率が高く、血中 RANTES 値は治療抵抗性と關連する宿主・ウイルス因子を含めた多変量解析においても独立した因子として抽出された。一方、

RANTES 高値群と低値群で臨床背景因子を比較したところ、SVR 率の高い RANTES 高値群では、AST 値が低く ($p = 0.059$)、逆に血小板は高く ($p = 0.009$)、肝炎自体はややマイルドな傾向を示した。

RANTES の血中濃度が RANTES 遺伝子ハプロタイプによって規定されている可能性を検討するため、日本人に見られる 5 つの SNP(rs2107538, rs2280788, rs2280789, rs4796120, rs3817655)による haplotype 解析を行ったが血清濃度と遺伝子の haplotype の間に有意な關連は見られなかった。

(2)389 症例を対象に MICA (rs2596542)、SNP による臨床背景因子を比較すると、リスクアレルである A を持つ場合に G-GTP が低くなることが($p=0.04$)示された。一方、DEPDC5(rs1012068)における各種臨床背景因子とリスクアレル G との間にはっきりした關連を認めなかった。一方、MICA(rs2596542)、DEPDC5(rs1012068)SNP と HCC の間にはっきりした關連を認めなかった。

D. 考察と結論

HCV genotype 1bにおけるPEG-IFN+RBV併用療法において、血清RANTES濃度が高値であるとPEG-IFN+RBV療法においてSVR率が有意に高くなることが高いこと、さらにHCV NS5Aやcoreのアミノ酸変異、IL-28B SNPなど他の因子を入れて多変量解析を行っても独立した因子として抽出され、従来知られている治療關連因子とは異なる機序で治療反応性を規定している可能性が考えられた。

一方、発癌に関するSNPとして見出され

たMICA, DEPDC5のSNPは強く肝病態進展、あるいは肝発癌に關与するとは考えにくいことが明らかとなった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2012 Nov 29.
- 2) Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of lamivudine resistance in hepatitis B virus infection. *J Med Virol.* 2012 Sep;84(9):1360-8.
- 3) Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication. *J Viral Hepatitis* 7 AUG 2012
- 4) Maekawa S, Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, Enomoto N. Comprehensive analysis for viral elements and interleukin-28B polymorphisms in response to pegylated interferon plus ribavirin therapy in hepatitis C virus 1B infection. *Hepatology.* 2012 Nov;56(5):1611-21.
- 5) Miura M, Maekawa S, 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 acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis. *Hepatol Int.* 2011 August 17.
- 6) Shindo H, Maekawa S, 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.* 2011 August 17.
- 7) Kadokura M, Maekawa S, 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.* 2011;6(9):e24514. Epub 2011 Sep 15.

- 8) Takaya D, Yamashita A, Kamijo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S. A new method for induced fit docking (genius) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2011 Nov 15;19(22):6892-905. Epub 2011 Sep 16.
- 9) Kadokura M, Maekawa S, 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. *Hepatology Int.* 2011 Mar 20.
- 10) Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol.* 2011 Mar;54(3):439-48.
- 11) Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol.* 2010 Sep 19.
- 12) Enomoto N, Maekawa S. HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. *Intervirology.* 2010;53(1):66-9.
- 13) Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N. Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. *Biosystems.* 2010 Jan;99(1):70-8.
2. 学会発表
- 1) 小馬瀬一樹、前川伸哉、進藤浩子、門倉信、末木良太、三浦美香、進藤邦明、雨宮史武、井上泰輔、中山康弘、坂本穰、榎本信幸. 口演：Cytokine Array解析を用いたHCVのPEG-IFN+ribavirin治療効果と関連する宿主因子の同定 第47回 日本肝臓学会大会. 東京. 平成23年6月2日 - 6月3日
- 2) 小馬瀬一樹、前川伸哉、進藤浩子、三浦美香、雨宮史武、井上泰輔、中山康弘、坂本穰、榎本信幸. ポスター：HCVのPEG-IFN+RBV治療効果と関連する宿主免疫としてのcytokineの同定 第15回 日本肝臓学会大会. 福岡. 平成23年10月20日 - 10月21日.
- 3) Kazuki Komase, Shinya Maekawa, Hiroko Shindo, Makoto Kadokura, Ryota Sueki, Mika Miura, Kuniaki Shindo, Fumitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Taisuke

Inoue, Sakamoto Minoru, Nobuyuki Enomoto Extensive analysis of Serum Cytokines Associated to The Response in The PEG-IFN+RBV Combination Therapy in Genotype 1b HCV Infection. 17th International Meeting on Hepatitis C and Related Virus (HCV2010). September 10-14, 2010, Yokohama, Japan.

- 4) 小馬瀬一樹、前川伸哉、進藤浩子、門倉信、末木良太、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. 口演 : HCV genotype 1b に対する PEG-IFN + ribavirin 併用療法症例における Cytokine 発現の網羅的解析 第46回 日本肝臓学会総会. 山形. 平成22年5月27日 - 5月28日.
- 5) 小馬瀬一樹、前川伸哉、進藤浩子、門倉信、末木良太、三浦美香、雨宮史武、北村敬利、井上泰輔、坂本穰、岡田俊一、榎本信幸. ポスター : Cytokine Array 解析を用いた HCV の PEG-IFN + ribavirin 治療効果と関連する宿主因子の同定 第14回 日本肝臓学会大会. 横浜. 平成22年10月13日 - 10月14日.

F. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

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

B型肝炎ウイルス感染系を用いた抗線維化薬物の研究

村上 周子 名古屋市立大学大学院医学研究科 助教

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）感染による肝線維化発症メカニズムの解析を目的として、HBVを感染させたヒト肝細胞置換キメラマウスを用いて検討した。キメラマウス（10週齢以上）に、HBV genotype C（HBV/C）を接種した。1）高濃度HBV/C（ 10^7 copies）を接種したところ、接種後1週目にはHBV-DNAの複製、その後急激なALTの上昇を認めた。接種3ヶ月後の肝線維化は軽度であったが、活性酸素種の産生が亢進し、肝傷害の発生が示唆されたことから、線維化には感染時のウイルス量よりも、感染に起因する炎症や肝傷害の期間が重要であることが示された。2）HBV/Cを1匹あたり 10^5 copies接種し、感染確認後、ヒト型またはマウス型 PEG-IFN β 、あるいは抗TLR4抗体をそれぞれ投与した。その結果、抗マウスTLR4抗体を投与したマウスの肝組織像のみ肝線維化の抑制傾向が認められた。一方、抗ヒトTLR4抗体により線維化は抑制されなかったことから、抗マウス抗体により中和されたのはマウス由来非実質細胞のTLR4であることが考えられる。以上より、キメラマウスHBV感染モデルにおいて、TLR4が線維化の主な要因である可能性が示唆された。

共同研究者

杉山真也 国立国際医療研究センター

田中靖人 名古屋市立大学大学院医学研究科

A. 研究目的

ヒト肝細胞キメラマウスにHBVを感染させることで、HBVの病態、肝組織に与える傷害性や肝線維化に関して検討することが可能である。本研究では、HBV感染キメラマウスに抗線維化薬物を投与し、線維化に寄与する分子種の特特定をめざすことを目的としている。

我々は既に、キメラマウスにHBVを接種後6ヶ月で肝線維化が進行し、強い肝傷害

が見られること、線維化進展群では線維化関連遺伝子の発現が亢進することを確認している。さらに、マイクロアレイによる解析を実施したところTLR4に関わる経路の活性が示され、自然免疫との関連が考えられた。また、IFN β がヒト肝星細胞株の増殖を抑制することが確認されており、IFN β に肝線維化抑制効果が期待できる。

そこで本研究では、1）高ウイルス量のHBV感染における肝傷害と線維化の関係について、感染後3ヶ月間の観察を行った。また、2）HBV感染キメラマウスにおける線維化と自然免疫との関連について検討した。

B. 研究方法

HBV 感染血清から得られたウイルス (HBV/C) をクローニングしキメラマウスへの感染源とした。1) HBV/C を 1 匹あたり 10^7 copies 接種し、接種後 1 週目から週ごとに血清中のヒトアルブミン値、ウイルス量、ALT 値を測定した。接種 3 ヶ月後に解剖し、採取した肝臓の組織像を病理学的に解析した。2) HBV/C を 1 匹あたり 10^5 copies 接種し、接種後 1 週目から週ごとに血清中のヒトアルブミン値、ウイルス量を測定した。感染確認後、ヒト型またはマウス型の PEG-IFN β 、あるいは抗 TLR4 抗体を投与した。

(倫理面への配慮)

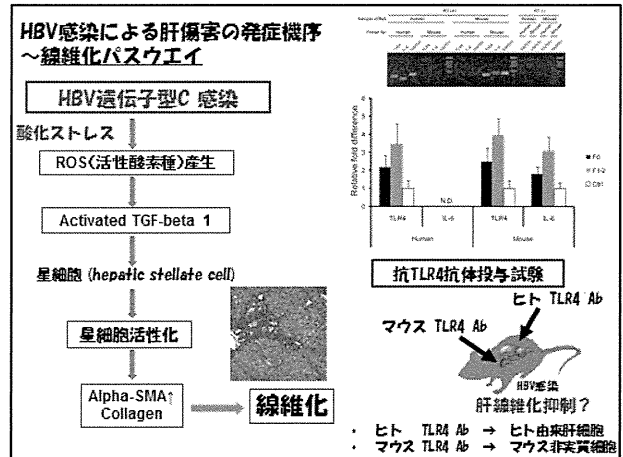
患者血清については同意書を取得し、遺伝子組み換えについては学内委員会の審査を得た。ヒト肝細胞については米国での倫理審査通過済みのものを輸入した。

C. 研究結果

1) 高ウイルス量 HBV 10^7 copies 接種後 1 週目にはキメラマウス血清中の HBV-DNA は 10^5 copies 以上となり、1 ヶ月後には 10^9 copies まで達し、その後急激な ALT 値の上昇を認めた。接種 3 ヶ月後に解剖し、採取した肝臓の連続切片を用いて肝組織像を解析した結果、線維化はきわめて軽度であったが (stage F0-1)、細胞浸潤及び活性酸素種の産生亢進を認めた。

2) HBV 10^5 copies 接種し感染確認後、ヒト型またはマウス型の PEG-IFN β 、あるいは抗 TLR4 抗体を投与した結果、感染 4 ヶ月後の肝組織像において、抗マウス TLR4 抗体投与群に線維化の抑制が認めら

れた。抗ヒト TLR4 抗体により線維化は抑制されなかった。また、ヒト肝細胞の脱落が抗マウス TLR4 抗体投与群で有意に抑制されており、肝障害を抑制する傾向が認められた。



D. 考察

キメラマウスに HBV/C を感染させることにより、ウイルス複製の増加とそれに続く肝傷害の惹起が示された。

我々はキメラマウスにおいて HBV/C 10^5 copies を接種し、感染後 6 ヶ月での肝線維化を確認している。接種ウイルス量を 10^7 copies に増量し短期間での線維化進行を試みた結果、感染初期からウイルスの複製量が高く、 10^5 copies 接種時よりも早期に感染が成立した。さらに、ALT 値の上昇および活性酸素種の産生亢進から肝傷害も早期に発生することが示唆された。しかしながら感染後 3 ヶ月の肝組織像において線維化は軽度であった。これらのことから、感染時のウイルス量は線維化の進展の早さとは関係がなく、線維化にはある程度継続した炎症の期間が必要であることが示唆され、キメラマウスでは少なくとも 3 ヶ月より長い期間が必要と考えられた。

HBV 感染キメラマウスの肝線維化は、抗マウス TLR4 抗体を投与した場合にのみ進行が抑制された。肝組織において、TLR4 は肝細胞と非実質細胞の双方に発現することが知られている。キメラマウス肝では、肝細胞はヒト由来であるが、非実質細胞はレシピエントのマウス細胞であることから、抗マウス TLR4 抗体によって中和されたのは、非実質細胞の TLR4 活性である可能性が示唆された。IFN β 投与においては本研究の結果のみで肝線維化抑制効果を判断することができなかつたため、さらに検討を重ねる必要がある。

HBV 感染キメラマウス肝線維化モデルにおいて、TLR4 は肝線維化の主な要因であると考えられる。また、このマウスは免疫不全であるため、TLR4 は免疫抑制下での肝線維化にも関与しているかも知れない。

E. 結論

HBV 感染による肝線維化には、感染時のウイルス量よりも、感染に起因する肝傷害の期間が影響することが示された。また、マウス型抗 TLR4 抗体を投与により、肝線維化が抑制されたことから、TLR4 はキメラマウス由来の非実質細胞に作用して HBV 感染に伴う肝線維化を抑制している可能性が示唆された。一方、抗ヒト TLR4 抗体により線維化は抑制されなかつたことから、抗マウス抗体により中和されたのはマウス由来非実質細胞の TLR4 であることが考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sakamoto T, Tanaka Y, Kani S, Sugiyama M, Watanabe T, Iijima S, **Murakami S**, Matsuura K, Kusakabe A, Shinkai N, Sugauchi F, Mizokami M. Mechanism of the Dependence of Hepatitis B Virus Genotype G on Co-infection with Other Genotypes for Viral Replication. *J Viral. Hepat.*, in press.
- 2) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsuhashi H, **Murakami S**, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- λ in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut.*, 2012 Nov 7. [Epub ahead of print]
- 3) Ragheb M, Elkady A, Tanaka Y, **Murakami S**, Attia FM, Hassan AA, Hassan MF, Shedid MM, Abdel Reheem HB, Khan A, Mizokami M. Multiple intra-familial transmission patterns of hepatitis B virus genotype D in north-eastern Egypt. *J Med Virol.*, 84(4):587-95, 2012.
- 4) Sa-nguanmoo P, Tanaka Y, Ratanakorn P, Sugiyama M, **Murakami S**, Payungporn S, Sommanustweechai A, Mizokami M, Poovorawan Y. Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. *Virus Res.*, 158 (1-2): 209-15, 2011.

2. 学会発表

- 1) 新海登, 松浦健太郎, 渡邊綱正, 村上周子, 宮木知克, 藤原圭, 日下部篤宣, 飯尾悦子, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人:

核酸アナログを投与したB型慢性肝炎患者におけるinterferoninducible protein-10値の動態. 第20回日本消化器関連学会週間（第16回日本肝臓学会大会）, 神戸市, 2012.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし