

C, Ishii R, Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Suzuki Y, Suzuki K, Ishibashi M, Saito K, Shinzawa H, Ueno Y and Kawata S. Pegylated interferon plus ribavirin therapy is associated with improvement of the serum adiponectin and insulin resistance in patients with genotype 1b chronic hepatitis C. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, USA, November 2012.

2. **Watanabe H**, Saito T, Tomita K, Sato C, Ishii R, Haga H, Okumoto K, Nishise Y, Ueno Y and Kawata S. Transition in hepatitis B virus genotypes responsible for acute hepatitis B in a hyperendemic area for genotype B infection – 20 years follow-up study in Japan. DDW2012, San Diego, USA, May 20, 2012

3. **渡辺久剛**、齋藤貴史、河田純男：地域コホート研究からみたC型肝炎ウイルス持続感染者の自然史 第16回日本肝臓学会大会（シンポジウム7「Cohort研究からみたウイルス性肝炎の解明」）、神戸；2012年10月

4. 佐藤智佳子、**渡辺久剛**、上野義之：非アルコール性脂肪性肝障害を基盤とした肝臓症例の臨床的特徴 第16回日本肝臓学会大会（シンポジウム8「NASHからの発癌：基礎と臨床」）、神戸；2012年10月11日

5. **渡辺久剛**、石井里佳、齋藤貴史、新澤陽英、河田純男、上野義之：肝疾患診療連携拠点病院を中心とした山形県肝炎診療の現状と医療費助成制度によるアウトカム。第48回日本肝臓学会総会（ワークショップ「全国における肝炎診療の現状と対応」）、金沢；2012年6月

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

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（平成 24 年度）

ウイルス肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者：坂本 直哉 北海道大学大学院医学研究科 消化器肝臓病学・消化器内科 教授
(前職;東京医科歯科大学・分子肝炎制御学講座 准教授)

分担研究課題：宿主遺伝子に関連した治療抵抗性機構の解析

研究要旨：我々は機能が未知である IFN λ s の働きを解明し、その作用を増強する薬剤をすることを目的として研究を遂行している。今回我々はインターフェロン作用を増強する化合物のスクリーニングを遂行し、植物界に広く分布するトリテルペノイド化合物の一つである toosendanin に HCV 増殖抑制効果および interferon 作用増強効果があることを見いだした。HCV レプリコン細胞に toosendanin 存在下で 24 時間培養後インターフェロン α を添加することにより、ISG 発現増強とともに HCV 増殖が相乗的に抑制された。さらに IFN λ 下流のシグナルを亢進することも確認された。以上の結果より Toosendanin 関連化合物は IFN 作用増強薬として有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

現在まで多くの抗 HCV 薬の開発が行われているがインターフェロン α は今なお、抗 HCV 薬の key drug である。我々は、独自に開発した HCV 培養増殖系を用い、抗ウイルス薬感受性に関わる宿主蛋白の探索、機能解析を進め、新たな抗ウイルス療法を開発することを目的として研究を遂行している。本研究において坂本は、ランダム合成化合物ライブラリーの High-throughput screening (HTS)により、IFN- λ レセプター下流のシグナルを制御する小分子を探索し、植物界に広く分布するトリテルペノイド化合物の一つである toosendanin に HCV 増殖抑制効果および interferon 作用増強効果があることを見いだしたのでその作用機構を解析した。

B. 研究方法

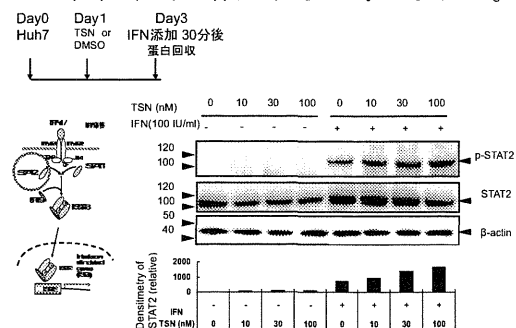
(1) Toosendanin を Huh751/1b レプリコン発現細胞 (Huh7/Rep-Feo) に添加し、IFN 併用・非併用下での HCV 増殖抑制効果を評価し、50%作用濃度 (EC50)を算出した。同時に細胞毒性試験として MTSassay により 50%毒性濃度 (CC50)を測定した。インターフェロン効果は ISRE-luciferase リポーターアッセイにて評価し、ISGF3 の成分である STAT1、STAT2、IRF9 を real time RT-PCR にて、STAT1、STAT2 のリン酸化を Western blotting にて解析した。

(2) IL28B(IFN- λ 2)転写調節領域の下流にルシフェラーゼリポーター遺伝子を挿入したプラスミ

ドベクターを HEK293 細胞に恒常的に導入した細胞株、293/IL28B を樹立し、ランダム合成化合物ライブラリー約 10,000 化合物の High-throughput screening (HTS)を行い、IFN- λ 発現を増強する化合物、および IFN- λ 依存性の遺伝子発現を増強する化合物を探索した。使用するライブラリーは炭素骨格を基本とし生体利用可能な化合物から構成される。

C. 研究結果

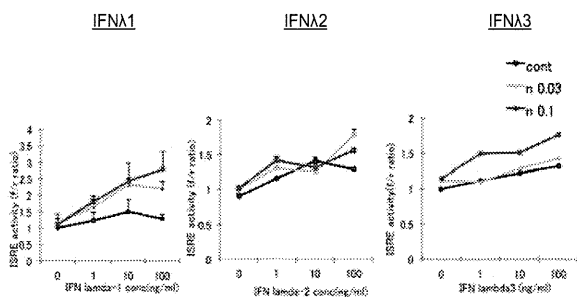
(1) Toosendanin は HCV レプリコンを細胞毒性を示さず特異的に抑制した (IC50=8ng/ml、CC50>30 μ g/ml、selectivity index>3.8 \times 10³)。Toosendanin と IFN の併用は、それぞれの単独投与に較べ低濃度で同等の HCV 増殖抑制効果が見られ、相乗的に作用すると考えられた。



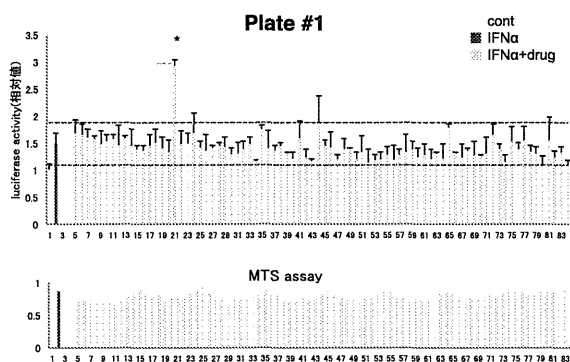
IFN による ISRE リポーター誘導能は Toosendanin 0.01~0.1 μ g/ml 併用下では有意に高く、IFN 作用を増強することが示された。

Toosendanin 併用下では IFN による STAT2 リン酸化が増強した。

Toosendanin 前投与 24 時間後に IFN-λ1、λ2、λ3 をそれぞれ添加したところ IFN 誘導性の ISRE リポーター活性の誘導がより顕著に見られ、Toosendanin は IFN-λ 下流のシグナルを亢進することが示された。



(2) HEK293/IL28B 細胞株を用いて、1,037 化合物の一次スクリーニングを終了し、IFN-λ (IL28B) プロモーター活性を亢進させる 68 化合物を同定した。



D. 結論

Toosendanin は強力かつ特異的な HCV 複製抑制効果を認め、新規抗 HCV 治療薬としての可能性が示唆された。作用基序として、ISRE 活性の上昇およびその上流 STAT2 のリン酸化が増加しており、ISG3 量体もしくはその上流に作用点があると考えられた。

E. 来年度以降の研究課題

- IFN-λ シグナル解析のため、その発現系・応答系を別個に解析するためのリポータープラスミドおよび標的培養細胞系を構築する。IFN-λ 発現系として IL28A、IL28B および IL29 遺伝子の転写調節領域を含むルシフェラーゼリポータープラスミドを構築し、転写調節に関連する上流の蛋白の解析を進める。IFN-λ 応答系として ISRE-リポータープラスミドおよび IFN-λ レセプター発現細胞下部を使用する。

- IFN-λ 発現を増強する化合物、および IFN-λ 依存性の遺伝子発現を増強する化合物を探索を継

続し、同定された小分子の IFN-λ シグナル増強機構を解析する。さらに、独自に開発した HCV レプリコン系および HCV-JFH1 ウイルス培養系を用いて抗ウイルス効果の検証を行う。

F. 研究発表

[論文発表]

1. Nakagawa M, **Sakamoto N**, Watanabe T, Nishimura-Sakurai Y, Onozuka Y, Azuma S, Kakinuma S, Nitta S, Kiyohashi K, Kusano-Kitazume A, Murakawa M, Yoshino K, Itsui Y, Tanaka Y, Mizokami M, Watanabe M, Ochanomizu Liver Conference Study Group: Association of ITPA gene variant and serum ribavirin concentration with blood cells decline in pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Int* 2012; *Epub ahead of print*.

2. Kohjima M, Enjoji M, Yoshimoto T, Yada R, Fujino T, Aoyagi Y, Fukushima N, Fukuizumi K, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Nakashima M, **Sakamoto N**, Tanaka Y, Nakamuta M. Add-on therapy of pitavastatin and eicosapentaenoic acid improves outcome of peginterferon plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013; 85(2):250-260.

3. Nitta S, **Sakamoto N**, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 2013; 57(1):46-58.

4. Yamashita A, Abdus K, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, **Sakamoto N**, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Thuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Marine Drugs* 2012; 10(4):744-761.

5. Kobayashi T, Hige S, Terashita K, Nakai M, Horimoto H, Sho T, Nakanishi M, Ogawa K, Chuma M, **Sakamoto N**, Asaka M: Anemia and thrombocytosis induced by ribavirin monotherapy in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2012; 47(11):1228-1237.

6. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, tani H, Ikeda M, Kato N, **Sakamoto N**, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K: Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Haliclona* (*Reniera*) sp. *Plos One* 2012;7(11):e48685.
7. Li YJ, Wu HH, Weng CH, Chen YC, Hung CC, Yang CW, Wang YL, **Sakamoto N**, Tian YC: Cyclophilin A and nuclear factor of activated T cells are essential in cyclosporin A-mediated suppression of polyomavirus BK replication. *Am J Transplantation* 2012; 12:2348-2362.
8. Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, **Sakamoto N**, Katayama K, Mizuguchi H: Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Research* 2012; 165(2):214-218.
9. Cheng J-C, Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, **Sakamoto N**, Huang HD: Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(15):2621-2633.
10. Nichols DB, Fournet G, Gurukumar KR, Basu A, Lee JC, **Sakamoto N**, Kozielski F, Musmuca I, Joseph B, Ragno R, Kaushik-Basu N: Inhibition of hepatitis C virus NS5B polymerase by S-trityl-L-cysteine derivatives. *Eur J Med Chem* 2012; 49:191-199.
11. Kusano-Kitazume A, **Sakamoto N** (equal contribution), Okuno Y, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Kiyonashi K, Nitta S, Murakawa M, Azuma S, Nishimura-Sakurai Y, Hagiwara M, Watanabe M: Identification of novel N-(morpholine-4-carboxyloxy) amidine compounds as potent inhibitors against hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agent Chemother* 2012; 56(3):1315-1323.
12. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, **Sakamoto N**, Izumi N: Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response.

Hepatology 2012; 55(1):20-29.

2. 学会発表

1. Yeh YJ, Tseng CP, Hsu SD, Chang YL, **Sakamoto N**, Huang HD, Cheng JC: Let-7b is a novel regulator of hepatitis C virus replication. *J Hepatol* 2011; in submission.. 19th. International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Oct-5-2012, Venice, Italy.

G. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

出願番号：特願 2011-194082

発明の名称：C型肝炎ウイルスの増殖を抑制する医薬組成物

発明者：坂本直哉、渡辺守、北詰晶子、萩原正敏、奥野友紀子

特許出願人：東京医科歯科大学

提出日：平成 23 年 9 月 6 日

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者：渡邊 綱正 名古屋市立大学 大学院医学研究科 講師

分担研究課題：C 型肝炎ウイルス感染肝内自然免疫応答における IL28B SNPs の影響

研究要旨：PEG-IFN α /RBV併用療法によるC型肝炎治療効果予測因子であるIL28B SNPsのメカニズム解明のため、HCV感染患者に対する抗ウイルス効果と獲得免疫が除去されたヒト肝細胞置換キメラマウスHCV感染モデルの抗ウイルス効果を比較して、肝内自然免疫応答の影響を検討した。キメラマウスでは肝内ISG誘導能はIL28B SNPによる差異を認めなかったが、IL28Bを含めたIFN λ s発現量がSNPにより異なっていた。したがって、IL28B SNPによるC型肝炎治療効果の差はこのIFN λ 量がKeyであると類推され、産生されるIFN λ を介した獲得免疫の修飾がHCV排除に重要であると考えられた。

A. 研究目的

PEG-IFN α /RBV併用療法によるC型肝炎治療効果予測にIL28B（Ⅲ型IFNであるIFN λ ）の遺伝子多型(SNPs)が影響することから、これまでにIFN- λ の機能解析が精力的に進められている。当該研究ではIL28B SNPとIFN α 製剤による治療効果の関連性をin vivoモデルで解析し、肝内におけるIFN λ の役割を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

C型肝炎治療効果は、生体の自然免疫応答と獲得免疫応答の協調作業によると考えられる。生体応答を明らかとするために、獲得免疫が除去されたSCIDマウスを背景とするヒト肝細胞置換キメラマウスのHCV感染モデルを用いて自然免疫応答を検討した。ヒト肝細胞のIL28B SNPをメジャー型(MA)とヘテロ型(HE)の2系統作成し、さらに感染源であるHCV患者血清を3種類(血清

A, B, C) 用いた。HCV持続感染成立後、PEG-IFN α (30 μ g/kg)を2週間投与し、血中HCV-RNA titer変動、および肝内のインターフェロン誘導遺伝子(Interferon Stimulated Genes: ISGs)とIFN λ s (IL28A, 28B, 29)の発現レベルを定量し、IL28B SNPによる差異を解析した。また、HCV感染患者(IL28B SNPのMA (n=34)、HE (n=20))のPEG-IFN α 治療中における血中HCV-RNA推移と比較解析した。

C. 研究結果

T, B細胞機能不全であるキメラマウスにHCV持続感染が成立した後PEG-IFN α を投与すると、3種類いずれの感染源においても移植した肝細胞IL28B SNPによる抗HCV効果に差は認めなかった。さらに、PEG-IFN α 初回投与後の肝内ISGs定量的結果、抗ウイルス作用を示すMxA, OAS1, PKR、さらに病原体関連分子パターン(PAMP)である

TLR-3, RIG-I 発現量は、IL28B SNP による差を認めなかった。しかしながら、肝内 IFN- λ s 発現量は MA の方が有意に高かった ($P < 0.05$)。一方、HCV 感染患者の PEG-IFN α 投与による HCV-RNA 変動は、IFN 投与 24 時間後までの第 1 相と IFN 投与 1 週目以降の第 2 相ともに MA と HE で異なっており、キメラマウスの結果と合わせると、肝内 IFN λ を介する免疫反応が IL28B SNP の MA と HE で異なる可能性が示唆された。

D. 考察

今回のキメラマウスを用いた検討から IL28B SNP に依存した IFN λ を介する肝内免疫細胞、特に樹状細胞 (DC) の機能が、HCV 排除に大きく影響する可能性が類推される。また、IL28B SNP による C 型肝炎治療効果の差は、投与された PEG-IFN α により産生される IFN λ 量の差によると想定された。

E. 結論

獲得免疫が除去されたヒト肝細胞置換キメラマウスの HCV 感染モデルと、HCV 感染患者の PEG-IFN α 投与による HCV-RNA 変動を比較した結果、IL28B SNP による C 型肝炎治療効果の差は PEG-IFN α により産生される IFN λ 量によると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sandalova E, Laccabue D, Boni C, **Watanabe T**, Tan A, Zong ZH, Ferrari C, Bertolotti A. Increased Levels of Arginase in Patients With Acute Hepatitis B Suppress Antiviral T Cells. *Gastroenterology*. 2012;143:78-87.
- 2) **Watanabe T**, Sugauchi F, Tanaka Y, and Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by

administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *GUT*. 2012 in press.

- 3) **Watanabe T**, and Tanaka Y. Reactivation of hepatitis viruses following immunomodulating systemic chemotherapy. *Hepatol Res*. 2012 in press.
- 4) Sakamoto T, Tanaka Y, **Watanabe T**, and Mizokami M. Mechanism of the dependence of hepatitis B virus genotype G on co-infection with other genotypes for viral replication. *J Viral Hepat*. 2012 in press.

2. 学会発表

- 1) C 型肝炎治療効果を修飾するインターフェロン λ シグナルの解析. **渡邊綱正**, 飯島沙幸, 田中靖人. 第 48 回日本肝臓学会総会. 平成 24 年 6 月 7 日~8 日. 金沢. オープンワークショップ.
- 2) IP-10 値を含めた PEG-IFN/RBV 療法における治療予測因子の検討. 松浦健太郎, 田中靖人, 飯尾悦子, 日下部篤宣, 新海登, 宮木知克, 野尻俊輔, **渡邊綱正**, 藤原圭, 折戸悦朗, 城卓志, 溝上雅史. 第 48 回日本肝臓学会総会. 平成 24 年年 6 月 7 日~8 日. 石川.
- 3) HIV 合併 HBV 感染例において核酸アナログ add-on ペグインターフェロン併用療法による HBs 抗原セロコンバージョンの可能性. **渡邊綱正**, 横幕能行, 杉浦互, 田中靖人. JDDW2012. 平成 24 年 10 月 10 日~11 日. 神戸.
- 4) B 型肝炎既往感染患者における HBs 抗体価の性差. 飯尾悦子, **渡邊綱正**, 松浦健太郎, 日下部篤宣, 新海登, 藤原圭, 宮木知克, 野尻俊輔, 城卓志, 田中靖人. 第 16 回日本肝臓学会大会.

- 平成 24 年 10 月 10 日～11 日. 神戸.
- 5) 2 剤, 3 剤併用療法における, IP-10 の治療前, 治療開始早期の推移と治療効果, ウイルス動態に与える影響. 松浦健太郎, 飯尾悦子, 日下部篤宣, 新海登, 藤原圭, 宮木知克, 野尻俊輔, 村上周子, 渡邊綱正, 折戸悦朗, 城卓志, 田中靖人. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 10 日～11 日. 神戸
- 6) 末梢血単核球を用いた C 型慢性肝炎患者 PEG-IFN/RBV 投与直後の ISG 挙動. 飯島沙幸, 渡邊綱正, 松浦健太郎, 飯尾悦子, 新海登, 村上周子, 田中靖人. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 10 日～11 日. 神戸
- 7) 核酸アナログを投与した B 型慢性肝炎患者における interferon-inducible protein-10 値の動態. 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. 第 16 回日本肝臓学会大会. 平成 24 年 10 月 10 日～11 日. 神戸
- 8) HIV 合併 HBV 感染例に対するペグインターフェロン治療. 渡邊綱正, 横幕能行, 今村淳治, 杉浦互, 田中靖人. 第 26 回日本エイズ学会学術集会・総会. 平成 24 年 11 月 24 日～26 日. 横浜口演.
- 9) HIV 治療に伴う B 型肝炎免疫再構築症候群の検討. 渡邊綱正, 杉浦互, 田中靖人. 第 39 回日本肝臓学会東部会. 平成 24 年 12 月 6 日～7 日. 東京. シンポジウム.
- 10) Immune restoration hepatitis B associated with anti-retroviral therapy for human immunodeficiency virus. Watanabe T, Iijima S, Murakami S, Iio E, Shinkai N, Matsuura K, Yokomaku Y, Imamura J, Sugiura W, Tanaka Y.

International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Sep. 22-25, 2012. London.

- 11) Characteristics of anti-HBs titers by gender and age in HBV-resolved patients. Iio E, Watanabe T, Tanaka Y, Matsuura K, Shinkai N, Nojiri S, Joh T. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 9-13, 2012. Boston.
- 12) IL28B genetic variants and serum IP-10 level associated with virological response to PEG-IFN/RBV and PEGIFN/RBV/Telaprevir therapy. Matsuura K, Tanaka Y, Watanabe T, Murakami S, Iio E, Endo M, Shinkai N, Fujiwara K, Miyaki T, Nojiri S, Joh T, Kusakabe A, Orito E, Mizokami M. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Nov. 9-13, 2012. Boston.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 24 年度）

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者：本多 政夫 金沢大学医学部先端医療技術学 教授

分担研究課題：肝炎の進展、治療反応性に寄与する宿主遺伝子発現データベース
の構築

研究要旨：ゲノムワイド関連解析（GWAS）による一塩基多型（SNP）解析により、IFN 療法に対する反応性に加え、肝炎の進展に寄与する宿主因子の違いも明らかにされることが期待される。PegIFN+RBV 併用療法を受けた C 型慢性肝炎症例の治療前の末梢血液の ISG の発現変化と治療効果及び IL28B 遺伝子多型との関連性について検討した。さらに、15 例の治療前の肝組織を用いてレーザーキャプチャー・マイクロダイセクション（LCM）にて肝小葉部と門脈域細胞浸潤を別々に採取し、遺伝子発現を解析した。IL28B マイナーでは、肝細胞では ISG の高発現が見られるものの、マクロファージや T 細胞の免疫担当細胞の浸潤が抑制されていた。従って IL28B マイナーでは IFN 療法の反応不良の要因として、治療前の ISG 高値に加え、免疫担当細胞の浸潤不良が要因の一つとして挙げられた。また、遺伝子発現プロファイルの検討から IL28B マイナーでは non-canonical wnt シグナル・リガンドである Wnt5A の発現亢進が認められた。Wnt5A シグナルの活性化が ISG 高値と関連している可能性が示唆された。

A. 研究目的

肝炎の進展や IFN 療法の反応性の違いにはウイルス側因子に加え、宿主側因子の果たす役割が極めて重要と考えられる。ゲノムワイド関連解析（GWAS）による一塩基多型（SNP）解析により、IFN 療法に対する反応性の違いや、肝炎の進展に寄与する宿主因子の違いが明らかにされることが期待される。一方で、ゲノム上で認められる変化が実際に遺伝子発現の変化として再現されるかを網羅的遺伝子発現により解析することが病態の解明と治療への応用という観点から重要である。

B. 研究方法

PegIFN+RBV 併用療法を施行した C 型慢性肝炎症例 168 例を対象とした。91 症例において治療前の肝組織及び末梢血液の遺伝子発現プロファイルリングを Affymetrix gene chip（133U Plus 2.0）にて解析した。また、治療前の末梢血液の ISG の発現変化と治療効果及び IL28B 遺伝子多型との関連性に付き検討した。さらに、15 例の治療前の肝組織を用いてレーザーキャプチャー・マイクロダイセクション（LCM）にて肝小葉部と門脈域細胞浸潤を別々に採取し、遺伝子発現を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究において試料提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取り扱いについて十分な配慮を行った。本解析は遺伝子発現及び蛋白の発現についての解析であるが、「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)に準じた十分な対応を行い、患者よりの試料採取については、金沢大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」で承認された説明文書を用いてインフォームドコンセントを得て行っており、十分な対応を行った。

C. 研究結果

PegIFN+Rib 併用療法を施行した症例の治療前の肝生検組織では ISG を高発現している群では IFN 療法の反応が不良であり、ISG 低発現群では IFN 療法の反応が良好である傾向が認められることを先に報告した(Gastroenterology 2010)。治療前の末梢血液の ISG 発現は肝組織と異なり末梢血液では治療反応例と不応例では ISG の発現に差は認められなかった。治療前の肝組織と末梢血液の遺伝子発現を比較すると、IL28B メジャーでは肝組織における ISG 発現と末梢血液の ISG 発現は有意に相関し、肝組織における遺伝子発現と末梢血液の遺伝子発現は一致した傾向が認められた。一方、IL28B マイナーでは肝組織と末梢血液の ISG 発現の関連性は消失し、肝組織で ISG 高値にかかわらず末梢血の ISG は低い傾向が認められた。LCM の検討では、IL28B メジャーでは肝小葉部の ISG 発現パターンと門脈域細胞浸潤の ISG 発現パターンが一致していたが、IL28B マイナーでは肝小葉部の ISG 発現が高値にかかわらず門脈域細胞浸潤の ISG 発現が低い傾向が認め

られた。ISG の一つである IFI44L 及び CD163、CD8 の免疫染色では IL28B マイナーでは、肝細胞では IFI44L の高発現が見られるものの、CD163、CD8 などのマクロファージや T 細胞の免疫担当細胞の浸潤が抑制されていた。従って、IL28B マイナーでは IFN 療法の反応不良の要因として、治療前の ISG 高値に加え、免疫担当細胞の浸潤不良が要因の一つと考えられた。

一方、ISGs 誘導因子に関して、IL28A/B 発現は肝内 ISGs と有意な相関を示したが、IFN- β 発現は肝内 ISGs と相関せず、肝内 ISGs は主に IL28A/B で誘導されていることが明らかとなった。IL28B マイナーでは肝内 ISGs 高値に見合った IL28A/B の発現が見られず、IL28A/B 以外にも ISGs を誘導する因子の存在が示唆された。

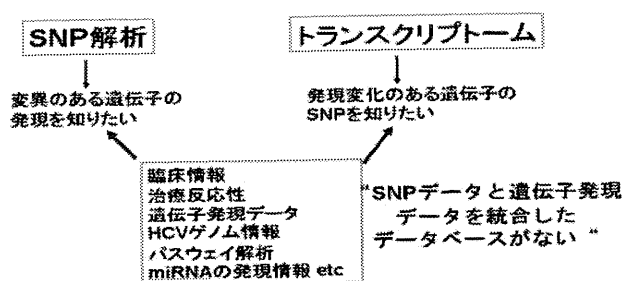
遺伝子発現プロファイルの検討から IL28B マイナーでは non-canonical wnt シグナル・リガンドである Wnt5A の発現亢進が認められた。Wnt5A とそのレセプター FZD5 の発現は IL28B マイナーで有意に発現亢進しており、肝内 ISGs と有意な相関を認めた。

IL28B マイナーでは Wnt5A シグナルの活性化が ISG 高値と関連している可能性が示唆された。

D. 考察

遺伝子発現解析とゲノムワイド関連解析を組み合わせることで、病態の解明と新しい治療法開発が可能になると考えられる。

SNPデータと遺伝子発現データの統合



今回の検討から、IL28B マイナーでは IFN 療法の反応不良の要因として、治療前の ISG 高値に加え、免疫担当細胞の浸潤不良が要因の一つとして考えられた。さらに、IL28B マイナーでは Wnt5A の発現亢進が認められ、ISGs 高値に寄与している可能性が示唆された。

E. 結論

IL28B マイナーの治療抵抗性の要因として、治療前の ISG 高値に加え、免疫担当細胞の浸潤不良が示唆された。また、IL28B マイナーの ISGs 高値の要因として Wnt5A の発現亢進の関与が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gene expression profiling of hepatitis B- and hepatitis C-related hepatocellular carcinoma using graphical Gaussian modeling. Ueda T, **Honda M**, Horimoto K, Aburatani S, Saito S, Yamashita T, Sakai S, Nakamura M, Takatori H, Sunagozaka H, Kaneko S. *Genomics. in press*
- 2) Association of Interleukin 28B genotype and hepatocellular carcinoma recurrence in patients with chronic hepatitis C. Hodo Y, **Honda M**, Tanaka A, Nomura Y, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Sasaki M, Nakanuma Y, Moriyama M, Kaneko S.

Clinical Cancer Research. in press

3) Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Yamashita T, **Honda M**, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Kondo TH, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S.

Hepatology. 2012 Nov 23. [Epub ahead of print]

4) Association of changes in the gene expression profile of blood cells with the local tumor inflammatory response in a murine tumor model. Sakai Y, Tatsumi I, Higashimoto M, Seki A, Nasti A, Yoshida K, Kawaguchi K, Wada T, **Honda M**, Komura T, Kaneko S. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Nov 9;428(1):36-43.

5) Genome-wide Association Study Identifies TNFSF15 and POU2AF1 as Susceptibility Loci for Primary Biliary Cirrhosis in the Japanese Population. Nakamura M, Nishida N, Kawashima M, Aiba Y, Tanaka A, Yasunami M, Nakamura H, Komori A, Nakamura M, Zeniya M, Hashimoto E, Ohira H, Yamamoto K, Onji M, Kaneko S, **Honda M**, Yamagiwa S, Nakao K, Ichida T, Takikawa H, Seike M, Umemura T, Ueno Y, Sakisaka S, Kikuchi K, Ebinuma H, Yamashiki N, Tamura S, Sugawara Y, Mori A, Yagi S, Shirabe K, Taketomi A, Arai K, Monoe K, Ichikawa T, Taniai M, Miyake Y, Kumagi T, Abe M, Yoshizawa K, Joshita S, Shimoda S, Honda K, Takahashi H, Hirano K, Takeyama Y, Harada K, Migita K, Ito M, Yatsuhashi H, Fukushima N, Ota H, Komatsu T, Saoshiro T, Ishida J, Kouno H, Kouno H, Yagura M, Kobayashi M, Muro T, Masaki N, Hirata K, Watanabe Y, Nakamura Y, Shimada M, Hirashima

- N, Komeda T, Sugi K, Koga M, Ario K, Takesaki E, Maehara Y, Uemoto S, Kokudo N, Tsubouchi H, Mizokami M, Nakanuma Y, Tokunaga K, Ishibashi H. *Am J Hum Genet.* 2012 Oct 5;91(4):721-728.
- 6) Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. Mizukoshi E, Fushimi K, Arai K, Yamashita T, **Honda M**, Kaneko S. *Liver Int.* 2012 Nov;32(10):1516-26.
- 7) Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, **Honda M**, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. *PLoS One.* 2012;7(6). e39175.
- 8) No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, **Honda M**, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. *BMC Med Genet.* 2012 Jun; 13: 47.
- 9) Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. Okada H, **Honda M**, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S. *Cancer Res.* 2012 Sep 1;72(17):4459-71.
- 10) Guideline on the use of new anticancer drugs for the treatment of Hepatocellular Carcinoma 2010 update. Kaneko S, Furuse J, Kudo M, Ikeda K, **Honda M**, Nakamoto Y, Onchi M, Shiota G, Yokosuka O, Sakaida I, Takehara T, Ueno Y, Hiroishi K, Nishiguchi S, Moriwaki H, Yamamoto K, Sata M, Obi S, Miyayama S, Imai Y. *Hepatol Res.* 2012 Jun;42(6):523-542.
- 11) Beneficial effect of branched-chain amino acid supplementation on glycemic control in chronic hepatitis C patients with insulin resistance: implications for type 2 diabetes. Takeshita Y, Takamura T, Kita Y, Ando H, Ueda T, Kato K, Misu H, Sunagozaka H, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, **Honda M**, Kaneko S. *Metabolism.* 2012 Oct;61(10):1388-94.
- 12) Coexpression network analysis in chronic hepatitis B and C hepatic lesions reveals distinct patterns of disease progression to hepatocellular carcinoma. He D, Liu ZP, **Honda M**, Kaneko S, Chen L. *J Mol Cell Biol.* 2012 Jun;4(3):140-52.
- 13) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 in association with hTERT is a potential biomarker for hepatocellular carcinoma.

Mizuno H, Honda M, Shirasaki T, Yamashita T, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S. *Liver Int.* 2012 Aug;32(7):1146-55.

14) Induction of elastin expression in vascular endothelial cells relates to hepatoportal sclerosis in idiopathic portal hypertension: possible link to serum anti-endothelial cell antibodies. Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Morikawa H, Shiomi S, Honda M, Kaneko S, Nakanuma Y. *Clin Exp Immunol.* 2012 Mar;167(3):532-42.

15) Identification of blood biomarkers of aging by transcript profiling of whole blood. Nakamura S, Kawai K, Takeshita Y, Honda M, Takamura T, Kaneko S, Matoba R, Matsubara K. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Feb 10;418(2):313-8.

16) A randomized phase II trial of intra-arterial chemotherapy using SM-11355 (Miriplatin) for hepatocellular carcinoma. Okusaka T, Kasugai H, Ishii H, Kudo M, Sata M, Tanaka K, Shioyama Y, Chayama K, Kumada H, Yoshikawa M, Seki T, Saito H, Hayashi N, Shiratori K, Okita K, Sakaida I, Honda M, Kusumoto Y, Tsutsumi T, Sakata K. *Invest New Drugs.* 2012 Oct;30(5):2015-25.

2. 学会発表

1) Impaired Infiltration of Immune Regulatory Cells into Liver Lobules of Chronic Hepatitis C Patients with Interferon-Resistant IL28B Genotype. M. Honda, A. Sakai, T. Shirasaki, M. Nakamura, T. Yamashita, K. Arai, T.

Shimakami, Y. Sakai, T. Yamashita, E. Mizukoshi, S. Kaneko. AASLD2012 (63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012)., Boston, U.S.A., 2012.

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者：五條堀 孝 国立遺伝学研究所 生命情報研究センター 教授

分担研究課題：肝炎ウイルス統合データベースの構築およびネットワーク解析

研究要旨：ウイルス性肝炎に関して、宿主(ヒト)側とウイルス側双方の要因のデータを収集し、患者より得られた臨床情報を加えて多次的に構成されたデータベースを構築し、継続的に情報および機能の拡充を図った。また、C型肝炎の薬剤反応性に影響を及ぼすと考えられる遺伝子およびそれらと相互作用の推定される遺伝子に関するネットワーク解析を、同データベースを応用して遂行した。併せて、同解析により得られた知見を基に、同データベースの拡充に必要な機能定義を行った。

A. 研究目的

本研究では、ウイルス性肝炎を特徴付けるプロファイルを構築し、それがテラーメイド医療の分野で利用されることを目的としている。その実現のために構築されたデータベースを、実際にホスト側要因のネットワーク解析に応用し、特にC型肝炎の治療効果を決める因子の関係性に関する知見を得る。さらに、その知見を踏まえ、同データベースの有用性向上を目指した機能拡充の方向付けを行う。

B. 研究方法

同データベースを活用したこれまでの知見により、C型肝炎治療のインターフェロン副作用に有意に相関する遺伝子座が判明しているため、それらの遺伝子産物およびその周辺の蛋白質間相互作用を対象に計算機上でネットワーク解析を行う。その結果をフィードバックすることで、同データベースの機能拡充の指針を策定する。

C. 研究結果

上記遺伝子産物に該当する ITPA およびその周辺の蛋白質間相互作用解析をゲノムネットフォームで遂行することで、IFN λ 特異的 ISG、肝臓特異的 ISG を同定し、それらの相互作用ネットワークを確認できた。

D. 考察

前述の結果より、蛋白質間相互作用ネットワーク解析が C 型肝炎の治療機序を決める因子の関係性を調べる上で重要であると考えられるため、同解析に活用可能な遺伝子発現情報を肝炎ウイルス統合データベースへ導入することが有用性向上に効果的であると考えられる。

E. 結論

蛋白質間相互作用ネットワーク解析の有用性を示すことができ、それを基にデータベースの機能拡充の指針を策定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takeda J, Yamasaki C, Murakami K, Nagai Y,
Sera M, Hara Y, Obi N, Habara T, **Gojobori T**,
Imanishi T. H-InvDB in 2013: an omics study
platform for human functional gene and transcript
discovery. Nucleic Acids Res. 2013
Jan;41(Database issue):D915-9.

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書（平成 24 年度）

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築・治療応用に関する研究

分担研究者： 新井 理 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

分担研究課題：ウイルス性肝炎に対する応答性を既定する宿主因子も含めた情報の
データベース構築

研究要旨：ウイルス性肝炎に関して、宿主(ヒト)側とウイルス側双方の要因のデータを収集し、患者より得られた臨床情報を加えて多次元的に構成されたデータベースを構築し、継続的に臨床情報の拡充を遂行した。また、有用性向上のため、遺伝子発現情報の導入に必要な機能を構築し、実際にデータを導入した。併せて、SNP情報、臨床情報と相互参照可能な利用者インターフェースを準備して班員に公開した。

A. 研究目的

本研究では、ウイルス性肝炎を特徴付けるプロフィールを構築し、それがテーラーメイド医療の分野で利用されることを目的としている。その実現のために構築されたデータベースの宿主側因子の情報を拡充し、また、班員の利便性を考慮したインターフェースを準備する。

B. 研究方法

五條掘班員の成果より同データベースへの遺伝子発現情報の導入が要請されているため、それを実現するデータベーススキーマの改定を行い、遺伝子発現情報を導入し SNP 情報および臨床情報と関連付けるシステムを構築する。また、全情報を統一的に取り扱うことの可能な利用者インターフェースを準備する。

C. 研究結果

上記機能を構築して実際にデータを導入し、また、各遺伝子の既知の書誌情報を可能な限り取得して同データベースへ導入した。これにより、臨

床情報、SNP 情報、もしくは遺伝子発現情報をキーとして、これら全情報にアクセスでき、かつ、これらを相互参照可能な形式で一覧でき、また、遺伝子の詳細情報に容易にアクセス可能となった。併せて、heatmap および dendrogram の導入により、遺伝子発現情報の相互比較が視覚的に可能となった。

D. 考察

遺伝子発現情報の導入により、本データベースの利用上の有用性が向上したと考えられる。

E. 結論

本データベースの有用性向上、および今後の遺伝子発現情報充実化の枠組みの準備が実現できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所得権の所得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 研究成果の刊行一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>渡邊綱正</u> , <u>田中靖人</u> .	HCV 感染と IL28B	小俣政男	2012-2013 肝疾患 Review	日本メディ カルセンタ ー	東京都千代 田区	2012	96-101
<u>渡邊綱正</u> .	慢性肝炎・ 肝硬変	日本臨床検 査医学会ガ イドライン 作成委員会	臨床検査のガ イドライン JSLM2012 検 査値アプロー チ／症候／疾 患	株式会社 宇宙堂八木 書店	東京都千代 田区	2012	279-283

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
Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, <u>Tokunaga K</u> , <u>Tanaka Y</u> , Sugiyama M, <u>Mizokami M</u> , Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K.	Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma.	PLoS One.	7(9)	e44743	2012
*Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, <u>Kurosaki M</u> , Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, <u>Honda M</u> , Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, <u>Tanaka Y</u> , <u>Tokunaga K</u> , <u>Mizokami M</u> .	Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean.	PLoS One.	7(6)	e39175	2012

Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, <u>Kurosaki M</u> , Asahina Y, Izumi N, <u>Honda M</u> , Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, <u>Tanaka Y</u> , <u>Mizokami M</u> , <u>Tokunaga K</u> .	No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations.	BMC Med Genet.	13	47	2012
Michikawa T, Inoue M, Sawada N, Iwasaki M, <u>Tanaka Y</u> , Shimazu T, Sasazuki S, Yamaji T, <u>Mizokami M</u> , Tsugane S; Japan Public Health Center-based Prospective Study Group.	Development of a prediction model for 10-year risk of hepatocellular carcinoma in middle-aged Japanese: the Japan Public Health Center-based Prospective Study Cohort II.	Prev Med.	55(2)	137-143	2012
Kani S, <u>Tanaka Y</u> , Matsuura K, <u>Watanabe T</u> , <u>Yatsushashi H</u> , Orito E, Inose K, Motojuku N, Wakimoto Y, <u>Mizokami M</u> .	Development of new IL28B genotyping method using Invader Plus assay.	Microbiol Immunol.	56(5)	318-323	2012
Kim SR, El-Shamy A, Imoto S, Kim KI, Ide YH, Deng L, Shoji I, <u>Tanaka Y</u> , Hasegawa Y, Ota M, Hotta H.	Prediction of response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C genotype 1b and high viral load.	J Gastroenterol.	47(10)	1143-1151	2012
Sawada N, Inoue M, Iwasaki M, Sasazuki S, Shimazu T, Yamaji T, Takachi R, <u>Tanaka Y</u> , <u>Mizokami M</u> , Tsugane S; Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group.	Consumption of n-3 fatty acids and fish reduces risk of hepatocellular carcinoma.	Gastroenterology	142(7)	1468-1475	2012

Yamaguchi Y, Tamori A, Tanaka Y , Iwai S, Kobayashi S, Fujii H, Morikawa H, Hagihara A, Enomoto M, Kawada N.	Response-guided therapy for patients with chronic hepatitis who have high viral loads of hepatitis C virus genotype 2.	Hepatol Res.	42(6)	549-557	2012
Date T, Morikawa K, Tanaka Y , Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M , Wakita T.	Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone.	Microbiol Immunol.	56(5)	308-317	2012
*Kohjima M, Enjoji M, Yoshimoto T, Yada R, Fujino T, Aoyagi Y, Fukushima N, Fukuizumi K, Harada N, Yada M, Kato M, Kotoh K, Nakashima M, Sakamoto N , Tanaka Y , Nakamuta M.	Add-on therapy of pitavastatin and eicosapentaenoic acid improves outcome of peginterferon plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C.	J Med Virol.	85(2)	250-260	2013
* Watanabe T , Sugauchi F, Tanaka Y , Matsuura K, Yatsushashi 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- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene.	Gut	in press.		2012
渡邊綱正 , 田中靖人 .	特集 抗ウイルス薬－最新の動向－ テーラーメイド医療時代の C 型肝炎治療	日本臨牀	70(4)	681-687	2012
*Kawashima M, Ohashi J, Nishida N, Tokunaga K .	Evolutionary analysis of classical HLA class I and II genes suggests that recent positive selection acted on DPB1*04:01 in Japanese population.	PLoS One.	7(10)	e46806	2012
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.	86 (4)	2143-2152	2012