

治療抵抗性 HCV 感染のウイルス遺伝子変異測定法の開発と応用

分担研究者：加藤 直也 東京大学医科学研究所疾患制御ゲノム医学ユニット  
特任准教授

研究要旨

1) C型慢性肝炎においてペグインターフェロン、リバビリン併用療法（PEG-IFN/RBV）抵抗性に関わるコア蛋白第70番目アミノ酸の野生型/変異型C型肝炎ウイルス（HCV）の個別定量を行い、null virological responderの予測には定性検査よりも定量検査による変異型 HCV 比が有用であること、また、変異型 HCV 比は IL28B マイナー型（治療抵抗性型）、血小板減少と有意に相関することを明らかにした。2) ゲノムワイド関連解析を行い、C型慢性肝炎から肝硬変への進展を規定する宿主因子につき検討した。HLA-DRB1/DQA/DQB1の発現量を制御している2つのSNPが肝硬変への進展に関与していることを見出した。

A. 研究目的

1) C型慢性肝炎の標準治療として、ペグインターフェロンとリバビリンの併用療法（PEG-IFN/RBV）が行われている。ジェノタイプ（セロタイプ）1型高ウイルス量症例では、その奏成功率はたかだか50%に過ぎないが、治療抵抗性を規定するウイルス側因子として、C型肝炎ウイルス（hepatitis C virus: HCV）コアタンパク第70番目アミノ酸の置換が重要であることが明らかになっている。すなわち、野生型アミノ酸（Arg）を有する患者では、変異型アミノ酸（Gln）を有する患者よりSVR（sustained virological response）率が高い。そこで、Taqman MGB（minor groove binding）probeを応用したreal-time PCR法により、コアタンパク第70番目アミノ酸野生型および変異型の個別定量を行い、治療効果との関連を検討する。また、コアタンパク第70番目アミノ酸変異と関連する宿主側因子についても検討する。さらには、コアタンパク第70番目アミノ酸変異の治療抵抗性メカニズムについても検討する。

2) C型肝炎ウイルス感染から肝硬変、肝癌（HCC）への進展には著しい個人差がある。このような肝病態進展の個人差には、一塩基多型（single

nucleotide polymorphism: SNP）に代表される宿主因子が深く関与している。C型肝炎から肝硬変への進展に関連する宿主側因子（SNP）につき検討する。

B. 研究方法

1) HCV コアタンパク第70番目アミノ酸のArg→Gln変異を高感度に検出・定量するTaqman MGB probeを用いたreal time PCR法により、PEG-IFN/RBVを受けたC型肝炎患者における野生型および変異型の存在状態を明らかにし、治療効果との関連につき検討する。また、PEG-IFN/RBV治療効果を決定する因子を多変量解析により明らかにする。さらに、SVRやNVR（null virological responder）の予測に、コアタンパク第70番目アミノ酸変異の定性検査と定量検査のいずれが有用かを検討する。また、コアタンパク第70番目変異を関連する宿主側因子につき、統計学的に解析する。加えて、野生型と変異型のコアタンパクを肝癌細胞株に発現させ、コアタンパクにより誘導されることがわかっているアポトーシスを規定する分子Bcl-xL発現に及ぼす影響を解析する。

2) C型慢性肝炎から肝硬変への進展に関連する宿主側因子 (SNP) につき、ゲノムワイド関連解析 (genome wide association study: GWAS) を行う。スクリーニングとして、C型慢性肝炎患者 943 例、C型肝硬変患者 676 名につき、約 61 万 SNP を搭載したイルミナ社の SNP チップにより GWAS を行う。続いて、追試として、スクリーニングとは別コホートである C型慢性肝炎 3,914 例、C型肝硬変 936 例を用いて、GWAS にて関連が想定される SNP につき検証する。

(倫理面への配慮)

C型肝炎患者血清を用いた本解析については、東京大学の倫理委員会の承認を受けている。また、C型肝炎患者からは書面による同意を得ている。検体は匿名化され、個人情報には厳格に保護される。

### C. 研究結果

1) Taqman MGB probe を用いた real time PCR 法による HCV コアタンパク第 70 番目アミノ酸野生型と変異型の個別高感度定量により、PEG-IFN/RBV を行った 36 例の C型慢性肝炎患者において、野生型と変異型の存在比率を検討したところ、36 例中 26 例 (72%) が野生型と変異型の両者を有する混在型であった。変異型の比率が高くなるほど、EVR および SVR が得られにくかった。

SVR 予測因子を検討したところ、単変量解析では、 $\gamma$ -GTP 低値、HCV RNA 低値、コアタンパク第 70 番目アミノ酸変異株比率低値、IL28B 遺伝子型メジャータイプが挙げられたが、多変量解析を行ったところ、残った因子は IL28B 遺伝子型のみであった。NVR 予測因子を検討したところ、単変量解析では血小板低値、コアタンパク第 70 番目アミノ酸変異株比率高値、IL28B 遺伝子型マイナー型が挙げられたが、多変量解析を行ったところ、残った因子はコアタンパク第 70 番目アミノ酸変異株比率高値、IL28B 遺伝子型マイナー型であった。すなわち、コアタンパク第 70 番目アミノ酸変異比率高値は、IL28B マイナー型とは独立した NVR の予測因子であった。

NVR の予測には、ダイレクトシーケンスよりも変異型 HCV 比が有用であった。

また、変異型 HCV 存在比率は IL28B マイナー型、血小板数低下と関連していた。すなわち、IL28B 遺伝子型が治療抵抗型でコアタンパク第 70 番目アミノ酸は変異、またより病期が進行した例でコアタンパク第 70 番目アミノ酸は変異していると考えられた。野生型および変異型のコアタンパクを HepG2 細胞に発現させ、Bcl-xL 発現に及ぼす影響につき検討したところ、変異型 HCV は、Bcl-xL の発現を野生型より強く誘導し、そのためにアポトーシス抵抗性になっている可能性が示された。

3) GWAS を行い、C型肝炎患者における肝硬変への感受性遺伝子多型として C型肝硬変関連 SNP : GWAS にて  $p < 1 \times 10^{-5}$  を示した 10 SNP を追試したところ、6p21.3 領域の C6orf10 にある SNP1 が  $p = 2.4 \times 10^{-10}$ 、BTNL2/HLA-DRA にある SNP2 が  $p = 9.8 \times 10^{-11}$  と、それぞれ肝硬変と関連していた。SNP1 と SNP2 周囲の regional plot を検討したところ、肝硬変と強く関連する SNP は SNP1 および SNP2 周囲の 700 kb の範囲内に多数認められた。当該範囲には HLA を始めとした 21 遺伝子が含まれている。そこで、肝硬変に関与する遺伝子/機能的 SNP 同定のため、ハップマップタイピング情報を元に周辺領域の 6p21.3 領域周囲の imputation 解析を行った。しかしながら、アミノ酸置換など遺伝子機能に影響を与える SNP は認められなかった。そこで、eQTL (イクスプレッション Quantitative Trait Locus) 解析を行った。これは、408,273 SNP とヒト B リンパ球での 20,599 遺伝子発現との関連を検討したデータベース (Ling et al. 2008) に基づき、発現量的形質遺伝子座解析を行うものである。その結果、SNP1 のリスクアレルは HLA-DQA、HLA-DRB1 の低発現、また、HLA-DQB1 の高発現と強く関連していることが判明した。

### D. 考察

1) C型慢性肝炎患者では、コアタンパク第 70 番目アミノ酸の野生型と変異型が 1 人の患者の仲で混在しており、治療前の変異型の比率が高いほど、PEG-IFN/RBV 治療に抵抗性である。変異型の比率は、IL28B 遺伝子型が治療抵抗性であるほど高くなり、また、病態が進むほど (血小板が下がるほど) 高く

なる。NVRの予測には、定性検査より、定量による変異型HCV比率が有用であり、本定量法の臨床的意義が示された。治療抵抗性の機序として、変異型はBcl-xLの発現をより強く誘導し、変異型HCV感染肝細胞がアポトーシス抵抗性を獲得している可能性が示された。

2) ゲノムワイド関連解析により、HLA発現が、C型慢性肝炎から肝硬変への進展に重要な役割を担っていることが明らかとなった。ここで同定された二つのSNPは、肝硬変への進展を予測するバイオマーカーになりうる。また、C型慢性肝炎から肝硬変の進展には獲得免疫が重要な役割を担っていることが推測される。C型肝炎からの肝発癌においては、NK細胞を中心とした自然免疫機構が重要な役割を担っているのとは対照的であった。

## E. 結論

C型慢性肝炎のPEG-IFN/RBV治療に於いて、コアタンパク変異が治療効果予測に重要なみならず、抵抗性機序の一端を担っていることが明らかとなった。また、C型慢性肝炎から肝硬変への進展に関連する宿主側遺伝子多型を同定し、HLA遺伝子発現と関連していることから、肝硬変への進展には獲得免疫機構が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kumar V, Lo PHY, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, 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* 2012; 7: e44743
- 2) Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, Koike K, Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K. A genome-wide association

study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region. *J Hepatol* 2013 (Epub ahead of print)

- 3) Lo PHY, Urabe Y, Kumar V, Tanikawa C, Koike K, Kato N, Miki D, Chayama K, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Identification of a functional variant in the MICA promoter which regulates MICA expression and increases HCV-related hepatocellular carcinoma risk. *PLoS One* 2013 (in press)

4) 加藤直也、室山良介、後藤覚. 新規抗ウイルス薬の開発動向と展望 新規抗肝炎ウイルス薬 新規抗HCV薬. *日本臨牀* 2012; 70: 664-670

5) 加藤直也、室山良介、後藤覚. プロテアーゼ阻害薬以外の新規HCV治療薬の開発状況. *Mebio* 2012; 29: 75-81

6) 加藤直也、室山良介、松田浩一. HCV感染のGWAS解析. *肝疾患 Review* 2012-2013. 2012: 108-112

### 2. 学会発表 (国際学会のみ)

- 1) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. A Genome Wide Association Study for HCV-Induced Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2012/10/5-9, Venice, Italy
- 2) Goto K, Muroyama R, Kowatari N, Nakagawa R, Li WW, Kato N. Exploration for inducers of MICA, a GWAS-identified genetic susceptibility factor for HCV-induced HCC. 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, 2012/10/5-9, Venice, Italy
- 3) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li WW, Nakagawa R, Otsuka M, Tateishi R, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. A genome wide association study of HCV induced liver cirrhosis identified novel susceptibility loci at MHC region. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2012/11/9-13, Boston, USA

4) Goto K, Muroyama R, Kowatari N, Nakagawa R, Li WW, Kato N. Short chain fatty acids and HDAC inhibitors are potent suppressors against HCV-induced hepatocarcinogenesis by upregulating MICA, a GWAS-identified HCC susceptibility gene. The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, 2012/11/9-13, Boston, USA

5) Kato N, Urabe Y, Muroyama R, Kowatari N, Goto K, Li W, Nakagawa R, Otuka M, Tateishi R, Yoshida H, Omata M, Chayama K, Koike K, Matsuda K. Genome Wide Association Studies for HCV-Induced Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science”, 2012/11/21-22, Tokyo, Japan

6) Kato N. Host genetics and HCV-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. 2012 Annual Conference of Taiwan Association for the Study of the Liver, 2012/12/22-23, Kaohsiung, Taiwan

7) Kato N. A Genome Wide Association Study for Hepatitis C Virus-Induced Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma. Current and Future Trends in Genome-based Immunity, Infection and Cancer, The 2nd Joint Global COE Symposium of The IMSUT&RCAS Global COE, The University of Tokyo and Chiba University Global COE, 2013/1/28, Tokyo, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

HCV のインターフェロン・リバビリン抵抗性の分子機構に関する研究

分担研究者:加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨

本年度は昨年度に引き続き C 型肝炎ウイルス(HCV)がリバビリン(RBV)に抵抗性を示す分子機構を解明することを目的とした。従来の HCV 研究に多用されてきたヒト肝がん細胞株 HuH-7 とは異なるヒト肝がん細胞株 Li23 を用いて開発した遺伝子型 1b で HCV O 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞を用いて実験を行い、以下に示すような成果を得た。(1) RBV に感受性を示す Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞(3.5 年以上継代培養)から RBV に抵抗性を示すクローン化細胞株(3 株)を樹立した。(2) RBV に感受性を示す親細胞と今年度得られた RBV 抵抗性細胞を用いた cDNA マイクロアレイ解析により RBV 抵抗性細胞で発現レベルが高い 5 遺伝子と逆に発現レベルが低い 6 遺伝子を同定した。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)の感染は肝がん患者の8割に認められており、HCV の持続感染状態である C 型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子である。肝発がんを予防するためには、HCV を体内から排除して持続感染状態を脱することが必須である。C 型慢性肝炎に対する有効な治療薬はこれまでPEG-インターフェロン(PEG-IFN)とリバビリン(RBV)との併用療法が主流で治癒率も 50%程度に留まっていた。最近、HCV プロテアーゼ阻害剤(テラプレビル)が認可され、PEG-IFN と RBV との3剤併用による治療が始まっており、治癒率も 70%以上になるものと期待されている。しかしながら、貧血や重篤な薬疹などの副作用により治療中断を余儀なくされる患者も2剤併用療法に較べて2倍程度になり全体としては3割以上になるものと予想されている。また、65 歳以上の高齢者では治療適応外の割合も多い。さらに、このような治療法に対しても抵抗性を示す患者も依然として多い。そして、IFN や RBV に対して抵抗性を示す分子機序についても、あまりよく分かっていない。そこで、本研究は、HCV がどのような分子機構により IFN や RBV に耐性を示すのかを明らかにすることを目的とした。

IFN については、世界的に汎用されているヒト肝がん細胞株である HuH-7 由来で、我々が独自に開発した全

長 HCV RNA 複製細胞(遺伝子型 1b の O 株)を用いて研究を行った。その結果、IFN- $\gamma$  に対して抵抗性を示す細胞内で複製している HCV 分子種は遺伝的に収束する傾向にあることや IFN- $\gamma$  抵抗性の獲得には、HCV 側と宿主側因子の両方が関与していることを示唆する結果をこれまでに得ている。しかしながら、RBV については、HuH-7 由来の細胞は非感受性であることから、この細胞系は実験には不適であった。

一方、我々は従来の HCV 研究に多用されてきたヒト肝がん細胞株 HuH-7 とは遺伝子発現プロファイルも異なるヒト肝がん細胞株 Li23 を用いて遺伝子型 1b で O 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞株(OL8 や OL11 細胞など)を 2008-2009 年にかけて樹立した。抗 HCV 活性の簡便な定量的アッセイ系(ORL8 と ORL11)も開発して、各種抗 HCV 剤の評価を行った。その中で、ORL8 や ORL11 アッセイ系では RBV に対して高感受性であることを見出した。ORL8 アッセイ系における 50%阻害濃度は  $8.7 \cdot M$  となり RBV を投与された患者血中濃度(約  $10 \cdot M$ )付近の値が得られた。そこで、我々は ORL8 細胞が、RBV の作用機序についての解析に適していると考え、実験を施行した。これまでに我々は RBV の抗 HCV 活性は RBV が IMPDH を阻害して細胞内の GTP レベルを急速に低下させることに起因していることを明らかにした。

さらに、我々は IFN- $\gamma$  や RBV に高感受性を示す Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞からそれぞれの薬剤に抵抗性を示す細胞株を得ることができれば、これらの薬剤の耐性機構を解明できるのではないかと考え、IFN- $\gamma$  や RBV に抵抗性を示す細胞株の樹立を試みた。

その結果、IFN- $\gamma$  に抵抗性を示す細胞株は容易に樹立でき、解析を進めることができた。同様の手法で、RBV に抵抗性を示すポリクローナルな細胞も得られた。そこで今年度は、RBV に抵抗性を示すクローン化細胞株の樹立を試み、それらの細胞内で複製している HCV 遺伝子の解析や宿主遺伝子の発現レベルの cDNA マイクロアレイ解析を行い、RBV に感受性を示す親細胞との比較解析を行った。

## B. 研究方法

(1) Li23 由来で RBV に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製クローン化細胞株の樹立とその性状解析。

100  $\cdot$  M の RBV に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞 OL8(3.6Y)R (ポリクローナル) に RBV の濃度を 100  $\cdot$  M、150  $\cdot$  M、200  $\cdot$  M と 10 日ごとに上げながら培養を行い、さらに RBV に抵抗性を示す細胞のクローン化を試みた。

得られたクローン化細胞における RBV 抵抗性のレベルについては Western blot 法や定量的 RT-PCR 法により HCV タンパク質 (NS5B) や HCV RNA の量を測定することにより評価した。

RBV に感受性を示す OL8(3.6Y)細胞と RBV に抵抗性を示すクローン化細胞から調整した Total RNA を用いて、Affymetrix GeneChip (Human genome U133 Plus 2.0 array, 47000 遺伝子) による cDNA マイクロアレイ解析を行った。

(2) RBV に対する感受性が異なる全長 HCV RNA 複製細胞由来の HCV の遺伝子解析。

100  $\cdot$  M の RBV に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞として昨年度得られた OL8(3.6Y)R、OL11(3.6Y)R および OL14(3.4Y)R からそれぞれ Total RNA を調整した。これらの Total RNA を用いて HCV 特異的 primer により cDNA を作成して、PCR により HCV RNA 全体を増幅させた。PCR は HCV RNA の 5' 末端から NS2 領域までの 5.1 kb と NS3-NS5B 領域までの 6kb の 2 つに分け

て行った。cDNA の作成には Primscript (Takara) を用い、PCR には fidelity の高い KOD-plus DNA polymerase (Toyobo) を用いた。増幅した 5.1 kb と 6 kb の DNA 断片を pBR322MS ベクターにクローニングして、それぞれ独立的に得られた 7 クローンの塩基配列の決定を行った。並行して、RBV に感受性を示す親細胞である OL8(3.6Y)、OL11(3.6Y) および OL14(3.6Y) 細胞からも Total RNA を調整して同様に RT-PCR により HCV RNA 全体を増幅させ、それぞれ 7 クローンについて塩基配列を決定した。得られた塩基配列を相互に比較し、GENETYX-MAC プログラムを用いた Neighbor-joining 法による系統樹解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

## C. 研究結果

(1) Li23 由来で RBV に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製クローン化細胞株の樹立とその性状解析。

昨年度得られた OL8(3.6Y)R 細胞 (100  $\cdot$  M の RBV に抵抗性を示す) に RBV を再度添加して、10 日ごとに RBV の濃度を 150  $\cdot$  M、200  $\cdot$  M と上げたところ、多くの細胞が浮遊状態となったが、RBV に抵抗性を示す細胞コロニーが 10 数個得られた。OL11(3.6Y)R 細胞や OL14(3.4Y)R 細胞についても同様の実験を行ったが、細胞コロニーとなることはなく全体的に徐々に細胞が増えてくるような状態となった。そのため、これらの細胞については、細胞のクローン化は断念して、細胞コロニーの得られた OL8(3.6Y)R 細胞について、クローン化細胞株の樹立を試みた。その結果、12 種類のクローン化細胞株 (R200#1 から R200#12 と命名) を樹立することができた。これらの細胞株について、RBV (25  $\cdot$  M と 50  $\cdot$  M) で 72 時間処理して、HCV NS5B の発現レベルの変化を Western blot 法により調べた。その結果、R200#1、R200#8 および R200#11 の 3 種類のクローン化細胞では、RBV 処理 (72 時間) を行っても、NS5B の量がほとんど減

っていないことが分かり、他のクローン化細胞と比較すると、高度な RBV 抵抗性を示すことが分かった。次に、これらの3種類の細胞について、RBV 添加(72時間)による HCV RNA 量の変化を定量的に解析した。その結果、親細胞の OL8(3.6Y)における RBV の 50%有効濃度 (EC50)は  $31 \pm 3.2 \cdot M$  であったのに対して、R200#1、R200#8 および R200#11 ではそれぞれ  $89 \pm 9.0$ 、 $80 \pm 4.7$  および  $>100 \cdot M$  と高い EC50 値を示した。これらの結果から、今回得られたクローン化細胞は、タンパク質レベルでも、RNA レベルでも明らかに RBV に抵抗性を示すことが分かった。

これらの細胞内で複製している HCV RNA の塩基配列の解析も必要であるが、次項で述べる OL8(3.6Y)R 細胞由来の全長 HCV RNA の塩基配列の解析が済んでから調べることにし、まず、感受性細胞(OL8(3.6Y))と抵抗性細胞(R200#1、R200#8 および R200#11) 間で発現量が異なる宿主因子が得られるかどうかを cDNA Microarray により解析した。

RBV 感受性細胞と比較して RBV 抵抗性細胞で発現レベルが高い遺伝子については、発現レベルが4倍以上高く、かつ発現量が500以上になっている遺伝子を対象にして選択作業を行った。その結果、R200#1 など RBV 抵抗性細胞で共通して発現レベルが亢進している5遺伝子(RNA binding protein with multiple splicing 2、Phospholipase A2 VII、Fibrinogen alpha chain、SRY-box 6 および Interleukin 32)を同定した。最も、発現レベルが亢進していた RNA binding protein with multiple splicing 2 ではいずれの RBV 抵抗性細胞においても、10倍程度或はそれ以上の発現亢進が認められた。また、RBV 感受性細胞と比較して RBV 抵抗性細胞で発現レベルが低い遺伝子については、OL8(3.6Y)細胞で発現量が500以上のものが R200#1 などの RBV 抵抗性細胞で 1/4 以下に低くなっている遺伝子を対象にして選択作業を行った。その結果、R200#1 など RBV 抵抗性細胞で共通して発現レベルが低下している6遺伝子(protein kinase D1、Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2、SRY-box 4、C-terminal binding protein 2、Thioredoxin interacting protein および CD70 molecule)を同定した。最も発現レベルが低下していた protein kinase D1 では、

いずれの RBV 抵抗性細胞においても、1/20 以下或はそれ以下の発現低下が認められた。

(2)RBV に対する感受性が異なる全長 HCV RNA 複製細胞由来の HCV の遺伝子解析。

本年度は、昨年度 RBV 抵抗性を示すポリクローナル細胞として得られた OL8(3.6)R、OL11(3.6Y)R および OL14(3.4Y)R から RT-PCR 法により細胞内に存在する全長 HCV RNA(前半 5 kb と後半 6 kb)を増幅して、pBR322MC vector に subcloning した。それぞれ独立的に得られた7 clone について塩基配列を決定した。比較対象として、細胞継代を3.6年あるいは3.4年続けた細胞 OL8(3.6Y)、OL11(3.6Y)および OL14(3.4Y)についても、同様に7クローンずつ全長 HCV RNA の塩基配列を決定した。OL8、OL11 および OL14 細胞の系列で RBV 感受性細胞と抵抗性細胞間における HCV RNA の塩基配列を比較した。

OL8(3.6Y)と OL8(3.6Y)R との比較を行った結果、解析した7 clone すべてで変化したアミノ酸があることが分かった。コア領域に3アミノ酸(F24L、C172R、S175P)、E2領域に1アミノ酸(R460C)、NS3領域に1アミノ酸(I1461M)、NS5A領域に2アミノ酸(V2244AとT2351A)認められた(F24Lとは24番目のアミノ酸がFからLに変化したことを示す)。しかしながら、OL11(3.6Y)と OL11(3.6Y)R や OL14(3.4Y)と OL14(3.4Y)R との比較においては、解析した7 clone すべてで変化したアミノ酸はなかった。従って、OL8、OL11 および OL14 細胞系列で RBV 感受性の変化に伴い、共通してアミノ酸が変化する HCV タンパク質はないことが分かった。

決定した HCV RNA の塩基配列の情報から Neighbor-joining 法により系統樹を作成してそれぞれの HCV RNA の類似性を解析したところ、OL8(3.6Y)R から得られた7 clone はかなりの均一性を示し、OL8(3.6Y)集団の中の限られた分子種であることが分かった。それとは対照的に、OL11(3.6Y)R から得られた7 clone は OL11(3.6Y)から得られた7 clone と系統樹の中では混在する位置関係となったことから、HCV RNA としてはほとんど selection がかかっていないことが分かった。OL14(3.4Y)R については、OL8 と OL11 細胞系列の結果の中間のような系統樹の中での位置関係が得られた。OL14(3.4Y)R 由来の HCV RNA はある程度のクラスター

を形成するものの、そのクラスター内には OL14(3.4Y)由来の HCV RNA も一部存在するような形になっていた。

#### D. 考察

(1) Li23 由来で RBV に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製クローン化細胞株の樹立とその性状解析。

今年度、OL8(3.6Y)R 細胞から RBV 抵抗性を示す細胞をクローン化することが出来たことから、抵抗性がウイルス RNA のどこが変化したためなのか、或はどの宿主遺伝子の発現レベルが変化したためなのかを詳細に検討できるモデル細胞系を得ることができた。cDNA マイクロアレイ解析では、発現レベルが大きく異なる宿主遺伝子が存在することが分かったため、今後、それぞれの遺伝子を発現させたり、抑制させたりして、RBV に対する感受性の変化に関与する遺伝子を同定する作業を行う予定である。このような遺伝子が同定されると、RBV に対する抵抗性獲得機構や RBV の抗 HCV 活性の分子機序の詳細が解明されるのではないかと期待される。

(2) RBV に対する感受性が異なる全長 HCV RNA 複製細胞由来の HCV の遺伝子解析。

今回の HCV 遺伝子の解析結果により、OL8 細胞系列では顕著なアミノ酸の変化や系統樹解析によるクラスター形成が認められたため、RBV 感受性の変化に伴う HCV RNA の選択或は細胞の選択が進んだことが示されたと思われる。アミノ酸変化で得られた V2244A と T2351A は PEG-IFN と RBV による治療の感受性を規定している領域として知られている ISDR (2209-2248) と IRRDR (2334-2379) 内に位置していることは興味深い。ISDR や IRRDR がどのような分子機序により治療効果に関与しているかは分かっていないので、今後の研究によりこれらのアミノ酸変化と RBV 感受性の変化の関係が明らかになった場合には、ISDR や IRRDR が存在する意味も理解できる可能性がある。現在、OL8(3.6Y)R に対して、さらに RBV 処理を行い、クローン化した細胞株 (R200#1, R200#8 および R200#11) 由来の HCV RNA の塩基配列を解析しているため、さらにアミノ酸変化と RBV 抵抗性との関係を理解する上で必要な情報が得られるのではないかと考えられる。ただ、今回の遺伝子解析では、RBV 抵抗性を示した OL11(3.6Y)R や OL14(3.4Y)R では、OL8(3.6Y)R で認められたような顕

著なアミノ酸変化がほとんど認められなかったため、一概に HCV RNA の変異により RBV 感受性が規定されているとも考えにくく、宿主因子の変化と連動している可能性もある。この可能性については、前項のマイクロアレイ解析で得られた宿主遺伝子についての機能解析 (RBV 感受性に関わるか否かについて) により、ある程度分かってくるのではないかと期待される。

#### E. 結論

今年度の成果は以下のとおりである。(1) RBV に感受性を示す Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞 (3.5 年以上継代培養) から RBV に抵抗性を示すクローン化細胞株 (3 株) を樹立した。(2) RBV に感受性を示す親細胞と今回得られた RBV 抵抗性細胞を用いた cDNA マイクロアレイ解析により、RBV 抵抗性細胞で発現量が高い 5 遺伝子と逆に発現量が低い 6 遺伝子を同定した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes* 44:374-381 (2012).
- 2) Sejima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 167:74-85 (2012).
- 3) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, and Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.* 93:1422-1431 (2012).
- 4) Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. *FEBS Open Bio*, 2:279-283 (2012).
- 5) Marozin S, Altomonte J, Apfel S, Dinh P, Toni ED, Rizzani A, Nüssler A, Kato N, Schmid R, Pattnaik A,



- Ebert, O. Post-translational modification of VSV glycoprotein, but not JNK inhibition, is the antiviral mechanism of SP600125. *J. Virol.* 86:4844-4855 (2012).
- 6) Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M, Kato N, Tsubota A, Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56:1407-1413 (2012).
- 7) Yamashita A, Salam KA, 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, Tsuneda 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*. *Mar. Drugs* 10: 744-761(2012).
- 8) Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H, Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Ikeda M, Kato N, Isomoto H, Takeshima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J. Gastroenterol.*, 47:195-202 (2012).
- 9) 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 *Amphimedon* sp. *PLoS One*, 7:e48685 (2012).
- 10) Koike K, Takaki A, Kato N, Ouchida M, Kanzaki H, Yasunak T, Shiraha H, Miyake Y, Yamamoto K. Eradication of hepatitis C virus subgenomic replicon by interferon results in aberrant retinol related protein expression. *Acta Med. Okayama*, 66:461-468 (2012).
- 11) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430:592-597 (2013).
2. 学会発表
- 1) 森 京子、本多 政夫、池田 正徳、團迫 浩方、金子 周一、加藤 宣之。  
抗 HCV 薬リバビリンに対する感受性を決定する宿主因子の多面的解析. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月。
- 2) Mori K, Honda M, Ikeda M, Dansako H, Kaneko S, Kato N. Multidirectional analysis for a host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October, 2012.
- 3) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之。  
リバビリンに対する感受性を決定する宿主因子の同定とその因子の病態進行への関与について. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012 年 11 月。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

HCV 遺伝子変異による治療抵抗性機構の解析に関する研究

分担研究者：横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学教授

研究要旨

HCV NS5A による肝細胞アポトーシス抵抗性およびプロテアーゼ阻害剤未使用 C 型慢性肝炎患者におけるウイルス遺伝子変異の検討を行なった。HCV NS5A はプロテオソーム阻害剤 MG132 および ER ストレス誘導剤 Thapsigargin (TG) によるアポトーシスを抑制したが、今回の検討では ISDR のアミノ酸変異数による違いはみられなかった。C 型慢性肝炎患者(セログループ 1)の HCV NS5B 領域の Ultra Deep Sequence の解析を行なったところ、Genotype 決定領域に塩基置換が見つかった。UltraDeep Sequence の解析をすることにより、Sanger 法による直接塩基配列決定では得られない塩基変異が得られた。今後更なる検討が必要であると考えられた。

〈研究協力者〉

神田達郎（同，講師）

中本晋吾(同分子ウイルス学，助教)

A. 研究目的

アポトーシスはウイルス増殖や肝発癌に深く関与していることが報告されている。HCV NS5A ISDR 塩基変異が各種刺激による肝細胞アポトーシス抵抗性を与える影響を検討した。プロテアーゼ阻害剤未使用 C 型慢性肝炎患者におけるウイルス遺伝子変異の検討を次世代シーケンサーにより検討した。

B. 研究方法

(1) 各種アポトーシス刺激[Thapsigargin(TG), H2O2, MG132, TNF, CDDP, Sorafenib] による HepG2-control および HepG2-HCVNS5A における細胞死の検討をおこなった。(2) HCV NS5A ISDR に wild type-ISDR, intermediate type-ISDR, mutant type-ISDR をもつ HCV NS5A 発現ベクターを作成し ISDR 変異のアポトーシス抵抗性に対する影響を比較検討した。

(3) Roche 454 GS Junior Sequencer により HCV NS5B 領域の HCV Genotyping 決定領域における Ultra Deep Sequence の検討を行なった。

(4) Sanger 法による直接塩基配列決定法から得られた塩基配列と Ultra Deep Sequence を比較検討した。

（倫理面への配慮）千葉大学では少数民族を含む人権に十分配慮をおこなっている。臨床検体は千葉大学医学部倫理委員会の承諾を得た上で取り扱った。遺伝子 SNP に関しては同生命倫理委員会の承諾を得た上で解析した。

C. 研究結果

(1)HCV NS5A はプロテオソーム阻害剤 MG132 および ER ストレス誘導剤 Thapsigargin (TG) によるアポトーシスを抑制したが、ISDR のアミノ酸変異数による違いはみられなかった。

(2)HCV NS3/4A 領域の Sequence-specific primer および HCV NS5B 領域の MGB probe を用いて C 型慢性肝炎患者(セログループ 1)における HCV ジェノタイプを決定し、判定困難例について Ultra Deep Sequence も解析したところ、HCV NS5B MGB probe 領域に塩基置換が見つかった。Sanger 法と比べ、

次世代シーケンス法で9症例にみられた塩基置換は、1%以下、99/292 (34%); 1%以上 5%未満、84/292 (29%); 5%以上 10%未満、34/292 (12%); 10%以上、75/292 (26%)であった。

#### D. 考察

我々はHCV NS5AによるLPS刺激による肝細胞アポトーシスの阻害を報告してきた。今回は各種アポトーシス刺激に対するHCV NS5Aによる肝細胞アポトーシス抵抗性を検討した。HCV NS5Aにより、MG132およびTGによる肝アポトーシスに対する抵抗性が観察された。今回の検討ではHCV NS5A ISDRの変異の違いによるアポトーシス抵抗性の差異は観察されなかった。今後更に細胞培養系を用いてHCV NS5Aの機能解析、特にHCV NS5A ISDRの機能解析を進めたいと考えている。

HCV NS3/4A領域のSequence-specific primerおよびHCV NS5B領域のMGB probeを用いてC型慢性肝炎患者(セログループ1)におけるHCV ジェノタイプを決定し、判定困難例についてUltra Deep Sequenceも解析したところ、HCV NS5B MGB probe領域に塩基置換が見つかった。Ultra Deep Sequenceの解析をすることにより、Sanger法による直接塩基配列決定では得られない塩基変異が得られた。その意義については今後の検討課題である。

#### E. 結論

HCV NS5Aによる肝細胞アポトーシス抵抗性およびプロテアーゼ阻害剤未使用C型慢性肝炎患者におけるウイルス遺伝子変異の検討を行なった。今後更なる検討が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kanda T, Nakamoto S, Nishino T, Takada N, Tsubota A, Kato K, Miyamura T, Maruoka D, Wu S,

Tanaka T, Arai M, Mikami S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 2 who failed previous interferon therapy. *Int J Med Sci.* 2013;10(1):43-9.

2) Kanda T, Wu S, Kiyohara T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Imazeki F, Ishii K, Wakita T, Yokosuka O. Interleukin-29 suppresses hepatitis A and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunol.* 2012 Oct;25(5):379-86.

3) Miyamura T, Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Jiang X, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Roles of ITPA and IL28B Genotypes in Chronic Hepatitis C Patients Treated with Peginterferon Plus Ribavirin. *Viruses.* 2012 Aug;4(8):1264-78.

4) Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Roger T, Shirasawa H, Nomura F, Yokosuka O. Hepatitis B virus e antigen physically associates with receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 and regulates IL-6 gene expression. *J Infect Dis.* 2012 Aug 1;206(3):415-20.

5) Yan J, Kanda T, Wu S, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatitis A, B, C and E virus markers in Chinese residing in Tokyo, Japan. *Hepato Res.* 2012; 42(10):974-81.

6) Arai M, Togo S, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Quantification of hepatitis B surface antigen can help predict spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Apr;24(4):414-8.

7) Maroka D, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Fujiwara K, Yokosuka O. Longitudinal changes of the laboratory data of chronic hepatitis C patients with sustained virological response on long-term follow-up. *J Viral Hepat.* 2012; 19(2):e97-e104.

8) Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Goto N, Imazeki F, Yokosuka O. Efficacy of lamivudine or Entecavir on acute exacerbation of chronic hepatitis B. Int J Med Sci. 2012;9(1):27-32.

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamashita A, Salam KA, 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, Tsuneda 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 <i>Alloeocomatella polycladia</i> .	Mar Drugs.	10	744-6	2012
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 <i>Amphimedon</i> sp.	PLoS One.	7	e48685	2012
Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Tani H, Tanaka J, Akimitsu N.	Inhibition of hepatitis C virus NS3 helicase by manoalide.	J Nat Prod.	75	650-4.	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, <u>Yamashita A</u> , Moriishi K, Enomoto N.	Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.	Hepato Res.	in press		2013
Shindo H, Maekawa S, Kamatsu N, Kamase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoe T, Sakamoto N, <u>Yamashita A</u> , Moriishi K, Enomoto N.	IL-28B and IFN-alpha synergistically inhibit HCV replication.	J Viral Hepatitis.	in press		2013
Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, <u>Yamashita A</u> , Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Tani H, Tanaka J, Akimitsu N.	Psammalin A inhibits hepatitis C virus NS3 helicase.	J Nat Med.	in press		2013
Furuta A, Salam KA, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, <u>Yamashita A</u> , Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N.	Cholesterol sulfate as a potential inhibitor of hepatitis C virus NS3 helicase.	J Enzyme Inhib Med Chem.	in press		2013

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

## 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
朝比奈靖浩	肝疾患	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	株式会社宇宙堂八木書店	東京	2012	272-278
朝比奈靖浩	C型肝炎ウイルスマーカー	細川 直登	感度と特異度からひもとく感染症診療のDecision Making	文光堂	東京	2012	242-247
朝比奈靖浩	C型肝炎の経過と予後	熊田 博光	肝炎ウイルスーB型・C型	医薬ジャーナル	大阪	2012	70-75
朝比奈靖浩	肝発癌抑制を目指したインターフェロン療法	芥田 憲夫 斉藤 聡 角田 圭雄	最新！C型肝炎の使いかた	診断と治療社	東京	2012	43-45
朝比奈靖浩	4. ウイルス学的検査 A. A型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	34
朝比奈靖浩	4. ウイルス学的検査 B. B型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	35-40
朝比奈靖浩	4. ウイルス学的検査 C. C型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	40-43
朝比奈靖浩	4. ウイルス学的検査 D. D型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	43-44



朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的検査 E.E 型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールドデンハ ンドブック 改訂第 2 版	南江堂	東京	2012	44
朝比奈 靖浩	6. C 型慢性肝炎	泉 並木	肝臓病診療 ゴールドデンハ ンドブック 改訂第 2 版	南江堂	東京	2012	95-101
朝比奈 靖浩	A-2. C 型慢性肝炎	泉 並木	肝臓病診療 ゴールドデンハ ンドブック 改訂第 2 版	南江堂	東京	2012	189-219

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
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	Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I-interferon-dependent innate immunity.	Hepatology	57(1)	46-58	2013
Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Watanabe H	editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection.	Hepatology Research	43	1-34	2013
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 interleukin 28B with antiviral response.	Hepatology	55	20- 29	2012

Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A,	Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells.	Hepatology	in press		2012
Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Morikawa H, Adachi K, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsuhashi H	Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN $\alpha$ 2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multi-center cooperative study.	J Gastroenterol.	Epub ahead of print		2012
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, Ttoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino	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, 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	No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations.	BMC Med Genet	13	47	2012

Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N	Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis CN.	J Viral Hepat	20(1)	72-76	2012
Toyoda J, Ozeki I, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H	Virologic response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b.	J Viral Hepat	20(3)	167-173	2012
朝比奈靖浩、泉並木、桶谷 眞、熊田博光、小池和彦、鈴木文孝、滝川 一、田中 篤、坪内博仁、林 紀夫、平松直樹、四柳 宏（日本肝臓学会肝炎ガイドライン作成委員会）	C型肝炎治療ガイドライン（第1版）	肝臓	53(6)	355-395	2012

研究成果の刊行に関する一覧表

<p><b><u>Kurosaki M,</u></b> Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsuhashi H Izumi N.</p>	<p>Age and total ribavirin dose is an independent predictor of relapse among early virological responders to peg-interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis.</p>	<p>Antiviral Therapy</p>	<p>17(1)</p>	<p>35-43</p>	<p>2012</p>
<p><b><u>Kurosaki M,</u></b> Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N.</p>	<p>A model incorporating the <i>ITPA</i> genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C.</p>	<p>J Med Virol</p>	<p>85(3)</p>	<p>449-58 (in press)</p>	<p>2013</p>