

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
次世代シーケンス技術を駆使したウイルスゲノム解析による
C 型肝炎の病態解明と臨床応用

HCV ゲノム変異解析プラットフォームの開発

分担研究者:丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科

研究要旨: C 型慢性肝炎では多様なウイルスクローンの集合体として HCV 感染が成立しており、病態形成や治療効果に深く関与していることが知られている。本研究課題では、次世代シーケンサーを用いた大規模ウイルスクローン解析により、C 型慢性肝疾患症例において、HCV の構造領域の蛋白質(core, envelope 領域)を欠損したウイルスクローン(欠損型クローン)が完全長ウイルスクローンと高頻度に併存感染しており、肝組織への HCV の新規感染時には完全長ウイルスクローンが複製増殖するのに対し、慢性期では欠損型クローンが感染ウイルスの中心となっていることを明らかにした。以上の研究成果から、欠損型クローンが肝疾患の病態の進展や抗 HCV 治療への感受性に果たす役割を解明することの重要性が示唆された。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)のウイルスゲノム配列には、非常に高頻度な塩基変化が生じていることが知られている。事実、HCV 感染者では、単一の宿主内においても互いに類似の配列を有する多数の変異クローンの集合体としてウイルス感染が成立しており、このような性質は quasispecies nature と総称されている。この、quasispecies を構成する多彩な変異ウイルスが、HCV 感染時の病態形成や抗ウイルス治療への感受性・抵抗性と深く関連することが知られている。

我々のこれまでの研究成果から、約 1/3~1/2 の C 型慢性肝疾患症例では、構造領域から非構造領域までのすべてのウイルス蛋白質を有する完全長ウイルスのみの感染が成立しているのではなく、大部分の構造領域(core, envelope 領域)を欠損した非構造領域のみのウイルスゲノムをもつ欠損型クローンも併存感染していることが明らかとなった。In vitro の HCV 感染実験からは、この欠損型クローンは完全長 HCV と同時感染することにより、ウイルス粒子の形成過程で完全長ウイルスの産生した構造領域の蛋白質を共有し、ウイルス粒子内に packaging されていることが示されている。

すなわち、C 型慢性肝疾患症例において完全長ウイルスとともに欠損型クローンの同時感染を有する症例では、肝細胞における HCV の複製・増殖・ウイルス粒子形成と血中への放出というすべてのウイルスのライフサイクルに、欠損型ウイルスが関与しているものと考えられる。興味深いことに、ペグインターフェロンとリバビリンの併用療法に際して、欠損型ウイルスクローンを有する症例では、完全長ウイルスのみの感染病態となっている症例と比較すると、治療後の血中 HCV RNA の低下速度が遅く、最終的な治療への反応性も乏しい例が多いことが確認されている。これは、欠損型ウイルスクローンの存在が、抗ウイルス療法への反応性を規定するウイルス側の因子としての重要な役割を果たしている可能性があることを示唆している。

そこで、本研究課題では、次世代シーケンサーを用いた大規模ウイルスゲノム解析法を活用し、構造領域のウイルスゲノムを欠損した HCV クローンの肝細胞への感染動態を詳細に検討することを目的とし、生体肝移植を実施した C 型慢性肝疾患症例の肝移植前後の血中ならびに肝組織中に検出される HCV クローンの包括的なゲノム解析を行った。

B. 研究方法

1. 対象;

2006年5月から2008年9月の間に、非代償性C型肝炎に対して生体肝移植術が行われた genotype 1b HCV 陽性日本人成人レシピエント 5例の感染 HCV を検討対象とした。

血清検体は、5例それぞれ肝植前及び移植後1ヶ月、またさらに1例のみ肝移植後22ヶ月の計11検体の血清サンプルの検討を行った。同時に、手術時に採取された4例の肝組織も解析対象とし、計15検体の検体からRNAを抽出し、次世代シーケンスを行った。

2. 方法;

各症例の移植前血清を用い、HCV 全長の RT-PCR (primer は 5' 非翻訳領域と 3' 非翻訳領域に設定) を行った後、5' 側ウイルスゲノムの前半部分 (~5,000bp: primer は 5' 非翻訳領域と NS3 に設定) と 3' 側ウイルスゲノム後半部分 (~4,500bp: primer は NS3 と 3' 非翻訳領域に設定) に分けそれぞれ、ウイルス配列を増幅した。その後、電気泳動後の gel extraction により PCR 産物を精製し、Direct Sequence を行い決定された代表塩基配列を、各検体の次世代シーケンサー解析時のリファレンス配列として決定した。

また、欠損型 HCV クローンの塩基配列を同定するために、以下の2種類の primer を作成し、特異的な RT-PCR 増幅を行った。5' -CGCCGACCTCATGGGGTACA-3' (Core) and 5' -TGGTGTACATTTGGGTGATT-3' (NS3) for first RT-PCR (HCV-P1: 2919 bp)、5' -TGCTCTTTCTCTATCTTCCT-3' (Core) and 5' -GTGATGATGCAACCAAGTAG-3' (NS3) for the second PCR (HCV-P2: 2618 bp)。

得られた amplicon を電気泳動し、gel extraction kit により PCR 産物を精製、Direct Sequence を行い、決定された代表塩基配列をリファレンス配列と比較し、欠損型 HCV クローンの欠失領域の前後の配列を同定した。

遺伝子異常の解析には、最新の大量並列シーケンス・テクノロジーを活用した次世代

シーケンサー (Life Technology 社 Ion Proton) を platform とした。この deep sequencing の特性を最大限に活用することにより、1回のランあたりリード数は約 8,000 万、総解析塩基数は平均 5-10 Gb の遺伝子配列の決定と遺伝子発現プロファイル解析が可能となり、従来の方法では得ることができなかった飛躍的な遺伝子情報量を解析することが実現した。これらのゲノム解析基盤を用いて、以下の検討を行った。遺伝子多様性の統計学的解析は、Shannon entropy index を用いて行った。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者等からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるように十分に配慮した。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子に関する倫理指針」(平成 17 年 6 月 29 日一部改正) 及び「疫学研究に関する倫理指針」(平成 19 年 8 月 16 日全部改正) 並びに「臨床研究に関する倫理指針」(平成 20 年 7 月 31 日全部改正) に準拠し、当該所属機関の研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。その際、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料や個人情報を適正に管理保存した。

組換え DNA 実験を含む遺伝子組換え生物等の第二種使用等については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)、「同施行規則」(平成 15 年財務省・文部科学省・厚生労働省・農林水産省・経済産業省・環境省令第一号)、「研究開発等に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき核酸防止措置などを定める省令」(平成 16 年文部科学省・環境省令第一号)、その他の関係法令及び当該所属機関の遺伝子組換え生物等第二種使用等安全管理規則に準じた。

C. 研究結果

非代償性 C 型肝炎に対する生体肝移植術前と肝移植後 1 ヶ月の HCV RNA の中央値は、それぞれ 5.5 log IU/ml (4.6~6.6 log

IU/ml)と 5.9 log IU/ml (5.8~6.4 log IU/ml)で、有意差は無かった。これらの臨床検体を対象とした HCV ゲノム特異的な deep sequencing を実施したところ、平均 coverage は 1,548-fold であった。

Shannon entropy により表される全体のウイルス多様性、その分布パターンは、同一症例の肝及び血清検体間で類似していた。また、既知のインターフェロン感受性関連コア変異領域やプロテアーゼ・ポリメラーゼ阻害薬に対する耐性変異領域での変異の存在頻度は、同一症例の肝組織と血清で類似していた。肝移植前と移植後 1 ヶ月の血清間での比較では、平均 coverage がそれぞれ 1,284-fold、1,141-fold であり、HCV 多様性は移植前後で大きく異なっていた。また、平均 Shannon entropy はそれぞれ 0.056、0.029 (P=0.043) であり、高度な HCV 多様性を示した肝移植前と比較し、肝移植 1 ヶ月後には血清中の HCV 多様性は有意に減少していることから、グラフト肝への HCV 再感染早期に特定の HCV クローンが選択的に再感染・増殖していることが示唆された。肝移植後の HCV 多様性の減少傾向は全領域を通じて認められたが、特に NS4A, NS4B, NS5A, NS5B 領域において顕著であった。しかしながら、5 例に共通する特定の塩基配列との関連性は認められなかった。

次世代シーケンサー解析における HCV 各領域の coverage (各塩基が読まれた回数) を比較したところ、肝移植前の肝組織及び血清中 HCV 検体において、HCV の構造領域 (core から NS2 の中間にかけて) の遺伝子配列に局限した coverage の減少を認めた。この構造領域の coverage の減少は、移植後 1 ヶ月の検体においては認められず、肝移植前特異的な構造領域欠損型 HCV の存在が推測された。また、全長型 HCV と欠損型 HCV の両者を検出するプライマーを用いた RT-PCR 法による解析の結果、5 例中 4 例において、移植前血清中に欠損型 HCV が全長型 HCV と共に検出された。欠損型 HCV の遺伝子配列解析の結果、いずれの症例においても E1 領域から NS2 領域までの遺伝子欠損を認めたが、欠損領域の 5' 側並びに 3' 側の

境界は各症例で異なっていた。検出された欠損型 HCV は全てインフレーム欠失であり、残存領域がフレームシフトすることなく翻訳され、機能的な HCV タンパク質が産生されると推定された。興味深いことに、肝移植 1 ヶ月後の血清においては欠損型 HCV は検出されず、全長型 HCV のみが検出された。この結果より、肝移植直後には全長型 HCV が選択的にグラフト肝組織内で増殖しており、欠損型 HCV は全長型 HCV と比較して新規感染の成立時には増殖能力が低いことが示唆された。さらに、1 例においては、移植 22 ヶ月後に移植前と同一の欠損型 HCV の再増殖が確認された。移植後慢性肝炎の段階で HCV の多様性が再増加して再構築されることも確認され (Shannon entropy; 移植前 0.056, 移植後 1 ヶ月 0.022, 移植後 22 ヶ月 0.069)、この過程で肝移植前と同一の欠損型 HCV が再増殖することが明らかとなった。

D. 考察

次世代シーケンサー解析を駆使することにより、C 型慢性肝炎症例の血清ならびに肝組織中には、欠損型 HCV の感染病態がダイナミックに変動していることが明らかとなった。我々の以前の検討結果からは、この欠損型 HCV の共感染の有無により、インターフェロン治療への反応性が異なっていることが示唆されている。すなわち、欠損型 HCV が完全長ウイルスとともに併存するかどうか、抗ウイルス療法の治療効果に関与している可能性が想定された。今後、インターフェロンとともに経口抗 HCV 薬を加えた治療戦略の中で、欠損型 HCV の果たす役割の解明が必要であるものと考えられる。

E. 結論

次世代シーケンサー解析を駆使することにより、C 型慢性肝炎症例の血清ならびに肝組織中には、完全長ウイルスとともに欠損型 HCV が共感染している症例が多数あり、急性感染時と慢性感染時での完全長ウイルスと欠損型 HCV の感染病態がダイナミックに変動していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Ikeda A, Shimizu T, Matsumoto Y, Fujii Y, Eso Y, Inuzuka T, Mizuguchi A, Shimizu K, Hatano E, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Leptin Receptor Somatic Mutations are frequent in HCV-infected Cirrhotic Liver and associated with Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2014.146(1):222-232.

2) Ohtsuru S, Ueda Y, Marusawa H, Inuzuka T, Nishijima N, Nasu A, Shimizu K, Koike K, Uemoto S, Chiba T: Dynamics of defective hepatitis C virus clones in reinfected liver grafts in liver transplant recipients; ultra-deep sequencing analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013. 51:3645-3652.

3) Ueda Y, Kaido T, Ito T, Ogawa K, Yoshizawa A, Fujimoto Y, Mori A, Miyagawa-Hayashino A, Hga H, Marusawa H, Chiba T, Uemoto S: Chronic rejection associated with antiviral therapy for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2014(in press)

4) Ueda Y, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Miyagawa-Hyashino A, Haga H, Marusawa H, Teramukai S, Chiba T: Pretransplant serum hepatitis C virus RNA levels predict response to antiviral treatment after living donor liver transplantation. *PLoS One* .2013.8:e58380.

5) Kim SK, Nasu A, Komori J, Shimizu T, Matsumoto Y, Minaki Y, Kohno K, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: A model of liver carcinogenesis originating from hepatic progenitor cells with accumulation of genetic alterations. *Int J Cancer*.2014.134(5):1067-76.

6) Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, Chiba T, Uemoto S: Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation. *Hepatol Res*.2013.43: 67-71.

2. 学会発表

(1) 丸澤宏之. 慢性炎症によるゲノム異常生成と肝発癌. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 2013.

(2) 千葉勉、丸澤宏之. 炎症と遺伝子不安定性. 第72回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜 2013.

(3) 金秀基、丸澤宏之. 肝幹/前駆細胞を起源とする肝発癌モデルを用いたゲノム異常の網羅的解析. 第17回日本肝臓学会大会. 品川プリンスホテル 2013.

H. 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

なし

次世代シーケンサーによる DAA 耐性ウイルスの検討

分担研究者:今村 道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 助教

研究要旨: Daclatasvir (DCV、NS5A 阻害剤)/PEG-IFN/RBV 療法および DCV + asunaprevir (ASV、プロテアーゼ阻害剤)を施行した DAA 未治療の C 型肝炎患者において治療前の耐性変異の存在を次世代シーケンサーにて解析し、治療効果との関連を検討した。DCV + PEG-IFN/RBV 7 例中 4 例(57%)で治療前に Y93H 変異が検出されたが、これら 4 例を含む 5 例において SVR が得られた。一方、前治療 null responder の 2 例では、治療前に耐性変異が検出されなかったにも関わらず、治療中 L31+Y93 変異が出現し breakthrough を生じた。DCV+ASV 併用療法 10 例中 3 例で NS5A Y93H、3 例で L31V/M/S+Y93H が治療前に検出された。全例で血中 HCV RNA は陰性化し、治療前に L31V+Y93H が検出された 1 例を含めた 8 例において SVR が得られた。一方、治療前に L31+Y93 変異が検出された 2 例において治療後再燃および治療中 breakthrough が生じた。治療前わずかな耐性変異を有していても DCV+PEG-IFN/RBV 療法によって多くの症例で SVR が得られるが、PEG-IFN/RBV 抵抗性の症例(前治療 null responder)では、耐性変異が出現する危険性が高いことが示された。また DCV+ASV 併用療法では、NS5A aa31 および aa93 のいずれにも耐性変異を有している症例は、SVR failure となる可能性が高くなるものの、SVR が得られる症例も存在していた。

A. 研究目的

DAA 未治療の C 型肝炎患者においてプロテアーゼ阻害剤および NS5A 阻害剤に対する耐性変異の存在と NS5A 阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤を用いた抗ウイルス療法の治療効果との関係を検討した。

B. 研究方法

DAA 未治療の genotype 1b 型 C 型肝炎慢性肝炎患者に対し Daclatasvir (DCV) (NS5A 阻害剤:10 または 60mg/日内服)+PEG-IFN/RBV 併用療法 24 週間を行った 7 例、および DCV (60mg/日内服)+asunaprevir (ASV) (プロテアーゼ阻害剤、400 または 1,200 mg/日内服)併用療法を行った 10 例を解析対象とした。治療前の HCV NS3 領域(aa155、156、168)および NS5A 領域(aa31、93)のアミノ酸配列を次世代シーケンサー(Illumina Genome Analyzer II)を用いた deep sequence にて解析し、治療効果との関連を検討した。平均 929,061

reads/症例(NS3)および 1,239,491 reads/症例(NS5A)を解析し、HCV plasmid を用いた検討から 0.2%以上検出されたものを有意なアミノ酸変異とした。

C. 研究結果

DCV+PEG-IFN/RBV 併用療法 7 例のうち、治療前、NS5A aa31 には耐性変異は 1 例も検出されなかったが Y93H 変異が 4 例(57%)に検出された。これら 4 例を含む 5 例(全例初回治療あるいは前治療 partial responder)において開始 4 週後に血中 HCV RNA は陰性化し SVR が得られた。一方、前治療 null responder の 2 例では、治療前に aa31 および aa93 に変異が検出されなかったにも関わらず、治療中 L31I/M+Y93H または L31V/I/M+Y93H 変異が出現し breakthrough を生じた。

DCV+ASV 併用療法 10 例のうち、治療前、NS3 aa168 には耐性変異は 1 例も検出されなかったが R155L (0.2%) が 1 例、A156V

(0.3%)が1例に検出され、NS5A Y93H (0.2-71.4%)が3例、L31V/M/S(0.2-1.0%) +Y93H(0.2-99.5%)が3例で検出された。全例で血中 HCV RNA は陰性化し、治療前に L31V(1.0%) +Y93H(99.5%)が検出された1例を含めた8例(80%)においてSVRが得られた。一方、治療前に L31M(0.7%) +Y93H (32.3%)が検出された1例において治療後、NS3 R155Q/L + A156S + D168A + NS5A L31M+Y93HによるHCVの再燃、治療前に L31S(0.2%) +Y93H(99.4%)が検出された1例で治療中、NS3 D168V+NS5A L31M/V/I +/Y93Hによるbreakthroughを生じた。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた解析によりNS5A領域には治療前、NS5A阻害剤耐性変異を有する症例が多く存在していることが明らかとなった。例えわずかな耐性変異を有していてもDCV+PEG-IFN/RBV療法によって多くの症例で血中HCVの陰性化が得られるが、PEG-IFN/RBV抵抗性の症例(前治療 null responder)では、耐性変異が出現する危険性が高いことが示された。またDCV+ASV併用療法では、NS5A aa31およびaa93のいずれにも耐性変異を有している症例は、SVR failureとなる可能性が高くなるものの、SVRが得られる症例も存在していた。

E. 結論

次世代シーケンサーによる deep sequence は、DAA製剤に対する耐性変異株の存在、または治療による dynamics の解析に有用である。PEG-IFN/RBVを用いた治療では、治療前の耐性変異の存在よりもPEG-IFN/RBV感受性が治療効果に大きく関与していると思われる。一方、IFN非使用DAA併用療法では、治療前の耐性変異株の存在により治療効果を予測することは困難である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Murakami E, Imamura M, Hayes CN, Abe H, Hiraga N, Honda Y, Ono A, Kosaka K, Kawaoka T, Tsuge M, Aikata H, Takahashi S, Miki D, Ochi H, Matsui H, Kanai A, Inaba T, McPhee F, Chayama K. Ultra deep sequencing study of HCV genotype 1 in chronic hepatitis patients treated with daclatasvir, peg-interferon and ribavirin. Antimicrob Agents Chemother. 2014
- 2) Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, Takahashi S, Ochi H, Chayama K. A Translational Study of Resistance Emergence Using Sequential Direct-Acting Antiviral Agents for Hepatitis C Using Ultra-Deep Sequencing. Am J Gastroenterol 108:1464-72, 2013

2.学会発表

- 1) 今村道雄, 川上由育, 茶山一彰. C型肝炎に対するNS5A阻害剤を用いた治療と次世代シーケンサーを用いた耐性株の検討. 2013年6月6日. 第49回日本肝臓学会総会, 東京
- 2) 阿部弘美, C. Nelson Hayes, 平賀伸彦, 今村道雄, 柘植雅貴, 三木大樹, 高橋祥一, 越智秀典, 茶山一彰. ヒト肝細胞キメラマウスと次世代シーケンサーを用いた新規抗ウイルス薬に対するHCVゲノムの解析. 2013年6月6日. 第49回日本肝臓学会総会, 東京

H. 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

なし

次世代シーケンス技術を駆使したウイルスゲノム解析による

C型肝炎の病態解明と臨床応用

分担研究者:須田剛生 北海道大学大学院医学研究科・消化器内科分野

研究要旨: DAAs 耐性変異ウイルスの存在様式、治療への影響を DAAs 治療前後の患者血清、DAAs 耐性ウイルス長期安定培養系を用い、次世代シーケンサー、Molecular dynamics を駆使してその耐性機構を明らかにする。

A. 研究目的

DAAs 耐性変異ウイルスの存在様式、治療への影響は十分に明らかにされておらず、DAAs 治療前後の患者血清、DAAs 耐性ウイルス長期安定培養系を用い、次世代シーケンサー、Molecular dynamics を駆使してその耐性機構を明らかにする。

B. 研究方法

Molecular dynamics を用いた NS5A 阻害剤の作用部位、耐性機構を予測し独自に樹立した DAAs 耐性 HCV 培養系・患者血清を用い耐性機構の解析を行う。

(倫理面への配慮)

肝疾患患者からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。遺伝子組み換え実験においては「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(平成 15 年法律第 97 号)を遵守して実施する。

C. 研究結果

薬剤耐性 HCV 培養系を樹立した DAAs 治療前の DAAs 耐性ウイルスの存在様式を明らかにし、治療効果との関連性を評価した。

MD にて、NS5A と NS5A 阻害剤の結合予測候補部位を同定した

D. 考察

DAAs 治療前の DAAs 耐性ウイルスの存在様式を明らかにし、治療効果との関連性を評価した。薬剤耐性 HCV 培養系を樹立した。

E. 結論

次世代シーケンサーによる deep sequence は、DAA 製剤の対する耐性変異株の存在、または治療による dynamics の解析に有用である。PEG-IFN/RBV を用いた治療では、治療前の耐性変異の存在よりも PEG-IFN/RBV 感受性が治療効果に大きく関与していると思われる。一方、IFN 非使用 DAA 併用療法では、治療前の耐性変異株の存在により治療効果を予測することは困難である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor κ B/mitogen-activated protein

kinase. Carcinogenesis 2014 in press

2.学会発表

2013 5月 肝臓病学会総会 シンポジウム

2013 10月 JDDW シンポジウム

2013 11月 AASLD

H. 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

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
Maekawa S, Enomoto N.	Once-daily simeprevir in combination with pegylated-interferon and ribavirin: a new horizon in the era of direct-acting antiviral agent therapy for hepatitis C	J Gastroenterol	49	163-164	2014
Komatsu N, Motosugi U, Maekawa S, Shindo K, Sakamoto M, Sato M, Tatsumi A, Enomoto N, et al.	Hepatocellular carcinoma risk assessment using gadoxetic acid-enhanced hepatocyte phase magnetic resonance imaging.	Hepatol Res			2014
Ichikawa S, Ichikawa T, Motosugi U, Sano K, Morisaka H, Enomoto N, Matsuda M, et al.	Presence of a hypovascular hepatic nodule showing hypointensity on hepatocyte-phase image is a risk factor for hypervascular hepatocellular carcinoma	J Magn Reson Imaging	39	293-297	2014
Miura M, Maekawa S, Sato M, Komatsu N, Tatsumi A, Takano S, Amemiya F, Enomoto N, et al.	Deep Sequencing Analysis of Variants Resistant to the NS5A Inhibitor Daclatasvir in Patients with Genotype 1b Hepatitis C Virus Infection.	Hepatol Res			2014
Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Enomoto N, et al.	Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: Evaluation by near-infrared spectroscopy.	Hepatol Res	44	319-326	2014
Tsuchiya K, Asahina Y, Matsuda S, Muraoka M, Nakata T, Suzuki Y, Tamaki N, Enomoto N, et al.	Changes in plasma vascular endothelial growth factor at 8 weeks after sorafenib administration as predictors of survival for advanced hepatocellular carcinoma.	Cancer	120	229-237	2014

Miura M, Maekawa S, Takano S, Komatsu N, Tatsumi A, Asakawa Y, Shindo K, <u>Enomoto N</u> , et al.	Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression.	J Virol	87	12541-12551	2013
Morisaka H, Motosugi U, Ichikawa S, Sano K, Ichikawa T, <u>Enomoto N</u> .	Association of splenic MR elastographic findings with gastroesophageal varices in patients with chronic liver disease.	J Magn Reson Imaging			2013
Morisaka H, Motosugi U, Ichikawa T, Sano K, Ichikawa S, Araki T, <u>Enomoto N</u> .	MR-based measurements of portal vein flow and liver stiffness for predicting gastroesophageal varices.	Magn Reson Med Sci	12	77-86	2013
Saibara T, <u>Enomoto N</u> , Kaneko S, Chayama K, Sata M, Imawari M, Onishi S, et al.	Clinical efficacy of combination therapy with ME3738 and pegylated interferon-alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1.	Hepatol Res			2013
Shen H, Yamashita A, Nakakoshi M, Yokoe H, Sudo M, Kasai H, Tanaka T, <u>Enomoto N</u> , et al.	Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester derivatives on replication of hepatitis C virus.	PLoS One			2013
Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, <u>Enomoto N</u> , et al.	IL-28B (IFN-lambda3) and IFN-alpha synergistically inhibit HCV replication.	J Viral Hepat	20	281-289	2013

Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, <u>Enomoto N</u> , et al.	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		2012
---	---	----------	---	--	------

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
渡辺久剛、 斎藤貴史、 石橋正道、 新澤陽英、 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。	佐田通夫、 田中榮司、 田中英夫、 長尾由実子	「コホート研究 からみたウイル ス性肝炎の解 明」	メディカル レビュー	大阪	2013	130-139

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
Saito T, Sugimoto M, Igarashi K, Saito K, Shao L, Katsumi T, Tomita K, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Tomita M, <u>Ueno Y</u> , Soga T.	Dynamics of serum metabolites in patients with chronic hepatitis C receiving pegylated interferon plus ribavirin: A metabolomics analysis.	Metabolism	62 (11)	1577-1586	2013
Sato C, Saito T, Shao L, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Makino N, Fukao A, Kitanaka C, Kayama T, <u>Ueno Y</u> , Kawata S.	Impaired mitochondrial β -oxidation in patients with chronic hepatitis C: relation with viral load and insulin resistance.	BMC Gastroenterol	13	112-119	2013
Ishii R, Saito T, Shao L, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Makino N, Fukao A, Kitanaka C, Kayama T, <u>Ueno Y</u> , Kawata S.	Serum prolactin levels and prolactin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells in hepatitis C virus infection.	J Med Virol	85 (7)	119-1205	2013
奥本和夫、斎藤貴 史、勝見智大、富 田恭子、佐藤智佳 子、阿蘇里佳、西 瀬雄子、渡辺久剛 、 <u>上野義之</u>	アポ型ALTによりALTが 異常低値を示したC型慢 性肝炎に対して抗ウイル ス療法を行った一例	肝臓	54 (8)	543-547	2013
渡辺久剛、上野義 之。	B型肝炎の自然予後(無 治療住民検診での長期 予後	肝胆膵	66(3)	399-407	2013

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
鈴木文孝 熊田博光	B型慢性肝炎		消化器疾患最新の治療 2013-2014	南江堂	東京	2013	308-311

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
Suzuki Y, Ikeda K, <u>Suzuki F</u> , Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Wenhua Hu, Timothy Eley, McPhee F, Eric Hughes, Kumada H	Dual oral therapy with daclatasvir and asunaprevir for patients with HCV genotype 1b infection and limited treatment options	J Hepatol.	58	655-662	2013
Toyota J, Ozeki I, Karino Y, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, <u>Suzuki F</u> , Kumada H	Virological response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b	J Viral Hepat.	20	167-173	2013
Tadokoro K, Kobayashi M, <u>Suzuki</u> <u>F</u> , Tanaka C, Yamaguchi T, Nagano M, Egashira T, Kumada H	Comparative quantitative analysis of hepatitis C mutations at amino acids 70 and 91 in the core region by the Q-Invader assay	J Virol Methods.	189	221-227	2013
Arase Y, Kobayashi M, <u>Suzuki F</u> , Tanaka C, Yamaguchi T, Nagano M, Egashira T, Kumada H	Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies including hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C	Hepatology.	3	964-973	2013
Karino Y, Toyota J, Ikeda K, <u>Suzuki F</u> , Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Dennis Hernandez, Fei Yu, Fiona McPhee, Kumada H	Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir	J Hepatol.	58	646-654	2013

Hirakawa M, Ikeda K, Kobayashi M, Kawamura Y, Hosaka T, Sezaki H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Kumada H	Randomized controlled trial of a new procedure of radiofrequency ablation using an expandable needle hepatocellular carcinoma	Hepatol Res.	43	846-852	2013
Suzuki F, Suzuki Y, Sezaki H, Akuta N, Seko Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Mineta R, Watahiki S, Kobayashi M, Nakayasu Y, Tsuda H, Aoki K, Yamada I, Kumada H	Exploratory Study on telaprevir given every 8h at 500mg or 750mg with peginterferon-alpha-2b and rivavirin in hepatitis C patients	Hepatol Res.	43	691-701	2013
Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H	Long-term entecavir treatment reduces hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection	Hepatology.	58	98-107	2013
Akuta N, Suzuki F, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Emergence of Telaprevir-Resistant Variznts Detected by Ultra-Deep Sequencing After Triple Therapy in Patients Infected With HCV Genotype 1	J Med Virol.	85	1028-1036	2013
Kawamura Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Fukushima T, Hara T, Seko Y, Hosaka T, Kobayashi M, Sezaki H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Fukuzawa K, Hamada Y, Takahashi J, Kobayashi M, Kumada H	Three-dimensional magnetic resonance imaging for stringent diagnosis of advanced fibrosis associated with nonalcoholic steatohepatitis	Hepatol Int.	7	850-858	2013
Seko Y, Ikeda K, Kawamura Y, Fukushima T, Hara T, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Suzuki F, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Kumada H	Antitumor efficacy of transcatheter arterial chemoembolization with warmed miriplatin in hepatocellular carcinoma	Hepatol Res.	43	942-949	2013

Hosaka T, <u>Suzuki F</u> , Kobayashi M, Seko Y, kawamura Y, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H	Clearance of hepatitis B surface antigen during long-term nucleot(s)ide analog treatment in chronic hepatitis B: results from a nine-year longitudinal study	J Gastroenterol.	48	930-941	2013
Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Fukushima T, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Prediction of Treatment Efficacy and Telaprevir-Resistant Variants after Triple Therapy in Patients Infected with HCV Genotype 1	J Clin Microbiol.	51	2862-2868	2013
<u>Suzuki F</u> , Hosaka T, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hara T, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Kumada H	Long-term efficacy and emergence of multidrug resistance in patients with lamivudine-refractory chronic hepatitis B treated by combination therapy with adefovir plus lamivudine	J Gastroenterol.	Epub ahead of print		2013
Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Utility of Telaprevir-Resistant Variant Detection for Prediction of Treatment Efficacy in HCV Genotype 1.	J Clin Microbiol.	Epub ahead of print		2013
Kawakami Y, <u>Suzuki F</u> , Karino Y, Toyota J, Kumada H, Chayama K	Telaprevir is effective given every 12 hours at 750 mg with peginterferon- α -2b and ribavirin to Japanese patients with HCV-1b IL28B rs8099917 TT.	Antivir Ther.	Epub ahead of print		2013
Arase Y, Kobayashi M, Kawamura Y, <u>Suzuki F</u> , Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Saito S, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H, Kobayashi T	Impact of virus clearance for the development of hemorrhagic stroke in chronic hepatitis C.	J Med Virol.	86	169-175	2014
Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Kobayashi M, Hara T, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H	Correlation between hepatitis B virus surface antigen level and alpha-fetoprotein in patients free of hepatocellular carcinoma or severe hepatitis	J Med Virol.	Epub ahead of print		2013

Hosaka T, <u>Suzuki F</u> , Kumada H	Does long-term entecavir treatment really reduce hepatocellular carcinoma incidence in patients with hepatitis B virus infection?	Hepatology.	Epub ahead of print		2013
Kawakami Y, Ikeda K, Fukushima T, Hara T, Kobayashi M, Saitoh S, Sezaki H, Akuta N, <u>Suzuki F</u> , <u>Suzuki Y</u> , Arase Y, Kumada H	Potential of no-touch pincer ablation procedure for small hepatocellular carcinoma that uses a multipolar radiofrequency ablation system: an experimental animal study.	Hepatol Res.	Epub ahead of print		2013
Kawamura Y, Ikeda K, Fukushima T, Seko Y, Hara T, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, <u>Suzuki F</u> , <u>Suzuki Y</u> , Arase Y, Kumada H	What Is the Most Effective Drug Delivery System for Cisplatin during the Treatment of Hepatic Tumors with Single-Session Transcatheter Chemotherapy? A Pilot Study.	Gut Liver.	5	576-584	2013
Hara T, Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Sezaki H, Susuki Y, Hosaka, Kobayashi M, Saitoh, Kumada H	A pilot study of triple therapy with telaprevir, peginterferon and ribavirin for elderly patients with genotype 1 chronic Hepatitis C.	J Med Virol.	85	1746-1753	2013
Kobayashi M, Hosaka T, <u>Suzuki F</u> , Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H	Seroclearance rate of hepatitis B surface antigen in 2,112 patients with chronic hepatitis in Japan during long-term follow-up	J Gastroenterol.	Epub ahead of print		2013
Imai N, Ikeda K, Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, <u>Suzuki F</u> , Suzuki Y, Arase Y, Kumada H	Transcatheter arterial chemotherapy with miriplatin for hepatocellular carcinoma patients with chronic renal failure: report of three cases.	Gut Liver.	7	246-251	2013
Ogura S, Saitoh S, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, <u>Suzuki F</u> , <u>Suzuki Y</u> , Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Magnetic resonance laparoscopy: A new non-invasive technique for the assessment of chronic viral disease.	Hepatol Res.	43	836-845	2013
Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Seko Y, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Efficacy and anticarcinogenic activity of ribavirin combination therapy for hepatitis C virus-related compensated cirrhosis	Intervirolgy.	56	37-45	2013

Seko Y, Akuta N, <u>Suzuki F</u> , Kawamura Y, Sezaki H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K. Kumada H	Amino acid substitutions in the hepatitis C Virus core region and lipid metabolism are associated with hepatocarcinogenesis in nonresponders to interferon plus ribavirin combination therapy.	Intervirolgy.	56	13-21	2013
Sezaki H, <u>Suzuki F</u> , Hosaka T, Akuta N, Fukushima T, Hara T, Kawamura Y, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H	Effectiveness and safety of reduced-dose telaprevir-based triple therapy in chronic hepatitis C patients	Hepatol Res.	Epub ahead of print		2014

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
Akazawa D, Morishita M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T	Neutralizing Antibodies Induced by Cell Culture-Derived Hepatitis C Virus Protect Against Infection in Mice	GASTROENT EROLOGY	145	447-455	2013
Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T Wakita T	Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon	Journal of General Virology	95	60-65	2014
Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T	Signal Peptidase Complex Subunit 1 Participates in the Assembly of Hepatitis C Virus through an Interaction with E2 and NS2	PLOS Pathogens	August Volume 9 Issue 8 E1003589	1-12	2013
Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, Matsumoto T, Matsuura T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamaguchi T, Miyazawa K, Aizaki H, Suzuki T, Wakita T, Imoto M, Kojima S	HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor	SCIENTIFIC REPORTS	3:3243, DOI:10.103 8/srep0324 3	1-7	2013
相崎 英樹	HCV感染と代謝異常(脂 質・エネルギー)	医学のあゆみ	Vol.245 No.8	666-667	2013

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
Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, <u>Nakamoto Y</u> , Kaneko S	Increase in CD14+HLA-DR ⁻ /low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients and its impact on prognosis.	Cancer Immunol. Immunother.	62(8)	1421-1430	2013
Nakagawa H, Mizukoshi E, Iida N, Terashima T, Kitahara M, Marukawa Y, Kitamura K, <u>Nakamoto Y</u> , Hiroishi K, Imawari M, Kaneko S	In vivo immunological antitumor effect of OK-432-stimulated dendritic cell transfer after radiofrequency ablation.	Cancer Immunol. Immunother.	(in press)		2014