

H. 知的所得権の出願・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 に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究
HCV 感染ヒト化肝臓キメラマウスの SVR モデル作製と肝病理組織学的及び遺伝子解析

担当責任者 坪田昭人 東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 基盤研究施設 教授

研究要旨

SVR は、抗 HCV 療法における効果判定基準の一つであり、短期的な血清学的エンドポイントに過ぎない。また SVR 達成後の病態に関してはほとんどわかっていない。本研究では、ヒト化肝臓キメラマウスにおける SVR モデルを確立すること、そのモデルを用いて肝組織内微細構造変化を再現すること、その微細構造変化の意義について特に電子顕微鏡学的検討を行うことである。現在進行中であるが、一部その結果が出始めており、さらに検討を進めている。

A. 研究目的

SVR (sustained virological response) は、抗 HCV 療法における効果判定基準の一つであり、短期的な血清学的エンドポイントに過ぎない。「“SVR=肝炎治癒”としてよいのか?」、「何をもって肝炎の治癒なのか?」、「SVR 後いつまでフォローすべきか?」など明確にすべき課題は多い。また組織学的治癒が最終エンドポイントと考えられるが、SVR 後の肝組織内微細構造の変化や状態は未解明な部分が少なくない。SVR を達成したヒト対象での詳細な検討は、サンプルの入手困難さや倫理的な観点等より限界がある。本研究の目的は、それらの限界を克服するために肝臓をヒト化したマウスモデルを用いて、SVR 後の肝細胞内潜在的 HCV 残存の可能性や微細構造も含めた肝組織病理学的観点からの病態解明を行うことである。

B. 研究方法

① HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウスの SVR モデル作製
公益財団法人 実験動物中央研究所(神奈川県川崎) で樹立された NOD. Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug} Tg(Alb-Plau)11-4/ShiJic マウス(7週令・雄、以下 TK-NOG マウス)を東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター

実験動物施設内の TK-NOG マウス専用隔離個室 P2A で飼育した。自殺遺伝子である thymidine kinase (TK) を肝細胞特異的に発現している TK-NOG マウスに独自のプロトコールで基質である ganciclovir (GCV) を腹腔内投与し肝傷害を惹起させ、相応の肝傷害が生じた段階で尾静脈投与により HCV を接種した。

接種後 1~2 週毎に血清 HCV 量(real-time PCR) を測定し、HCV の持続感染が確認された後に DAAs (direct-acting antiviral agents) を 4 週間連日投与し、血中 HCV を陰性化させた。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京慈恵会医科大学の動物実験委員会、病原体等安全管理委員会、遺伝子組み換え実験安全対策委員会、倫理委員会で承認済みである。

② HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウス SVR モデルの肝細胞微細構造の検討

上記の血中 HCV 陰性化を“SVR”状態とみなし、マウスの肝組織内 HCV 残存の可能性を HCV 遺伝子レベルや微細構造の変化を電子顕微鏡や免疫組織学的に検討した。

C. 研究結果

① HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウスによる SVR モデルの確立

ヒト血清アルブミン濃度は 0.8~3.7 mg/mL であり、ヒト肝細胞置換率に換算すると約 80% のマウスが 40~70% の範囲にあった。血清 HCV RNA 量は接種後 6~8 週で 5.1~7.3 log copy/mL に達していた。DAAs 投与後は速やかに血清 HCV RNA 量が低下したが、必ずしも陰性化には至らず一部に留まった。

② HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウス SVR モデルの肝細胞微細構造の変化

DAAs により HCV 持続感染から持続陰性化したヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞を 2.5% glu- taraldehyde 固定後処理し、電子顕微鏡検査で検討した結果、今回の検討では明らかな HCV に特徴的所見は得られなかった。

D. 考察

① HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウスによる SVR モデルの確立

TK-NOG マウスの GCV による肝傷害の程度は予想以上に個体間で相当な差がある。おそらく GCV に対する感受性の相違によるものと考えられる。したがって、ヒト肝細胞移植に最適な肝傷害範囲（ALT 200~500 IU/L）の調整が難しい。肝傷害の程度をその都度見極めながら適量の GCV 投与を調整しなければならない。本研究では段階的投与のアルゴリズムを作成し有用なことが確認できた。またヒト肝細胞移植時にも解凍後の肝細胞維持方法、iPS 再生医療で実用化されている方法の適用、肝細胞増殖因子の投与、移植後の GCV 投与などの工夫でさらにヒト肝細胞置換率の向上とマウスの生

存率が期待できるものと考えられた。

② HCV 持続感染ヒト化肝細胞キメラマウス SVR モデルの肝細胞微細構造の変化

HCV 感染に特徴的な肝細胞微細構造に関しては議論の余地があり、一定の見解を得るまでには至っていない。臨床では SVR 症例からの発癌が最も重要な問題であり、SVR 症例をどのように経過観察していくかが課題である。SVR 後の病態が明らかになれば、その解決の手がかりになり得る。特に発癌と関連する肝細胞微細構造の電子顕微鏡所見がわかれば、その本態に迫れると思われる。SVR 後の所見のみならず HCV 持続感染状態の所見や実際の HCV 患者症例・SVR 患者症例での肝組織学的検討が必須である。

E. 結論

HCV 感染ヒト化肝臓キメラマウスの SVR モデルが作製できた。ヒト化肝臓マウスモデルを介して SVR を再現することで、SVR 後の肝組織内病態が解明され得る。しかし、いくつかの課題も浮き彫りになった。キメラマウスのより確実に高いヒト肝細胞置換率への改良、より確実な HCV 持続感染後の陰性化への薬剤投与方法、さらに動物モデルと多くの臨床例の肝組織学的所見の照合などが必要である。SVR 後の肝組織内病態が解明できれば、肝障害の再燃や肝発癌の予測、“肝炎治癒” のより絶対的な診断基準を明示することができ、経過観察方法も含め患者・医療・社会の精神的・経済的負担を効率的に軽減できると考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1. 論文発表

- 1) Nakagawa A, Atsukawa M, Tsubota A, Shimada N, Abe H, Kondo C, Itokawa N, Arai T, Hashimoto S, Matsushita Y, Fukuda T, Nakatsuka K, Iwakiri K, Kawamoto C, Aizawa Y, Sakamoto C. Relationship between HCV dynamics and sustained virological responses in chronic hepatitis C genotype 1b patients treated with telaprevir-based triple therapy. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26:1329-34.
- 2) Abe H, Tsubota A, Shimada N, Atsukawa M, Kato K, Takaguchi K, Asano T, Chuganji Y, Sakamoto C, Toyoda H, Kumada T, Ide T, Sata M, Aizawa Y. Predictors of response to 24-week telaprevir-based triple therapy for treatment-naïve genotype 1b chronic hepatitis C patients. *Gastroenterol Res Pract*. 2014:549709.
- 3) Atsukawa M, Tsubota A, Shimada N, Abe H, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Iwakiri K, Kawamoto C, Aizawa Y, Sakamoto C. Serum 25(OH)D3 levels affect treatment outcomes for telaprevir/peg-interferon/ ribavirin combination therapy in genotype 1b chronic hepatitis C. *Dig Liver Dis*. 2014;46:738-43.
- 4) Furihata T, Matsumoto S, Fu Z, Tsubota A, Sun Y, Matsumoto S, Kobayashi K, Chiba K. Different interaction profiles of direct-acting anti-hepatitis C virus agents with human organic anion transporting polypeptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:4555-64.
- 5) Abe H, Tsubota A, Shimada N, Atsukawa M, Kato K, Takaguchi K, Asano T, Chuganji Y, Sakamoto C, Toyoda H, Kumada T, Ide T, Sata M, Aizawa Y. Factors associated with sustained virological response in 24-week telaprevir-based triple therapy for chronic hepatitis C genotype 1b patients with the IL28B minor genotype. *Hepatol Res*. 2014 [Epub ahead of print]
- 6) Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, Kushida T, Furihata T, Tanaka H, Matsuura T. Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in poor virologic response to interferon-based combination therapy for chronic hepatitis C. *PLoS One*. 2014;9:e97078.
- 7) Atsukawa M, Tsubota A, Shimada N, Kondo C, Itokawa N, Nakagawa A, Fukuda T, Matsushita Y, Narahara Y, Osada Y, Yamaguchi H, Nakatsuka K, Iwakiri K, Kawamoto C, Sakamoto C. Effect of fluvastatin on 24-week telaprevir-based combination therapy for hepatitis C virus genotype 1b-infected chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26:781-7.
- 8) Tsubota A, Shimada N, Atsukawa M, Abe H, Kato K, Ika M, Matsudaira H, Nagatsuma K, Matsuura T, Aizawa Y. Impact of IL28B polymorphisms on 24-week telaprevir-based combination therapy for Asian chronic hepatitis C

patients with hepatitis C virus
genotype 1b. J Gastroenterol Hepatol.
2014;29:144-50.

- 9) Nagatsuma K, Hano H, Murakami K,
Shindo D, Matsumoto Y, Mitobe J, Tanaka
K, Saito M, Maehashi H, Owada M,
Ikegami M, Tsubota A, Ohkusa T, Aizawa
Y, Takagi I, Tajiri H, Matsuura T.
Hepatic stellate cells that coexpress
LRAT and CRBP-1 partially contribute
to portal fibrogenesis in patients
with human viral hepatitis. Liver Int.
2014;34:243-52.

2. 学会等発表 別紙報告

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

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

HCVに対する抗ウイルス治療後、SVR後の病態に関する研究

担当責任者：丸澤 宏之 京都大学医学研究科 消化器内科

分担研究課題：SVR 後の肝組織ゲノム解析

研究要旨：

近年、腫瘍細胞だけではなく、癌の発生母地となった慢性炎症組織中の非癌部の上皮細胞にも、発癌前の段階からすでに遺伝子変異やエピジェネティックな変化が蓄積されていることがわかってきた。そこで、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲノム解析法を活用し、HCVの持続感染による慢性肝炎・肝硬変組織中に潜在・蓄積したゲノム異常の全体像を明らかにすることにより、SVR達成時に、すでに肝組織に発癌に必要なゲノム異常を保有していることがSVR発癌に寄与しているという可能性を検証することを本研究課題の目的とする。今回の検討から、HCV感染による慢性肝疾患では、腫瘍発生前から多数の遺伝子変異が潜在性に蓄積していることが明らかとなり、これらの遺伝子変異が癌の発生や癌の進展に深く関与しているものと推定された。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスの基礎研究における昨今のめざましい成果を受けて、C型肝炎治療は、近年めまぐるしく進歩を遂げてきた。他方、SVR達成後に肝発癌を認める報告が以前より多数なされている。SVR後発癌の特徴としては、SVR後5年以内に診断されることが多く、診断時の進行度が早いことが報告されてきた。このように、SVR後発癌症例の臨床的特徴についてのエビデンスは蓄積されてきたが、なぜC型肝炎ウイルスを排除した後に肝発癌をきたすのかについては、諸説あるものの、その分子基盤については未だ明らかにされていない。

HCV感染による慢性肝炎/肝硬変を背景に発生する肝癌は、同時性・異時性に多発する(多中心性発癌)特徴を示すことが知られている。HCCは、HCV感染を背景とした慢

性肝疾患から次々と新たな癌が発生するという特徴を有しており、他臓器の癌と比べても、根治的な局所治療後の無再発生存率が低く、極めて予後不良となっている。すなわち、発癌という観点からは、HCV感染による慢性肝疾患は、臓器全体がきわめて発癌ポテンシャルの高い前癌状態にあるといえる。近年、癌細胞だけではなく、癌の発生母地となった慢性炎症組織中の非癌部の上皮細胞にも、発癌前の段階からすでに遺伝子変異やエピジェネティックな変化が蓄積されていることもわかってきた。すなわち慢性炎症には、発癌に必要な遺伝子レベルでの異常を惹起する機構が備わっているものと推定される。

近年のゲノム解析機器は著しく進歩し、次世代シーケンサーと呼ばれる高速シーケンサーが各研究分野に急速に浸透しており、

本解析装置を用いた癌の遺伝子異常の研究
成果も多数発表されている。本研究課題
では、次世代シーケンサーを用いた大規模ゲ
ノム解析法を活用し、HCV の持続感染によ
る慢性肝炎・肝硬変組織中に潜在・蓄積し
たゲノム異常の全体像を明らかにすること
により、SVR 達成時にすでに肝組織に発癌
に必要十分なゲノム異常を保有しているこ
とが、SVR 発癌に寄与しているという可能
性を検証することを目的とする。

B. 研究方法

1. 対象；

本年度は、HCV 感染により発癌をきた
した肝硬変症例において、癌部とともに、
その背景となる非癌部の全エクソン解析を
行い、腫瘍発生前から非腫瘍部肝組織に潜
在するゲノム異常の全体像をとらえること
を目標とした。解析対象は、多発 HCC を有
する HCV(+)肝硬変 3 症例と単発 HCC の 1 症
例、計 4 症例である。多発 HCC 症例では 2
つの HCC と非癌部肝硬変を、単発 HCC 症
例においては癌部と非癌部の肝硬変組織の全
エクソン解析を行った。

2. 方法；

各症例の肝癌腫瘍組織と非癌部である
背景肝組織のそれぞれから抽出した DNA サ
ンプルを対象とし、約 60Mb の全エクソン配
列を網羅したオリゴキャプチャーでエクソ
ン領域を選択的に捕捉回収し、次世代シー
ケンサーを用いて塩基配列の決定を行った。
引き続き、NextGENe ソフトウェアによる
mapping、dbSNP との異同比較、
KEGG を用いた pathway 解析など一連の情報

解析を行い、体細胞変異部位の同定とその
生物学的意義についての評価を行った。次
世代シーケンサー解析には、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。

C. 研究結果

まずはじめに、HCC の腫瘍部の全エクソ
ン解析を実施した。7つの腫瘍組織の検討
からは、計 768 遺伝子で 970 個の体細胞変
異が生じていることがわかった。これらの
遺伝子がどのような細胞機能に関連してい
るかを調べてみると、様々な代謝経路に関
連した遺伝子が最も多く含まれていること
がわかった。さらに、多発 HCC を有する 3
症例では、同時多発した 2 個の腫瘍間にお
ける変異パターンの傾向に違いがあること
もわかった。症例 1 では 32 遺伝子、症例 2
では 9 遺伝子と、2 個の腫瘍で検出された
遺伝子変異の約 30%程度が重複していたの
に対し、症例 3 においては腫瘍間における
遺伝子変異の共通点は全く認めなかった。
つまり、前者では、同時多発した HCC は肝
内転移により発生、後者は多中心性に個々
に発癌してきたものと推定され、多発する
HCC の発生経路の差異による遺伝的背景の
違いを明瞭に反映しているものと考えられ

た。

次に、同様の全エクソン解析を非癌部肝硬変組織にも実施したところ、病理組織学的には腫瘍の発生を認めない肝硬変組織においても、多数の遺伝子変異が潜在していることが明らかとなった。驚くべきことに、症例によっては、癌部よりも多くの変異を有する例も存在していた。さらに、これらの変異の中には癌部と共通して存在する変異も認められ、これらの変異遺伝子の中には発癌に関わるものが含まれている可能性が示唆された。

D. 考察

近年のゲノム解析の進歩により、徐々にHCCにおけるゲノム異常の全貌が明らかになりつつある。これらのゲノム情報を利用した新規治療の開発や個別化治療が期待されることはもちろんである。しかしながら、HCV感染による慢性肝炎/肝硬変を背景として発生したHCCでは、腫瘍組織の解析のみならず、その発癌母地となっている背景肝組織の評価はきわめて重要である。今回の検討により、HCV感染による慢性肝疾患では、腫瘍発生前から多数の遺伝子変異が潜在性に蓄積していることが明らかとなり、これらの遺伝子変異が癌の発生や癌の進展に深く関与しているものと推定された。今後、SVR後に肝発癌をきたした症例の肝組織において同様の検討を進めることにより、ウイルス排除にもかかわらず肝癌の発生に至る遺伝子異常の基盤を明らかにするとともに、経口剤による抗ウイルス療法により発癌予防が期待できる症例の絞り込みのた

めの一助となる情報を集約することを目指していく。

E. 結論

HCV治療後のSVR症例の肝組織病態をゲノム異常の潜在レベルという視点から評価することにより、抗ウイルス療法を完了した症例中、将来の発癌リスクの高い群を絞り込むことができれば、治療後フォローアップの方法や期間などを個別化することが可能となり、医療経済的な波及効果も大きいことが期待される。

F. 健康危険情報

特記事項なし

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) 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. 97: 344-350.

- 3) Inuzuka T, Ueda Y, Morimura H, Fujii Y, Umeda M, Kou T, Osaki Y, Uemoto S, Chiba T, Marusawa H: Reactivation from occult HBV carrier status is characterized by low genetic heterogeneity with the wild-type or G1896A variant prevalence. J Hepatology. 2014. 61: 492-501.

2. 学会発表

- (1) Ohtsuru S, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H. Infectivity and clinical significance of defective hepatitis C virus clones in chronic hepatitis C patients. The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2015.3.12-15, Istanbul.
- (2) Inuzuka T, Ueda Y, Chiba T, Marusawa H. Clinical and viral characteristics of HBV reactivation from occult carrier status triggered by chemotherapy or immunosuppressive therapy. The 11th JSH Single Topic Conferences. 2014.11.20, Hiroshima.
- (3) 大鶴繁、上田佳秀、犬塚義、千葉勉、丸澤宏之. C型慢性肝炎における欠損型HCVの感染病態と臨床的意義. 第24回抗ウイルス療法研究会総会 2014.5.7-9. 山梨.

H. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
特記事項なし

SVR 後肝障害症例の解析

担当責任者：林 和彦 名古屋大学医学部附属病院 病院講師

研究要旨：C型肝炎ウイルス変異とSVR後発癌の関連を解析して、発癌の高危険群を同定して、効率と経済的なフォローアップ法を考案する。SVR後発癌と非発癌の治療前のウイルス変異を解析して、その相違を検討することで、重要な変異を同定する。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス変異とSVR後発癌との関連を解析して、発癌の高危険群を同定する。画期的なHCV薬の登場でSVRが急増し、その病態の解明が必要となる。

B. 研究方法

SVR後発癌と非発癌の治療前のウイルス変異を解析して、その相違を検討することで、重要な変異を同定する。

（倫理面への配慮）

書面でインフォームド・コンセント取得

C. 研究結果

550例の治療前のHCVウイルス変異を測定した。そのうち190例の現在まで経過を観察した。5例のSVR発癌を確認したが、少数のため解析が困難であったので、残りの症例の解析を進める。

D. 考察

HCVコア領域70、75、92番変異を解析したが、発癌例が少数のため、有意な検討が困難であった。今後残りの症例の解析と継続した観察を行い、変異の影響を解明する。

E. 結論

HCVコア領域70番92番変異を投与前を測定したが、SVR発癌例が少なく更なる観察が必要である。

F. 健康危険情報

特記すべき事項は発生せず。

G. 研究発表

1. 論文発表：

1) C型慢性肝炎におけるNS3とNS5A領域の薬剤耐性変異とペグインターフェロン α 2b・リバビリン・テラプレビル併用療法の効果について

2. 学会発表：

1) Effect of Peginterferon alfa-2b and Ribavirin on Hepatocellular Carcinoma Prevention in Older Patients with Chronic Hepatitis C.

J Gastroenterol Hepatol. 100-103 ; 2014

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：該当なし

2. 実用新案登録：該当なし

3. その他：該当なし

非肝臓細胞で複製可能な HCV 変異株とその miR-122 非依存的な複製

担当責任者 福原崇介 大阪大学微生物病研究所 助教

研究要旨：HCV は肝臓に感染指向性を持つが、これまでに肝外組織に病変性を認めることが知られており、HCV が非肝臓細胞でも増殖できる可能性が示唆される。HCV の増殖には肝臓特異的に発現している miR-122 が重要であるが、非肝臓細胞では miR-122 非依存的に HCV が複製・増殖している可能性がある。そこで miR-122 非依存的な HCV 増殖機構について検討するために、miR-122 ノックアウト Huh7 細胞を樹立した。ノックアウト細胞では、ウイルスタンパク質の翻訳活性や HCV 複製効率が顕著に抑制されたが、培養上清中への粒子産生が認められた。さらに、ウイルスを継代することで、ノックアウト細胞で高い感染性を認める HCV を得た。この HCV は miR-122 の阻害剤に抵抗性を示すことから、miR-122 に非依存的に複製していることが確認された。さらに、この変異株は非肝臓細胞由来の培養細胞においても miR-122 非依存的に効率よく複製することが可能であった。以上から、実際の患者体内において非肝臓組織がリザーバーとなり、HCV の持続感染を通してこうした変異 HCV が出現しうること、そして再活性化を引き起こす可能性が示唆された。

A. 研究目的

HCV 感染患者に対し、現在臨床現場ではインターフェロンとリバビリンによる治療が行われているが、近年ウイルスタンパク質を直接標的とした抗 HCV 薬の開発により、劇的に著効率が上昇した。その一方で、これまでに、HCV 患者由来の末梢血単核球やマクロファージ、脳などの非肝臓細胞におけるウイルス RNA の複製が報告されている。このような肝外組織でのウイルス増殖は、治療後に血中からウイルス RNA が検出できなくなったとしても、非肝臓細胞において HCV が潜伏感染し、微量の感染性粒子を産生することで、ウイルス再感染を来す、リザーバーとなっている可能性を示唆している。しかしながら、これまで非肝臓系の細胞に HCV は感染し、ウイルスの複製が可能であることは示されてきたが、従来

用いられてきた野生型 HCV では複製効率が低いために粒子の産生は検出できておらず、非肝臓細胞での感染性粒子の産生は実証されていない。今回、人工ヌクレアーゼを用いて miR-122 をノックアウトした Huh7 細胞を樹立し、miR-122 非依存的な HCV 増殖機構について検討した。

B. 研究方法

人工ヌクレアーゼを *In vitro* で合成した mRNA を導入することで発現させ、細胞をクローニングし、遺伝子解析することによって miR-122 のノックアウト Huh7 細胞を樹立した。それらの細胞に対する HCV の感染性を qRT-PCR および Focus forming assay によって検討した。また、より HCV 高感受性を示す Huh7.5.1 細胞を用い、同様に miR-122 のノッ

クアウト細胞を樹立した。HCV を miR-122 ノックアウト Huh7.5.1 細胞で数代継代することで、適応した HCV 変異株を得た。この変異株を miR-122 阻害剤存在下で miR-122 ノックアウトおよび回復 Huh7 細胞に感染させ、その阻害効果の有無を検討した。また、非肝臓系の培養細胞である Hec1B や 293T 細胞に対して miR-122 存在・非存在下での野生型および変異型 HCV の複製効率を比較した。最後に、複数の非肝臓由来の培養細胞に対して野生型および変異型 HCV の複製効率を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、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、利益が保護されるよう十分に配慮する。具体的には、厚生労働省等で検討されている「ヒトゲノム解析研究に関する共通指針」に則り各研究実施機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係る手続きを実施し、また提供試料、個人情報厳格に管理、保存する。

C. 研究結果

HCV 感染 miR-122 ノックアウト細胞において、ウイルスタンパク質の翻訳活性や HCV 複製効率は顕著に抑制されたが、培養上清中への感染性粒子産生がわずかに認められた。一方、より HCV 高感受性である Huh7.5.1 細胞由来の miR-122 ノックアウト細胞で高いウイルス増殖能が認められたため、ウイルスを継代することでノックアウト細胞に適応させた HCV 変異株を得た。この変異株を miR-122 ノックアウト Huh7 細胞に感染させると、miR-122 存在下における野生株感染に匹敵する増殖性を示した。一方、miR-122 存在下では、野生型と変異型 HCV の増殖性に有意な差は認められなかったため、この変異株は miR-122 への依存性が低下していることが示唆された。また、この変異株は野生株と比べ、miR-122 阻害剤に対してより抵抗性を示したため、miR-122 非依存性を獲得し、さらに効率良く複製可能となっていることが明らかとなった。また、変異型 HCV は、非肝臓系の培養細胞である Hec1B や 293T 細胞に対しても、

miR-122 存在下に匹敵する高い HCV-RNA 複製効率を示した。その他複数の非肝臓由来の培養細胞に対しても同様に、変異型 HCV は高効率に複製することが可能であった。

D. 考察

今回の検討により、miR-122 ノックアウト細胞に HCV を適応させることで得られた変異株は、miR-122 非依存的な HCV 増殖が可能であることが明らかとなった。

また我々は、HCV の粒子産生には、肝臓特異的な脂質親和性のアポリポタンパク質 (ApoB や ApoE) のみならず、非肝臓組織でも発現が認められる他のアポリポタンパク質や両親媒性の α -ヘリックス構造をもつ分泌型タンパク質が重要であることを明らかにしている。アポリポタンパク質以外にもこうした特徴をもつタンパク質は種々の組織で発現していることから、今後は、複製能の高い変異型 HCV の感染により、非肝臓系細胞からの HCV 粒子産生の可能性を検討したい。

E. 結論

miR-122 非依存的に増殖する変異型 HCV は、miR-122 非存在下でも非肝臓細胞で効率よく複製することができる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. [Fukuhara T, Wada M, Nakamura S, Ono C, Shiokawa M, Yamamoto S, Motomura T, Okamoto T, Okuzaki D, Yamamoto M, Saito I, Wakita T, Koike K, and Matsuura Y. Amphipathic \$\alpha\$ -Helices in apolipoproteins are crucial to the formation of infectious hepatitis C virus particles. *PLoS Pathogens* 2014; DOI: 10.1371/journal.ppat.1004534](#)
2. [Shiokawa M, Fukuhara T, Ono C,](#)

Yamamoto S, Okamoto T, Watanabe N, Wakita T, and Matsuura Y. Novel permissive cell lines for a complete propagation of hepatitis C virus. *J. Virol.* 2014; 88: 5578-5594

of Hepatitis C Virus. 21st International symposium on Hepatitis C and related viruses, Banff, 2014

H. 知的所有権の出願・登録状況
特になし。

2. 学会発表

1. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
2. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Mai Shiokawa, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells. 33rd American Society for Virology, Annual Meeting, Colorado, 2014
3. Chikako Ono, Takasuke Fukuhara, Satomi Yamamoto, Masami Wada, Toru Okamoto, Daisuke Okuzaki, Yoshiharu Matsuura, Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells, 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、奈良、2014
4. 福原崇介、山本聡美、小野慎子、和田真実、岡本徹、茶山一彰、松浦善治、HCVの Quasispecies は増殖性に関与する、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014
5. Takasuke Fukuhara, Masami Wada, Shota Nakamura, Chikako Ono, Satomi Yamamoto, Mai Shiokawa, Toru Okamoto, Kazuhiko Koike, Yoshiharu Matsuura, Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation

Ⅱ. 学会等発表実績

学会等発表実績

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果(発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所(学会等名)	発表した時期	国内・外の別
Relationship between the mitochondria gene abnormality in liver tissues in patients with chronic viral hepatitis C and the hepatocarcinogenesis.	Aizawa Nobuhiro, Nakano Chikage, Hasegawa Kunihiro, Takata Ryo, Aoki Tomoko, Hashimoto Kenji, Ishii Akio, Takashima Tomoyuki, Sakai Yoshiyuki, Ikeda Naoto, Tanaka Hironori, Iwata Yoshinori, Enomoto Hirayuki, Saito Masaki, Iijima Hiroko, Imuro Yuji, Fujimoto Jiro, Nishiguchi Shuhei.	The 65rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD2014), Boston	2014.11	国外
Natural killer cells as immunological sentinels against HBV infection. 口頭発表	Kanto T, Yoshio S, Sugiyama M, Mizokami M.	The 2nd Japan-Italy Liver workshop, Hepatitis, steatosis and hepatocellular carcinoma: molecular basis and clinical links.	2014, 11	国内
Distinct helper roles of dendritic cell subsets in NK cell-dependent HBV suppression in bystander infected cells. ポスター発表	Yoshio S, Kanto T, Sugiyama M, Shouji H, Mano Y, Aoki Y, Nishida N, Korenaga M, Murata K, Mizokami M.	The Liver Meeting AASLD 65th Annual Meeting and Postgraduate Course	2014, 11	国外
“TVR/Peg-IFN/RBV併用療法におけるTVR投与量が与える治療効果ならびに副作用へのインパクト” シンポジウム	平松直樹、林 紀夫、竹原徹郎.	第100回日本消化器病学会大会(東京)	2014	国内
“高齢者C型肝炎に対するプロテアーゼ阻害剤併用療法の現況と有用性 一多施設共同研究一” ワークショップ	小瀬嗣子、平松直樹、竹原徹郎.	第18回日本肝臓学会大会、第56回日本消化器病学会大会(神戸)	2014	国内
Bovine lactoferrinの酸化ストレス状態における効果と作用機序～ラクトフェリンのこれから～	坪田昭人	第4回臨床ラクトフェリンシンポジウム	2014.3.9	国内
TVR3剤併用療法の早期HCV動態から見た治療効果予測(RF3-5)	島田紀朋,高口浩一,井出達也,加藤慶三,坪田昭人,豊田秀徳,熊田卓,佐田通夫	第100回日本消化器病学会総会	2014.4.24	国内
IL28B minor genotypeのC型慢性肝炎に対する3剤併用療法における再燃に寄与する因子の検討(RF3-8)	近藤千紗,厚川正則,島田紀朋,安部 宏,中川 愛,糸川典夫,加藤慶三,福田 健,松下洋子,檜原義之,中塚雄久,岩切勝彦,川本智章,坪田昭人,相澤良夫,坂本長逸	第100回日本消化器病学会総会	2014.4.24	国内
C型慢性肝炎 IL28B minor genotypeに対するAlfacalcidol併用3剤療法についての検討; Pilot Study(O-297)	糸川典夫,厚川正則,坪田昭人,近藤千紗,橋本知美,松下洋子,福田 健,城所秀子,檜原義之,中塚雄久,金沢秀典,坂本長逸	第100回日本消化器病学会総会	2014.4.25	国内

代償性肝硬変に対する peg-IFN/ribavirin 併用療法に血清 25(OH)D3濃度に与える影響(P-093)	中川 愛,厚川正則,島田紀朋,糸川典夫,近藤千紗,安良岡高志,橋本知実,福田 健,松下洋子,城所秀子,檜原義之,中塚雄久,坪田昭人,岩切勝彦,川本智章,坂本長逸	第100回日本消化器病学会総会	2014.4.24	国内
C型慢性肝炎Naïve症例に対する Telaprevir+Peginterferon+Ribavirin3剤療法の治療成績(P-225)	安部 宏,島田紀朋,厚川正則,加藤慶三,坪田昭人,坂本長逸,相澤良夫	第100回日本消化器病学会総会	2014.4.25	国内
TK-NOG(Humanized mice model)による感染実験と今後の活用法	坪田昭人,松浦知和	平成26年度厚生労働省科学研究費補助金感染症対策総合研究事業 B型肝炎創薬実用化等研究事業 次世代生命基盤技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究 合同班会議	2014.7.26	国内
ヒト肝キメラマウスのSVR後の肝病理組織学的解析	坪田昭人	平成26年度厚生労働省科学研究費補助金肝炎等克服政策研究事業 HCVに対する抗ウイルス治療後、SVR後の病態に関する研究班「SVR班」	2014.9.24	国内
ヒト化肝臓キメラマウスの活用法	坪田昭人	平成26年度厚生労働省科学研究費補助金B型肝炎創薬実用化等研究事業 合同研究会「B型肝炎ウイルス感染症に対する新規の治療薬の研究・開発」班「次世代生命基盤研究技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究」班	2014.9.28	国内
TK-NOGマウスを用いたin vivo薬効評価	坪田昭人	平成26年度厚生労働省科学研究費補助金B型肝炎創薬実用化等研究事業「次世代生命基盤研究技術を用いたB型肝炎制圧のための創薬研究」第6回班会議	2014.11.15	国内
Response-guided Peginterferon α +Ribavirin 療法施行 Genotype2型C型慢性肝炎の治療効果におけるIL28B遺伝子多型測定の意味(O-40)	安部 宏,石黒晴哉,島田紀朋,関 伸嘉,杉田知典,会田雄太,富田陽一,永野智久,板垣宗徳,須藤 訓,坪田昭人,相澤良夫	第40回日本肝臓学会東部会	2014.11.27	国内
我が国におけるC型慢性肝炎患者の血清25(OH)D3濃度の特徴(O-47)	中川 愛,厚川正則,島田紀朋,阿部 宏,吉澤 海,浅野 徹,大久保雄介,荒木真裕,池上正,糸川典夫,近藤千紗,中塚雄久,忠願寺義通,坪田昭人,相澤良夫,坂本長逸	第40回日本肝臓学会東部会	2014.11.27	国内
C型慢性肝炎における血清25(OH)D3濃度の特徴についての検討	新井泰央,厚川正則,島田紀朋,安部宏,大久保知美,中川愛,糸川典夫,近藤千紗,坪田昭人,相澤良夫,川本智章,坂本長逸	第18回日本肝臓学会大会	2014.10.23	国内

Telaprevir3剤療法を導入したIL28B Major genotypeのC型慢性肝炎における非SVRに関する因子の検討	安部宏、島田紀朋、厚川正則、坪田昭人、關伸嘉、杉田知典、会田雄太、井家麻紀子、相澤良夫	第18回日本肝臓学会大会	2014.10.23	国内
Simeprevir3剤併用療法におけるvitaminD併用療法の治療初期効果について	厚川正則、島田紀朋、吉澤海、安部宏、中川愛、糸川典夫、近藤千紗、坪田昭人、相澤良夫、坂本長逸	第18回日本肝臓学会大会	2014.10.23	国内
C型慢性肝炎に対する3剤併用療法のHCV RNA陰性化時期がSVRに与える影響～48週延長投与例も含めた解析	中川愛、厚川正則、島田紀朋、安部宏、加藤慶三、近藤千紗、糸川典夫、福田健、松下洋子、中塚雄久、長田祐二、岩切勝彦、川本智章、坪田昭人、相澤良夫、坂本長逸	第50回日本肝臓学会総会	2014.5.29	国内
Non-responder に対するT12PR48はSVRを向上させる	島田紀朋、厚川正則、坪田昭人	第50回日本肝臓学会総会	2014.5.29	国内
Peg-IFN/ribavirin/telaprevir 三剤併用療法における再燃に寄与する因子の検討	近藤千紗、厚川正則、島田紀朋、安部宏、中川愛、糸川典夫、加藤慶三、福田健、松下洋子、檜原義之、中塚雄久、岩切勝彦、川本智章、坪田昭人、相澤良夫、坂本長逸	第50回日本肝臓学会総会	2014.5.29	国内
B型慢性肝炎に対するペグインターフェロン療法～開始直前Hbe抗原からみた治療効果の検討～	神田達郎、島田紀朋、厚川正則、篠崎正美、三上繁、中本晋吾、新井誠人、今関文夫、坪田昭人、横須賀収	第50回日本肝臓学会総会	2014.5.29	国内
C型慢性肝炎に対するTelaprevir+Peginterferon+Ribavirin3剤療法の治療成績	安部宏、島田紀朋、厚川正則、坪田昭人、關伸嘉、杉田知典、会田雄太、加藤慶三、坂本長逸、相澤良夫	第50回日本肝臓学会総会	2014.5.29	国内
Clinical and viral characteristics of HBV reactivation from occult carrier status triggered by chemotherapy or immunosuppressive therapy.	Inuzuka T, Ueda Y, Chiba T, <u>Marusawa H.</u>	The 11th JSH Single Topic Conferences	2014.11.20	国内
Infectivity and clinical significance of defective hepatitis C virus clones in chronic hepatitis C patients.	Ohtsuru S, Ueda Y, Chiba T, <u>Marusawa H.</u>	The 24th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver.	2015.3.12-15	国外
C型慢性肝炎における欠損型HCVの感染病態と臨床的意義.	大鶴繁、上田佳秀、犬塚義、千葉 勉、丸澤宏之.	第24回抗ウイルス療法研究会総会	2014.5.7-9	国内
C型慢性肝炎におけるNS3とNS5A領域の薬剤耐性変異とペグインターフェロンα2b・リバビリン・テラプレビル併用療法の効果について口頭	林 和彦、石上 雅敏、後藤秀実	第100回日本消化器病学会総会	4月	国内
Drug resistance mutations in the NS3 and NS5A regions in patients with hepatitis C virus genotype 1b and response to telaprevir plus pegylated-interferon -alpha 2b and ribavirin combination therapy ポスター	<u>Hayashi K</u> , Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Katano Y, Hirooka Y, Goto H	DDW2014	5月	国外

C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン α 2b・リバビリン療法無効例におけるcore, NS3, NS5A領域のアミノ酸変異の変化についてポスター	林 和彦、石上 雅敏、新家卓郎、今井 則博、阿知波宏一、荒川 恭宏、山田 恵一、中野 聡、石津 洋二、葛谷 貞二、本多 隆、石川 哲也、片野 義明、後藤 秀実	第50回日本肝臓学会総会	5月	国内
C型慢性肝炎難治例におけるPegIFN・Ribavirin・Telaprevir3剤併用療法の治療効果	本多 隆、石上 雅敏、新家卓郎、今井 則博、阿知波宏一、荒川 恭宏、山田 恵一、中野 聡、石津 洋二、葛谷 貞二、林 和彦、中野 功、石川 哲也、片野 義明、後藤 秀実	第50回日本肝臓学会総会	5月	国内
C型慢性肝炎におけるPEG-IFN+Ribavirin+Simeprevir 3剤併用療法の実臨床での効果 口頭	石上 雅敏、林 和彦、後藤 秀実	JDDW2014	10月	国内
高齢者C型慢性肝炎におけるPegIFN・Ribavirin・Simeprevir3剤併用療法の治療効果 ポスター	本多 隆、石上 雅敏、加藤幸一郎、新家 卓郎、今井 則博、阿知波 宏一、荒川 恭宏、山田 恵一、石津 洋二、葛谷 貞二、林 和彦、中野 功、石川 哲也、後藤 秀実	JDDW2014	10月	国内
C型慢性肝炎genotype1aにおける自然発生しているNS3プロテアーゼ阻害剤耐性変異についての検討 ポスター	林 和彦、石上 雅敏、加藤幸一郎、新家 卓郎、今井 則博、阿知波 宏一、荒川 恭宏、山田 恵一、石津 洋二、葛谷 貞二、本多 隆、片野 義明、豊田 秀徳、熊田 卓、廣岡 芳樹、後藤 秀実	JDDW2014	10月	国内
The prevalence of naturally occurring resistance mutations against NS3 protease inhibitors, NS5A replication complex inhibitors, and NS5B polymerase inhibitors in patients with hepatitis C virus genotype 1b.ポスター	Hayashi K, Ishigami M, Ishizu Y, Kuzuya T, Honda T, Katano Y, Hirooka Y, Goto H	AASLD2014	11月	国外
Polymorphism in the NS3 region in patients with hepatitis C virus genotype 1B and response to telaprevir or simeprevir plus pegylated-interferon-alpha 2b and ribavirin combination therapy ポスター	Hayashi K	APDW2014	11月	国外
Amphipathic α -helices of Exchangeable Apolipoproteins Participate in the Particle Formation of Hepatitis C Virus (口頭)	福原崇介	21st International symposium on Hepatitis C and related viruses	2014/9/7	国外
Exchangeable apolipoproteins participate in the particle formation of hepatitis C virus (口頭)	福原崇介	33rd American Society for Virology, Annual Meeting	2014/6/21	国外
Characterization of HCV Propagation in miR-122 Knockout Cells (口頭)	小野慎子	33rd American Society for Virology, Annual Meeting	2014/6/21	国外
HCVのQuasispeciesは増殖性に関与する(口頭)	福原崇介	第62回日本ウイルス学会学術集会	2014/11/10	国内

Characterization of HCV propagation in miR-122 knockout cells (口頭)	小野慎子	第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム	2014/9/23	国内
--	------	----------------------	-----------	----

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Comparison of improved prognosis between hepatitis B- and hepatitis C- related hepatocellular carcinoma	Minami T, Tateishi R, Shiina S, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Koike K.	Hepatol Res	2015 [Epub ahead of print]	
Slight elevation of high sensitivity C-reactive protein to predict recurrence and survival in patients with early stage hepatitis C-related hepatocellular carcinoma	Fujiwara N, Tateishi R, Nakagawa H, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K.	Hepatol Res	2014 [Epub ahead of print]	
Impact of serum levels of IL-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients.	Nakagawa H, Fujiwara N, Tateishi R, Arano T, Nakagomi R, Kondo M, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K.	J Gastroenterol Hepatol	2015;30(2):379-388.	
Cause-specific mortality associated with aging in patients with hepatocellular carcinoma undergoing percutaneous radiofrequency ablation.	Fujiwara N, Tateishi R, Kondo M, Minami T, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Masuzaki R, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K.	Eur J Gastroenterol Hepatol	2014;26(9):1039-1046	
Frequency of and predictive factors for vascular invasion after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma	Asaoka Y, Tateishi R, Nakagomi R, Kondo M, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Uchino K, Enooku K, Nakagawa H, Kondo Y, Shiina S, Yoshida H, Koike K.	PLoS One	2014 Nov 14;9(11):e111662	
The impact of PNPLA3 polymorphisms on the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus Infection	Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, Koike K.	Hepatol Res	2014;44(10):E137-44.	

Discrimination of fibrotic staging of chronic hepatitis C using multiple fibrosis markers.	Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, <u>Koike K</u> , Hayashi N, Tsubouchi H, Kumada H.	Hepatol Res	2014;44(11):1047-1055	
Spontaneous clearance of serum hepatitis C virus RNA during the clinical course of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C.	Minami T, Tateishi R, Shiina S, Fujiwara N, Mikami S, Sato M, Uchino K, Enooku K, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, <u>Koike K</u> .	Hepatol Res	2014;44(10):E32-37.	
Increased serum autotaxin levels in hepatocellular carcinoma patients were caused by background liver fibrosis but not by carcinoma.	Kondo M, Ishizawa T, Enooku K, Tokuhara Y, Ohkawa R, Uranbileg B, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Kokudo N, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H.	Clin Chim Acta	2014;433:128-134.	
Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection.	Kumada H, Suzuki Y, Ikeda K, Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, Ido A, Yamamoto K, Takaguchi K, Izumi N, <u>Koike K</u> , Takehara T, Kawada N, Sata M, Miyagoshi H, Eley T, McPhee F, Damokosh A, Ishikawa H, Hughes E. Ido A, Yamamoto K, Takaguchi K, Izumi N, Koike K, Takehara T, Kawada N, Sata M, Miyagoshi H, Eley T, McPhee F, Damokosh A, Ishikawa H, Hughes E.	Hepatology	2014;59(6):2083-2091	
Increased serum mitochondrial creatine kinase activity as a risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients.	Enooku K, Nakagawa H, Soroida Y, Ohkawa R, Kageyama Y, Uranbileg B, Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H. Watanabe N, Tateishi R, Yoshida H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H.	Int J Cancer	2014;135(4):871-879.	
IL28B minor allele is associated with a younger age of onset of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection.	Sato M, Kato N, Tateishi R, Muroyama R, Kowatari N, Li W, Goto K, Otsuka M, Shiina S, Yoshida H, Omata M, <u>Koike K</u> .	J Gastroenterol	2014;49(4):748-754.	
Impact of IL28B Genetic Variation on HCV-Induced Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis: A Meta-Analysis.	Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, Taguri M, <u>Koike K</u> .	PLoS One	2014 Mar 17;9(3):e91822	