

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590995

研究課題名(和文)酸化ストレス誘導性の肝腫瘍原性遺伝子に関する機能解析：分子標的治療への基礎的検討

研究課題名(英文)Functional analysis of oxidative stress-induced hepatocarcinogenic genes for molecular target treatment

研究代表者

坪田 昭人(Tsubota, Akihito)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90322643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肝発癌は様々な原因の持続的肝傷害に関連し、異なる発癌過程を経る。共通の病因は酸化ストレスへの持続的曝露であり、酸化ストレス誘導性遺伝子群に最も共通して関与する肝腫瘍原性遺伝子があり得る。IQGAP1のノックダウンは遊走能・浸潤能が低下する細胞株としない細胞株があり、高発現株はより低分化で遊走能・浸潤能が高く、IQGAP1の関与が強かった。Vimentinも異なる細胞株で中心的役割を果たしており、遊走能・浸潤能の低下には違った遺伝子をノックダウンする必要がある。また腫瘍促進性のIQGAP1が腫瘍抑制的に作用することもあり、細胞依存性やマイクロRNA依存性に両面の性質をもつ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Persistent liver injury caused by various etiology is involved in hepatocarcinogenesis, which develops through different pathways. Since the most common pathogenesis is persistent exposure to oxidative stress, oxidative stress-induced gene could be one of the most basic hepatocarcinogenic genes. IQGAP1 knockdown resulted in reduced activities of migration and invasion in some hepatoma cell lines, but not in others. Cells with high IQGAP1 expression levels were poorly-differentiated carcinomas with high migration/invasion activities. These cell properties were closely related to IQGAP1. Vimentin also played a critical role in the properties of some cell lines, indicating that knockdown of genes specific to each cancer cell is required to reduce the migration and invasion activities. Furthermore, IQGAP1 with a tumor promotion activity could have an inhibitory activity against tumor growth, suggesting that IQGAP1 has conflicting properties in a cell- and/or microRNA-dependent manner.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝発癌 酸化ストレス 肝腫瘍原性遺伝子 網羅的遺伝子発現解析 mRNA microRNA siRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) マイクロアレイ等の技術革新・進歩により肝腫瘍部の発現遺伝子群が多数報告され、膨大に登録されている。多くは腫瘍/非腫瘍の単純な相対対比で、腫瘍進展後の結果が発癌の原因がわからない。どれがより重要か、肝癌に特異的かは明らかではない。

(2) 原発性肝癌は、前癌病変を経て多段階的に発癌し、病理組織学的、分子生物学的に多様性を示す。患者背景、病因、癌の分化度、組織学的混在等の種々の相違で発現遺伝子も異なる。発現遺伝子による分類と病理組織学的分類の対比、発癌に至る共通及び病因特異的なパスウェイの解明が急務である。

(3) 解析プログラムの駆使で遺伝子制御ネットワークが呈示されてきたが、どの遺伝子を標的にすべきか絞り込めず、分子標的治療にまで至っていない。個々の遺伝子に関しては、報告・データベース間で発現水準や遺伝子群での位置付けに共通性は低い。より根幹的で共通性の高い病態・病因において発現する特性遺伝子を探索することが、分子標的治療への応用へ繋がると考えられる。その点において我々は持続的な酸化ストレス状態から誘導される発現遺伝子に注目した。

2. 研究の目的

肝癌において膨大な数の発現遺伝子が報告されているが、それらが発癌の原因なのか結果なのかは明らかでない。持続的な酸化ストレスへの曝露で誘導される遺伝子は、多段階的で多様性のある肝発癌において共通性の高い根幹的な肝腫瘍原性遺伝子であると考えられる。本研究の目的は、我々が報告してきた酸化ストレス誘導性の肝腫瘍原性遺伝子：特に IQGAP1 と vimentin を機能解析することであり、発癌機序の解明と分子標的治療の研究になる。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝癌細胞株における IQGAP1/vimentin の発現状況：IQGAP1, vimentin, CTGF, E-cadherin, β -catenin の mRNA/蛋白を高発現あるいは低発現している肝癌細胞株を検討する。

肝癌細胞株:HepG2, SK-Hep, Hep3B, HuH-7, SNU系等(1×10^5 /mL, 10 mL)を培養後、RNA抽出、逆転写酵素による cDNA 化と real-time PCR 法で定量する。また、上記の遺伝子発現蛋白の Western blot 解析を行う。

(2) siRNA による IQGAP1/vimentin の knock-down で生じる細胞機能変化：IQGAP1 に関しては migration/invasion の機能変化を検討する。vimentin は migration/invasion の機能変化に加えて EMT MET 現象の有無を検討した。

効率的に knockdown する siRNA の作製：IQGAP1/vimentin が高発現している細胞株に Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) を用いて transfection する。siRNA は各々3種類設計(Ambion)する。0~50 nM の範囲で、IQGAP1/vimentin の mRNA レベルと蛋白レベル

の変化で knockdown 状況を見る。

Migration assay/Invasion assay : xCELL-igence DP system-Cell Migration/Invasion Assay (Roche) を用いて細胞の migration 活性/invasion 活性を cell index で測定する。Bottom Chamber の各 well に上記で決定した至適濃度範囲の siRNA を transfection させる。

Vimentin の knockdown による EMT MET 現象 : Vimentin を knockdown すれば、EMT 現象からその逆方向の MET 現象がおきるであろうとの仮定のもとに epithelial markers を調べる。Epithelial markers は E-cadherin, β -catenin を、mesenchymal markers は fibronectin, N-cadherin, vimentin, α -SMA である。

(3) siRNA/shRNA による IQGAP1/vimentin の knockdown で生じる細胞内 microRNA /mRNA の変化 : Knockdown 細胞と非 knockdown 細胞の遺伝子発現を比較することで、IQGAP1/vimentin が他の遺伝子[microRNA(miRNA)を含む]と関連しているかを解析する。この解析により IQGAP1/vimentin の新たな機能や調整機構、また gene regulatory network での位置付けが明らかになると考えられる。

miRNA array による細胞内 miRNA の発現 profiling: 未処理の細胞と siRNA で IQGAP1/vimentin を knockdown した細胞から MirVana miRNA isolation kit を用いて total RNA を抽出する。miRNA の網羅的発現の測定は、miRCURY LNA microRNA Array (Exiqon) を使用する。

miRNA の real time PCR による定量: Total RNA を miRNA-specific reverse transcription primers (Applied Biosystems) 等により RT する。RT 産物を miRNA-specific TaqMan probes & primers を用い real-time PCR で定量する。

Putative miRNA targets の in silico 予想 : 上記で有意に変化が認められた miRNA の標的遺伝子を computer program を用いて予測する。

細胞内 mRNA の発現 profiling : 上記の結果をもとに mRNA の発現を調べる。RNA 抽出は上記に準じ、array は GeneChip (Affymetrix) を用いる。

(4) 抗癌剤の感受性変化 : 上記の未処理の細胞株と siRNA で IQGAP1/vimentin を knock-down した細胞株に対して抗癌剤の感受性を比較する。試験する抗癌剤は CDDP, 5-FU, MMC, Epi-ADM である。評価方法は、Cell proliferation assay, Colony formation assay と MTT assay による。

(5) Nude rat を用いた in vivo xenograft model 実験 : siRNA で IQGAP1/vimentin を knockdown した細胞 5×10^4 - 1×10^5 を 5-7 週令の雌 athymic nude rat (F344/N, CLEA Japan) に皮下移植する。その腫瘍の成長状況、腫瘍マーカーや病理組織を時系列にモニタリングする。

4. 研究成果

(1) HepG2/Hep3B/Huh7 では E-cadherin の発

現 mRNA/蛋白ともに高かったが、SK-Hep, SNU398, SNU449 ではほとんど発現していなかった。一方、IQGAP1/vimentin は後者の細胞株群で mRNA/蛋白が高発現していたが、前者の細胞株群では低発現であった。このことより種々の肝癌細胞株間でも E-cadherin や IQGAP1/vimentin の発現に大きな差異があることが明らかになった。

(2) IQGAP1 の siRNA による knockdown で遊走能/浸潤能(48 hr 後, 72 hr 後)が最も低下した肝癌細胞株は SK-Hep であった。また vimentin の siRNA による knockdown で最も低下した肝癌細胞株は SNU-398 であり、遊走能/浸潤能も低下していた。しかし、IQGAP1 knockdown ほど遊走能/浸潤能低下は認められなかった。このことから IQGAP1 は vimentin より強く遊走能/浸潤能に関与していることがわかった。

(3) Vimentin を siRNA で knockdown したが、明らかな EMT MET 現象は認められなかった。このことより EMT/MET 現象は vimentin のみではなく、他の因子も関与していることが示唆された。

(4) 網羅的 miRNA/mRNA 発現解析：非処理の肝癌細胞株 SK-Hep における高発現遺伝子群は cell adhesion, signal transduction, cell proliferation/growth, angiogenesis, inflammation response 等であった。IQGAP1/vimentin の knockdown により特に cell adhesion, cell proliferation/growth 関連遺伝子群の発現低下が著明であった(データ登録中)。しかし IQGAP1 と vimentin 間で相違があり、特に angiogenesis 関連遺伝子群で顕著であった。Vimentin も異なる細胞株で中心的役割を果たしており、遊走能・浸潤能の低下には違った遺伝子を knockdown する必要があると考えられた。miRNA に関しても興味深い変化が認められ(データ登録中) insilico での mRNA-miRNA 間相互検索によりいくつかの miRNA が絞られた。Luciferase assay, mRNA/miRNA overexpression, miRNA inhibition 等で mRNA-miRNA の関連が明らかになった。驚くことに SK-Hep では miRNA 低下による IQGAP1 発現上昇が遊走能/浸潤能の低下につながった所見がみられた(投稿中)。

(5) IQGAP1/vimentin を knockdown した細胞株では全般的に抗癌剤の感受性が増加する傾向がみられた。ただし有意差が認められた抗癌剤、細胞株は一部であった(投稿中)。

(6) Nude rat への肝癌細胞(SK-Hep)皮下移植では、移植後6週間の移植片重量は非処理 > vimentin knockdown > IQGAP1 knockdown の順であった。他の肝癌細胞株に関しては現在実験を追加中である。

多様で多段階的に発生する肝癌を、背景が異なるヒトを対象に時系列の遺伝子解析を行うことは困難である。また前癌状態 高/中/低分化癌と進行する過程でも発現遺伝子は変化する。報告・登録されている多くは肝切除組織を対象にし、進行性肝癌や治療抵抗性肝癌の遺伝子研究は困難である。発癌-炎

症-酸化ストレスは密接に関連しており、肝発癌を自発的に惹起する酸化ストレス動物モデルを用いた時系列の網羅的遺伝子発現解析では、IQGAP1, vimentin がより直接的に酸化ストレスが誘導した腫瘍原性遺伝子と考えられた(Tsubota, 2010)。Validation は相対的に進行した肝癌切除例 128 例(非公表)やデータベースで行っている。

本研究結果は、効率的に病態を改善する分子標的治療への応用や肝発癌の治療や予防の新たなアプローチ(例えば腫瘍マーカーや予後予測指標として)を模索する次への研究にも発展する可能性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 34 件:すべて査読あり)

1. Kondo C, Tsubota A, (他 11 名). Safety and ... chronic hepatitis C. Intern Med 2015;54:119-26. doi:10.2169/internal medicine.54.3066.
2. Abe H, Tsubota A, (他 11 名). Factors...IL28B minor genotype. Hepatol Res 2015;45:387-96. doi: 10.1111/hepr.12360.
3. Masaki N, Tsubota A, (8 番目, 他 13 名). Pre-treatment... hepatitis C. J Gastroenterol Hepatol. 2014;29:1996-2005. doi:10.1111/jgh.12646.
4. Atsukawa M, Tsubota A, (他 8 名). Serum 25 (OH)D3...hepatitis C. Dig Liver Dis. 2014;46:738-43. doi: 10.1016/j.dld.2014.05.004.
5. Abe H, Tsubota A, (他 11 名). Predictors of response...C patients. Gastroenterol Res Pract. 2014;2014:549709. doi:10.1155/2014/549709.
6. Furihata T, Matsumoto S, Tsubota A, (他 4 名). Different interaction...polypeptides. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58:4555-64. doi: 10.1128/AAC.02724-14.
7. Nakagawa A, Atsukawa M, Tsubota A, (他 13 名). Relationship between HCV...triple therapy. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2014; 26:1329-34. doi: 10.1097/MEG.0000000000000228.
8. Tsubota A, Mogushi K, (他 7 名). Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p...hepatitis C. PLoS One 2014;9:e97078. doi: 10.1371/journal.pone.0097078.eCollection 2014.
9. Atsukawa M, Tsubota A, (他 12 名). Effect of fluvastatin...hepatitis C. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2014;26:781-7. doi: 10.1097/MEG.000000000000105.
10. Shimada N, Tsubota A, (他 13 名). A 48-week telaprevir...: A multicenter study. Hepatol Res 2014;44: E386-96. doi: 10.1111/hepr.12323.
11. Atsukawa M, Tsubota A, (他 11 名). Serum 25-hydroxyvitamin D3...viral load. Hepatol Res 2014;44:1277-85. doi: 10.1111/hepr.12298.
12. Shimada N, Toyoda H, Tsubota A, (他 7 名). Baseline factors...multicenter study. J Gastroenterol. 2014;49:1485-94. doi: 10.1007/s00535-013-0918-7.
13. Tsubota A, Shimada N, (他 7 名). Impact of IL28B...genotype 1b. J Gastroenterol Hepatol. 2014;29:144-50. doi: 10.1111/jgh.12402.

14. Shimada N, Tsubota A, (他 8 名). α -Feto-protein is... minor genotype. *J Med Virol*. 2014;86:461-72. doi: 10.1002/jmv. 23824.
 15. Ito K, (他 21 名); Japanese AHB Study Group (Appendix; Tsubota A). Risk factors...Japanese adults. *Hepatology*. 2014;59:89-97. doi: 10.1002/hep.26635.
 16. Nagatsuma K, Tsubota A, (12 番目, 他 14 名). Hepatic stellate...human viral hepatitis. *Liver Int*. 2014; 34:243-52. doi: 10.1111/liv.12255.
 17. Atsukawa M, Tsubota A, (他 12 名). Efficacy of alfacalcidol...pilot study. *Hepat Mon*. 2013;13:e14872. doi:0.5812/hepatmon.14872. eCollection 2013.
 18. Tsubota A, Furihata T, (他 2 名). Sustained and rapid...trials. *Clinical Investigation*. 2013;3:1083-93. doi: 10.4155/cli.13. 98
 19. Aizawa Y, Shimada N, Tsubota A, (last, 他 6 名). Serum lipoprotein...infection. *Hepat Mon*. 2013;13:e8988. doi: 10.5812/ hepatmon. 8988. eCollection 2013 May.
 20. Yoshizawa K, Abe H, Tsubota A, (6 番目, 他 5 名). Serum apolipoprotein...1b. *J Med Virol*. 2013;85: 1180-90. doi: 10. 1002/jmv.23597.
 21. Abe H, Aida Y, Tsubota A, (12 番目, 他 10 名) New proposal...infection. *J Med Virol*. 2013;85: 1523-33. doi: 10.1002/jmv. 23626.
 22. Kanda T, Kato K, Tsubota A, (他 11 名). Platelet count...treatment. *World J Hepatol*. 2013;5:182-8. doi: 10.4254/wjh. v5.i4.182.
 23. Kanda T, Nakamoto S, Tsubota A, (5 番目, 他 12 名). Peginterferon alfa-2a... therapy. *Int J Med Sci* 2013;10:43-9. doi:10.7150/ijms.5358.
 24. Itokawa N, Atsukawa M, Tsubota A, (他 11 名). Lead-in...minor genotype. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:443-9. doi:10.1111/jgh. 12039.
 25. Atsukawa M, Tsubota A, Kondo C, (他 10 名). Combination of fluvastatin...1b. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:51-6. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07267.x.
 26. Tsubota A, Shimada N, (他 10 名). Several factors...C. *World J Gastroenterol* 2012;18: 5879-88. doi: 10.3748/wjg.v18.i41. 5879.
 27. Kondo C, Atsukawa M, Tsubota A, (他 9 名). An open...fluvastatin. *J Viral Hepat* 2012;19: 615-22. doi:10.1111/j.1365-2893.2011.01584.x
 28. Iikura M, Furihata T, Tsubota A, (7 番目, 他 5 名). ENT1, a ribavirin...cell system. *Anti-microb Agents Chemother* 2012;56:1407-13. doi: 10.1128/AAC.057 62-11.
 29. Tsubota A, Shimada N, Yoshizawa K, (他 10 名). Contribution of ribavirin...patients. *Liver Int* 2012;32:826-36. doi: 10.1111/j. 1478-323 1.2011.02727.x.
 30. Aizawa Y, Yoshizawa K, Tsubota A, (last, 他 3 名). Genotype rs8099917...C. *Mol Cell Biochem* 2012;360:9-14. doi:10.1007/s11010-011-1037-5.
 31. Kanda T, Imazeki F, Tsubota A, (10 番目, 他 14 名). Occurrence of hepatocellular patients. *Oncology*. 2011;80:366-72. doi: 10.1159/00033 0549.
 32. Fujise K, Tatsuzawa K, Tsubota A, (5 番目, 他 6 名). A mutation...hepatitis. *World J Hepatol* 2011;3:56-60. doi: 10.4254/wjh. v3.i2.56.
 33. Aizawa M, Tsubota A, Fujise K, (他 4 名). Clinical course...B patients. *J Med Virol* 2011;83: 953-61. doi: 10.1002/jmv.22025.
 34. Tsubota A, Fujise K, Tada N. Peginterferon...infection. *World J Gastroenterol* 2011;17:1-14. doi: 10.3748/wjg.v17.i4.419.
- 〔学会発表〕(計 49 件)
1. 坪田昭人. Bovine lactoferrin の酸化ストレス状態に... 第 4 回臨床ラクトフェリンシンポジウム 2014.4.9 昭和大学-旗の台キャンパス(東京都品川区).
 2. 島田紀朋, 他 7 名 (坪田昭人: 6 番目). TVR3 剤併用療法... 第 100 回日本消化器病学会総会 2014.4.24 東京国際フォーラム(東京都千代田区).
 3. 近藤千紗, 他 15 名 (坪田昭人: 13 番目). IL28B minor genotype... (同上).
 4. 中川 愛, 他 16 名 (坪田昭人: 13 番目). 代償性肝硬変に対する... (同上).
 5. 糸川典夫, 他 11 名 (坪田昭人: 3 番目). C 型慢性肝炎 IL28B... (同上).
 6. 安部 宏, 他 6 名 (坪田昭人: 5 番目). C 型慢性肝炎 Naive... (同上).
 7. 中川 愛, 他 15 名 (坪田昭人: 14 番目). C 型慢性肝炎に... 第 50 回日本肝臓学会総会 2014.5.29 ホテルニューオータニ(東京都千代田区).
 8. 島田紀朋, 厚川正則, 坪田昭人. Non-responder に... (同上).
 9. 近藤千紗, 他 15 名 (坪田昭人: 14 番目). Peg-IFN/ribavirin/telaprevir... (同上).
 10. 神田達郎, 他 9 名 (坪田昭人: 9 番目). B 型慢性肝炎に... (同上).
 11. 安部 宏, 他 9 名 (坪田昭人: 4 番目). C 型慢性肝炎に... (同上).
 12. 新井泰央, 他 11 名 (坪田昭人: 9 番目). C 型慢性肝炎における血清 25(OH)D3 濃度... 第 18 回日本肝臓学会大会 2014.10.23 神戸国際展示場・ポートピアホテル・神戸国際会議場(兵庫県神戸市).
 13. 安部 宏, 他 8 名 (坪田昭人: 4 番目). Telaprevir3 剤療法を... (同上).
 14. 厚川正則, 他 9 名 (坪田昭人: 8 番目). Simeprevir3 剤併用療法... (同上).
 15. 安部 宏, 他 11 名 (坪田昭人: 11 番目). Response-guided.. 第 40 回日本肝臓学会東部会 2014.11.27 京王プラザ(東京都新宿区).
 16. 中川 愛, 他 15 名 (坪田昭人: 14 番目). 我

- が国における... (同上).
17. 加藤慶三, 他7名 (坪田昭人: 6番目). B型急性肝炎の genotype 別の臨床... 第99回日本消化器病学会総会 2013.3.21-23(鹿児島).
 18. 加藤慶三, 他7名 (坪田昭人: 6番目). RFA の治療支援として... (同上).
 19. 近藤千紗, 他10名 (坪田昭人: 8番目). 血小板低値の... (同上).
 20. 中川 愛, 他12名 (坪田昭人: 4番目). C型慢性肝炎に対する... (同上).
 21. 糸川典夫, 他13名 (坪田昭人: 3番目). IL28B minor genotype の (同上).
 22. 厚川正則, 坪田昭人, 他10名. 高齢 C 型慢性肝炎に対する VitaminD... (同上).
 23. Takaguchi, 他10名 (Tsubota A : 9番目). EASL The International Liver Congress 2013, 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, 2013.4 (Amsterdam, Netherlands).
 24. 安部 宏, 他11名 (坪田昭人: 11番目). IL28B ゲノ... 第49回日本肝臓学会総会 2013.6.6 京王プラザホテル(東京都新宿区).
 25. 加藤慶三, RGT 研究会(坪田昭人). 早期ウイルス動態... (同上).
 26. 島田紀朋, 他10名 (坪田昭人: 3番目). TVR3 剤併用... (同上).
 27. 中川 愛, 他12名 (坪田昭人: 4番目). C型慢性肝炎に... (同上).
 28. 近藤千紗, 他14名 (坪田昭人: 4番目). 血小板数低値の... (同上).
 29. 石黒晴哉, 他8名 (坪田昭人: 8番目). C型慢性肝炎 Genotype2... (同上).
 30. 神田達郎, 他12名 (坪田昭人: 12番目). B型慢性肝炎に対する... (同上).
 31. 加藤慶三, 他8名 (坪田昭人: 5番目). 早期ウイルス動態からの... 第17回日本肝臓学会大会 2013.10.9 グランドホテル高輪・新高輪 (東京都港区).
 32. 厚川正則, 他11名 (坪田昭人: 3番目). 脾腫を伴う... (同上).
 33. 相澤良夫, 他6名 (坪田昭人: last). 血清アポリポプロテイン E... (同上).
 34. 中川 愛, 他12名 (坪田昭人: 4番目). C型慢性肝炎に... (同上).
 35. Ide T, 他8名 (Tsubota A : 8番目). IL28B gene and very early viral kinetics ...high viral load. The Liver Meeting, The 64th Annual Meeting of the AASLD 2013. 2013.11.1-5 (Washington, DC, USA).
 36. 島田紀朋, 坪田昭人, 相澤良夫. C型慢性肝炎の新たな治療展開... 第98回日本消化器病学会総会 2012.4 (東京).
 37. Atsukawa M, Tsubota A, 他11名. Combination of fluvastatin with...1b. The 47th EASL: The International Liver Congress, 2012.4 (Barcelona, Spain).
 38. 厚川正則, 他11名 (坪田昭人: 2番目). 高齢者肝疾患診療の新展開... 第15回日本高齢消化器病学会 2012.6 (青森).
 39. 厚川正則, 他12名 (坪田昭人: 2番目). 高齢 C 型慢性肝炎に対する Vitamin... 第48回日本肝臓学会総会 2012.6 (石川).
 40. 厚川正則, 他12名 (坪田昭人: 2番目). 1型高ウイルス量... (同上).
 41. 加藤慶三, 井家麻紀子, 島田紀朋, 坪田昭人. Genotype 2型... Therapy の成績. 第54回日本消化器病学会大会 2012.10 (神戸).
 42. 島田紀朋, 他8名 (坪田昭人: 3番目). C型慢性肝炎に... (同上).
 43. 神田達郎, 他9名 (坪田昭人: 4番目). 開始前ヘモグロビン値... (同上).
 44. 熊田 卓, 他6名 (坪田昭人: 6番目). TVR 3 剤併用治療... (同上).
 45. Masaki N, 他8名 (Tsubota A : 5番目). Prospective multi-center... ribavirin therapy. The 10th JSH Single Topic Conference, 2012.11 (Tokyo, Japan).
 46. 厚川正則, 他9名 (坪田昭人: 2番目). C型慢性肝炎に対する PEG-IFN... 第39回日本肝臓学会東部会 2012.12 (東京).
 47. 近藤千紗, 他11名 (坪田昭人: 3番目). 血小板低値の... (同上).
 48. 石黒晴哉, 他9名 (坪田昭人: 9番目). G2CHC に対する併用... (同上).
 49. 糸川典夫, 他11名 (坪田昭人: 3番目). 1型高ウイルス量... (同上).
- 〔図書〕(計 2 件)
1. Aizawa Y, Abe H, Yoshizawa K, Ishiguro H, Aida Y, Shimada N, Tsubota A. InTech: Dyslipoproteinemia in Chronic HCV Infection. 2012. Chapter 30: 701-718.
 2. Tsubota A, Koyama T, Tada N, Takahashi H. InTech: Management of Gastric Cancer. 2011. Chapter 4: 55-70.
6. 研究組織
- (1)研究代表者
坪田 昭人 (TSUBOTA Akihito)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 90322643
 - (2)連携研究者
茂櫛 薫 (MOGUSHI Kaoru)
順天堂大学・医学(系)研究科・助教
研究者番号 : 60569292