

(5) MAGEH1 と β カテニンの変異との関連の検討

(3) の検討で Class 2 で選択された遺伝子のうち MAGEH1 は FDR が 0 と極めて強い関連が見られた。そこで β カテニンの変異を反映する Glutamine synthetase (GS) の癌部での発現を免疫染色で検討し、非癌部 MAGEH1 の発現との関連を検討した。結果、図 3 に示すように癌部 GS の高発現群と非高発現群の間では非癌部 MAGEH1 の発現に有意差が見られた。

(6) 非癌部遺伝子発現による癌部サブクラスの予測モデルの構築の試み

次いで非癌部遺伝子発現パターンによるサブクラスの予測を試みた。個々の症例の非癌部遺伝子発現パターンとサブクラスの情報から PAM による予測モデルを構築、予測性能の検証を Cross-validation で行った。モデルに用いた遺伝子の数と予測エラーの関係から、52 の遺伝子を用いたモデルが最も良いと思われた。しかし図 4 に示すように、モデルの予測性能はいいとは言えず、特に Class2 の予測はきわめて不正確であった。

D. 考察

本研究ではこれまでの報告をもとに、HCV 関連 HCC を 3 つのサブクラスに分類している。過去の報告では Class 1 はチロシンキナーゼの活性化、p53 の変異、AKT の活性化などを介して細胞の異常増殖が起こっている特徴を有しており、AFP の高値、低分化度で大きい腫瘍が多く、予後不良な例が含まれるとされている。

Class 2 は β -カテニンの変異、WNT シグナルの活性化が関与しており、高分化で腫瘍径は比較的小さいとされている。

今回対象症例の分類に当たっては、過去に報告されているデータを Training data として用いているが、人種もアレイのプラットフォームも異なるデータを用いることにより起こるバイアスが懸念される。しかしながら Centering と Scaling をかけることで 2 つのデータの均一化を図ることで、図 4 に示すようにこの問題は解決されている。また Boyault らのデータによる分類と Chiang らのデータによる分類が近似したものになったことはこの分類方法の信頼性の裏付けとなると考えられた。

サブクラスの非癌部遺伝子発現の比較では Class 1 では 1855 の遺伝子が有意であったが、中でも COL4A6 や LOX といった線維化関連の遺伝子が上位にランクされていた。このサブクラスに分類された症例はすべて F3 以上の線維化が起こっており、Hypergeometric test の結果と合わせると線維化と炎症がこのサブクラスの特徴である可能性が示唆された。

Class 2 では MAGEH1 の低発現ときわめて強い関連が示唆され、この遺伝子と β -カテニンの変異との関連に関し、さらなる検討を要すると思われた。選択された遺伝子の数が 12 と少ないため Hypergeometric test の結果の信頼性に疑問が残るが、MAGEH1 は PTPRH、XAF1 とともにアポトーシス関連のカテゴリーに分類され、アポトーシスと β -カテニンの変異との間にも何らかの関連があるという可能性も示唆された。

E. 結論

Class 1 の非癌部では線維化、炎症に関連する遺伝子が有意に発現していた。

Class 2 の非癌部ではアポトーシスに関連する遺伝子が特徴的に発現していた。これらの結果を踏まえて、さらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産の出願・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

【参考文献】

- ① Boyault S, et al: Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007 Jan;45(1):42-52
- ② Chiang D, et al: Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008 Aug 15;68(16):6779-88.
- ③ Hoshida Y, et al: Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2009 Sep 15;69(18):7385-92. Epub 2009 Sep 1.

図3. MAGEH1 と β カテニンの変異との関連

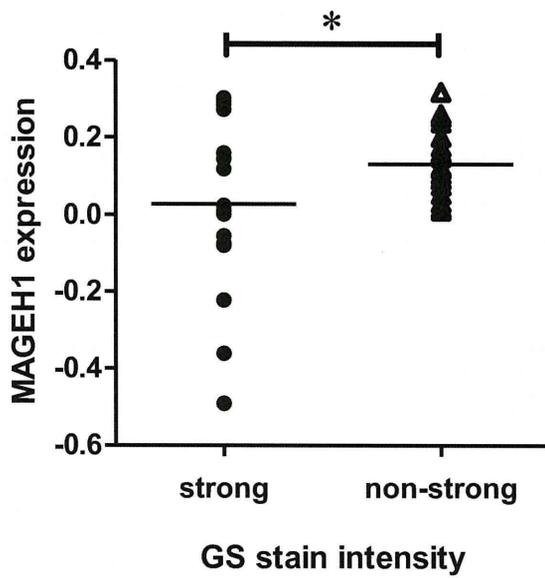


図4. 非癌部遺伝子発現による癌部サブクラス予測

	1	2	3	class.error
1	9	0	3	0.25
2	5	1	6	0.92
3	5	1	10	0.38

表 1. Class 1 の非癌部に特徴的な遺伝子 (FDR<0.05 であった上位 23 の遺伝子を示す)

Gene ID	Symbol	Name	Score(d)	q-value(%)	p-value
A_23_P217379	COL4A6	collagen, type IV, alpha 6	3.5	0	0.0001
A_23_P24129	DKK1	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	4.28	0	0.0000
A_24_P148811	RUVBL1	RuvB-like 1 (E. coli)	3.42	0	0.0001
A_24_P33429			3.33	0	0.0002
A_32_P199551	C3orf57	chromosome 3 open reading frame 57	3.76	0	0.0001
A_23_P122216	LOX	lysyl oxidase	3.02	2.31	0.0005
A_23_P161563	RAB38	RAB38, member RAS oncogene family	3.14	2.31	0.0003
A_23_P205746	EML1	echinoderm microtubule associated protein like 1	3.2	2.31	0.0003
A_23_P339098	SLC35F2	solute carrier family 35, member F2	3.19	2.31	0.0003
A_23_P59022	TRERF1	transcriptional regulating factor 1	3.26	2.31	0.0002
A_23_P83134	GAS1	growth arrest-specific 1	3.01	2.31	0.0005
A_24_P109854	ZNF468	zinc finger protein 468	3.01	2.31	0.0005
A_24_P360206	PCDHA11	protocadherin alpha 11	3.01	2.31	0.0005
A_24_P398147	NEBL	nebullette	3.19	2.31	0.0003
A_24_P400970			3.26	2.31	0.0002
A_24_P68088	TCAM1	testicular cell adhesion molecule 1 homolog (mouse)	3.07	2.31	0.0004
A_32_P497742	GPR161	G protein-coupled receptor 161	3.14	2.31	0.0003
A_23_P138435	ZMIZ1	zinc finger, MIZ-type containing 1	2.9	3.2	0.0007
A_23_P213678	PAM	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	2.99	3.2	0.0005
A_23_P417282	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	2.99	3.2	0.0005
A_23_P429491	C11orf82	chromosome 11 open reading frame 82	2.89	3.2	0.0007
A_23_P500464	COL2A1	collagen, type II, alpha 1	2.93	3.2	0.0007
A_23_P72387			2.9	3.2	0.0007

表 2. Class 2 の非癌部に特徴的な遺伝子

Gene ID	Symbol	Name	Score(d)	q-value(%)	p-value
A_23_P34144	MAGEH1	melanoma antigen family H, 1	-2.87	0	0.0001
A_23_P101642	PTPRH	protein tyrosine phosphatase, receptor type, H	2.46	21.69	0.0006
A_23_P163666	WFIKKN1	WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 1	2.38	21.69	0.0009
A_23_P27649	ZNF433	zinc finger protein 433	2.07	26.4	0.0032
A_23_P421423	TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	2.01	26.4	0.0041
A_23_P4283	XAF1	XIAP associated factor 1	2.07	26.4	0.0032
A_23_P4286	XAF1	XIAP associated factor 1	2.06	26.4	0.0033
A_23_P501451	GIYD1	GIY-YIG domain containing 1	2.06	26.4	0.0033
A_24_P220454	CUX1	cut-like homeobox 1	2.17	26.4	0.0021
A_24_P261929	IFI27L1	interferon, alpha-inducible protein 27-like 1	2.02	26.4	0.0038
A_32_P16975	ANKS3	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 3	2.14	26.4	0.0023
A_32_P64668			2.1	26.4	0.0028

表 3. Class 3 の非癌部に特徴的な遺伝子 (FDR<0.1 であった上位 36 の遺伝子を示す)

Gene ID	Symbol	Name	Score(d)	q-value(%)	p-value
A_24_P659836			3.24	1.56	0.0003
A_23_P152235	IRX3	iroquois homeobox 3	-3.04	3.43	0.0005
A_23_P256107	HPSE	heparanase	2.75	3.43	0.0014
A_23_P47691	TRIM21	tripartite motif-containing 21	2.94	3.43	0.0007
A_23_P99642	SLC7A7	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7	2.67	3.43	0.0018
A_24_P315862			2.92	3.43	0.0008
A_23_P139575	PRR13	proline rich 13	2.5	5.55	0.0033
A_23_P142075	ACP5	acid phosphatase 5, tartrate resistant	2.35	5.55	0.0054
A_23_P209527			-2.52	5.55	0.0031
A_23_P329261	KCNJ2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	2.55	5.55	0.0028
A_23_P82324	CARD11	caspase recruitment domain family, member 11	2.38	5.55	0.0050
A_24_P261929	IFI27L1	interferon, alpha-inducible protein 27-like 1	-2.55	5.55	0.0028
A_24_P270460	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	2.37	5.55	0.0052
A_24_P341882	TESK1	testis-specific kinase 1	-2.52	5.55	0.0031
A_24_P490109			2.33	5.55	0.0058
A_24_P941912	DTX3L	deltex 3-like (Drosophila)	2.49	5.55	0.0034
A_32_P162443			-2.45	5.55	0.0040
A_32_P56249			2.33	5.55	0.0058
A_23_P101950	MDH1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	2.22	8.54	0.0084
A_23_P140277	SYNE2	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	-2.15	8.54	0.0105
A_23_P209394	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	2.19	8.54	0.0093
A_23_P39840	VAMP5	vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)	2.07	8.54	0.0136
A_23_P75769	MS4A4A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	2.12	8.54	0.0115
A_23_P79545	SUCLG1	succinate-CoA ligase, alpha subunit	2.27	8.54	0.0071
A_23_P80162	TMPRSS3	transmembrane protease, serine 3	-2.13	8.54	0.0111
A_24_P212024			2.21	8.54	0.0088
A_24_P219785	CALM3	calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)	2.28	8.54	0.0069
A_24_P31527	MBD3	methyl-CpG binding domain protein 3	-2.44	8.54	0.0040
A_24_P333525	RABGAP1L	RAB GTPase activating protein 1-like	2.1	8.54	0.0122
A_24_P345866			2.07	8.54	0.0135
A_24_P382319	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)	2.28	8.54	0.0068
A_24_P45446	GBP4	guanylate binding protein 4	2.08	8.54	0.0131
A_24_P50245	HLA-DMA	major histocompatibility complex, class II, DM alpha	2.23	8.54	0.0081
A_24_P511686			2.27	8.54	0.0072
A_32_P148122	IGKC	immunoglobulin kappa constant	2.25	8.54	0.0075
A_32_P48086			-2.36	8.54	0.0053

表 4. Class 1 の非癌部に特徴的な遺伝子に関連する GO カテゴリー (上位 20 のカテゴリーを示す)

GOBPID	GO.term	OddsRatio	ExpCount	Count	Size	P.value	Q.value
GO:0002541	activation of plasma proteins involved in acute inflammatory response	21.94	3.19	23	33	1.34E-16	3.38E-13
GO:0009611	response to wounding	2.95	38.92	92	402	1.12E-15	1.41E-12
GO:0009605	response to external stimulus	2.42	62.93	126	650	4.67E-15	3.92E-12
GO:0006956	complement activation	19.99	3.00	21	31	7.17E-15	4.51E-12
GO:0002526	acute inflammatory response	7.68	6.97	32	72	1.40E-14	7.05E-12
GO:0055114	oxidation reduction	2.56	48.31	102	499	7.81E-14	3.28E-11
GO:0006082	organic acid metabolic process	2.47	45.50	94	470	3.05E-12	1.10E-09
GO:0006959	humoral immune response	7.17	6.10	27	63	4.77E-12	1.50E-09
GO:0006954	inflammatory response	3.15	23.33	59	241	1.01E-11	2.82E-09
GO:0008202	steroid metabolic process	3.69	16.46	47	170	1.49E-11	3.74E-09
GO:0002455	humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin	16.12	2.61	17	27	1.67E-11	3.83E-09
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	2.40	45.02	91	465	2.45E-11	4.74E-09
GO:0043436	oxoacid metabolic process	2.40	45.02	91	465	2.45E-11	4.74E-09
GO:0051605	protein maturation by peptide bond cleavage	6.71	6.10	26	63	3.35E-11	6.03E-09
GO:0042180	cellular ketone metabolic process	2.35	46.28	92	478	4.89E-11	7.78E-09
GO:0006958	complement activation, classical pathway	20.28	2.13	15	22	4.95E-11	7.78E-09
GO:0006629	lipid metabolic process	2.12	64.58	117	667	5.30E-11	7.85E-09
GO:0050896	response to stimulus	1.62	215.51	296	2226	1.78E-10	2.49E-08
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	2.51	34.56	73	357	3.33E-10	4.41E-08
GO:0006952	defense response	2.36	39.31	79	406	7.30E-10	9.19E-08

表 5. Class 2 の非癌部に特徴的な遺伝子に関連する GO カテゴリー

SAM_class2 vs class1/3/JC (12 genes with FDR<0.3)								
GOBPID	GO.term	OddsRatio	ExpCount	Count	Size	P.value	Q.value	Genes
GO:0010792	DNA double-strand break processing involved in repair via single-strand annealing	1699.50	0.001	1	2	0.001	0.020	GIYD1
GO:0000729	DNA double-strand break processing	566.39	0.003	1	4	0.003	0.020	GIYD1
GO:0045002	double-strand break repair via single-strand annealing	566.39	0.003	1	4	0.003	0.020	GIYD1
GO:0000738	DNA catabolic process, exonucleolytic	339.77	0.004	1	6	0.004	0.023	GIYD1
GO:0000726	non-recombinational repair	130.58	0.010	1	14	0.010	0.034	GIYD1
GO:0000724	double-strand break repair via homologous recombination	99.81	0.012	1	18	0.012	0.034	GIYD1
GO:0000725	recombinational repair	99.81	0.012	1	18	0.012	0.034	GIYD1
GO:0006891	intra-Golgi vesicle-mediated transport	99.81	0.012	1	18	0.012	0.034	CUX1
GO:0006915	apoptosis	8.13	0.593	3	864	0.016	0.037	MAGEH1,PTPRH,XAF1
GO:0012501	programmed cell death	8.04	0.599	3	873	0.017	0.037	MAGEH1,PTPRH,XAF1
GO:0008219	cell death	7.30	0.654	3	953	0.021	0.040	MAGEH1,PTPRH,XAF1
GO:0016265	death	7.28	0.656	3	956	0.022	0.040	MAGEH1,PTPRH,XAF1

表 6. Class 3 の非癌部に特徴的な遺伝子に関連する GO カテゴリー

GOBPID	GO.term	OddsRatio	ExpCount	Count	Size	P.value	Q.value	Genes
GO:0006955	immune response	4.91	5.23	21	499	3.84E-08	2.56E-05	21 genes
GO:0002376	immune system process	3.44	8.05	23	768	3.45E-06	0.001	23 genes
GO:0050871	positive regulation of B cell activation	24.70	0.26	5	25	5.19E-06	0.001	CARD11,CD27,CD38,CD40,IL7
GO:0030890	positive regulation of B cell proliferation	39.18	0.15	4	14	1.05E-05	0.002	CARD11,CD38,CD40,IL7
GO:0050864	regulation of B cell activation	17.63	0.35	5	33	2.17E-05	0.003	CARD11,CD27,CD38,CD40,IL7
GO:0030888	regulation of B cell proliferation	26.10	0.20	4	19	3.92E-05	0.004	CARD11,CD38,CD40,IL7
GO:0042100	B cell proliferation	18.64	0.26	4	25	0.0001	0.012	CARD11,CD38,CD40,IL7
GO:0032944	regulation of mononuclear cell proliferation	8.79	0.64	5	61	0.0004	0.029	CARD11,CD38,CD40,IL7,TNFRSF14
GO:0050670	regulation of lymphocyte proliferation	8.79	0.64	5	61	0.0004	0.029	CARD11,CD38,CD40,IL7,TNFRSF14
GO:0070663	regulation of leukocyte proliferation	8.79	0.64	5	61	0.0004	0.029	CARD11,CD38,CD40,IL7,TNFRSF14
GO:0006346	methylation-dependent chromatin silencing	96.15	0.04	2	4	0.0006	0.037	DNMT3A,MBD3
GO:0032946	positive regulation of mononuclear cell proliferation	10.85	0.42	4	40	0.0008	0.037	CARD11,CD38,CD40,IL7
GO:0050671	positive regulation of lymphocyte proliferation	10.85	0.42	4	40	0.0008	0.037	CARD11,CD38,CD40,IL7
GO:0070665	positive regulation of leukocyte proliferation	10.85	0.42	4	40	0.0008	0.037	CARD11,CD38,CD40,IL7

In silico screening 法を用いた NS2/3 プロテアーゼ阻害化合物の検索と海洋生物抽出物ライブラリーを用いた抗 HCV 化合物の検索

分担研究者 山下 篤哉 山梨大学大学院・医学工学総合研究部・微生物学

研究要旨

1. In silico screening 法により、57 種の NS2/3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物を選び、HCVレプリコン細胞による抑制効果の検討の結果、1 種類の NS2/3 プロテアーゼ活性阻害剤候補化合物を見出した。
2. NS3 Helicase をターゲットタンパクとし、海洋生物抽出物ライブラリーよりその活性を阻害する物質の検索を行った。その結果、ウミシダ類に属する *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画に、NS3 Helicase および HCV 増殖を阻害する物質が存在することを見出した。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎の治療は、ペグインターフェロンとリバビリンの併用療法の登場により格段に進歩した。今後、STAT-C などの新規治療薬の導入によって、更なる治癒率の上昇が期待されている。その反面、薬剤耐性や副作用という問題は確実に存在し、多種・多様な新たな治療薬の開発は今後も必要である。

そこで、本研究では C 型慢性肝炎新規治療薬の開発の基盤構築をするために、2 つのことに視点を定め、研究を行う。まず、第 1 に、これまで治療薬のターゲットタンパクとして、その報告例のない NS2/3 プロテアーゼに着目し、in silico screening 法を用いて、C 型慢性肝炎治療薬候補化合物の検索を行う。第 2 に、創薬ライブラリーとして海洋生物に着目し、その抽出物より、C 型慢性肝炎治療薬候補化合物の検索を行うものである。本研究期間においては、

HCV NS3 Helicase をターゲットタンパクとして、その検索を行う。

B. 研究方法

I. In silico screening 法を用いた NS2/3 プロテアーゼ阻害化合物の検索

1). レプリコン細胞

サブゲノムレプリコン細胞は、Huh7/ORN3-5B #24 細胞 (O 株)を用いた。フルゲノムレプリコン細胞は、OR6 細胞(O 株)を用いた。

2). HCV 増殖抑制試験

抗 HCV 効果は、検討薬剤をレプリコン細胞の培養液中に添加後、72 時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定することにより行った。

3). 細胞毒性試験

細胞毒性試験は、検討薬剤をレプリコン細胞の培養液中に添加し、72 時間後に、

Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega 社) を用いて検討した。

II. 海洋生物抽出物ライブラリーを用いた抗 HCV 化合物の検索

1). In vitro NS3 Helicase assay

Photoinduced Electron Transfer (PET)法では 5-UAGUACCGCCACCCUCAGAAC-CUUUUUUUUUUUUUUU-3' の 5' 末端に BODIPY FL 結合させ、5-GGUUCUGAGGG UGGCCCUACUA-3' と dsRNA とした後に、リコンビナント NS3 タンパクと capture strand 5'-TAGTACCGCCACCCTCAGAACC-3' と混合し、LightCycler 1.5 (Roche)にて蛍光強度を測定し、NS3 Helicase 活性を測定した

2). NS3 ATPase 活性阻害試験

リコンビナント NS3 タンパク、Poly(U)RNA、³²P-ATP、海洋生物抽出物精製品を混合し、37°C 1 時間の条件で反応後、薄層クロマトグラフィにて展開した。

3). NS3 RNA 結合阻害試験

リコンビナント NS3 タンパク、³²P-21mer RNA、海洋生物抽出物精製品を混合し、室温で 15 分間反応させた後、ポリアクリルアミド電気泳動を行った。

4). レプリコン細胞

サブゲノムレプリコン細胞は、Lunet/Con1 LUN Sb #26 細胞 (Con1 株)、Huh7 Rep Feo 細胞 (N 株)及び Huh7/ORN3-5B #24 細胞 (O 株)を用いた。フルゲノムレプリコン細胞は、OR6 細胞(O 株)を用いた。

5). HCV 増殖抑制試験

I-2)の方法と同様に行った。

6). 細胞毒性試験

I-3)の方法と同様に行った。

C. 研究結果

I. In silico screening 法を用いた NS2/3 プロテアーゼ阻害化合物の検索

1). NS2/3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物の検索

In silico screening 法により、57 種の NS2/3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物を選び、これら化合物の実際の効果について、フルゲノムレプリコン OR6 細胞を用いて検討を行った。検討を行った結果、EC₅₀ の値が 20 μM 以下、Selectivity Index の値が、3以上のものをヒット化合物と定義すると、コードナンバー#6、#25、#44、#47の4つの化合物がヒットした。更に、これらについて、NS2/3 プロテアーゼをコードしていない O 株由来のサブゲノムレプリコン Huh7/ORN3-5B #24 細胞を用いて、抑制効果の有無について検討を行った。その結果、#47が OR6 細胞では、抑制効果が見られ、Huh7/ORN3-5B #24 細胞では、抑制効果が見られなかったことから、#47は NS2/3 プロテアーゼの活性を阻害し、ウイルスの増殖を阻害する可能性が示唆された(I-表1)。

II. 海洋生物抽出物ライブラリーを用いた抗 HCV 化合物の検索

1). 海洋生物抽出物ライブラリーをライブラリーソースとした NS3 Helicase 活性阻害物質のスクリーニング

沖縄近海に生息し、生物学的に分類されている海洋生物の抽出物61サンプルについて、PET 法による in vitro NS3 Helicase assay (II-図1) を用いて、NS3 Helicase の阻害活性を検討した。その結果、海洋抽出物終濃度 25ug/ml として測定した場合、30%以下(% of control)となったサンプル数は5サンプル、30%~60(% of control)となったサンプルは 11 サンプルあった。(II-表2)。その中で、ウミシダ類

に属する *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画 SG1-23-1 に強い NS3 Helicase の阻害活性が見られた (II-表2、図2)。

次に、PET 法とRI法を用いて、SG1-23-1 の濃度依存的に NS3 Helicase の活性を阻害するかについて検討した。その結果、PET 法では、濃度依存的に NS3 Helicase の活性を阻害し、IC₅₀ は 11.7 μ g/ml であった。RI法では、スタート濃度の 16 μ g/ml から阻害活性が見られた (II-図3)。

2). SG1-23-1 の HCV NS3 Helicase 活性阻害機序の解析

HCV NS3 は、ATPを加水分解し(ATPase 活性)、エネルギーを得て、RNA unwinding 活性を持つようになる。そこで、まず、SG1-23-1 が NS3 のATPase 活性を阻害するかについて検討を行った。その結果、ATPase の活性は阻害しなかった (II-図4)。次に、SG1-23-1 が NS3 タンパクと RNA との結合を阻害するかについて検討を行った。その結果、SG1-23-1 はNS3とRNAとの結合を阻害することがわかった (II-図4)。

3). SG1-23-1 の HCV 増殖阻害活性の検討

サブゲノムレプリコン細胞、Lunet/Con1 LUN Sb #26 細胞 (Con1 株)、Huh7 Rep Feo 細胞 (N 株)、Huh7/ORN3-5B #24 細胞 (O 株)および、フルゲノムレプリコン細胞 OR6 細胞(O 株)を用いて、SG1-23-1 の HCV 増殖阻害活性の検討を行った。その結果、いずれのレプリコン細胞においても、HCV 増殖阻害活性が見られ、更に、検討した濃度では、細胞毒性が見られなかった (II-図5)。

D. 考察

I. In silico screening 法を用いた NS2/3 プロテアーゼ阻害化合物の検索

NS2/3 プロテアーゼをターゲットタンパクとして、In silico screening を行い、ヒットした 57 種、フルゲノムレプリコン OR6 細胞を用いて、抗HCV活性の有無について検討を行った。その結果、コードナンバー#6、#25、#44、#47の4つの化合物がヒットした。更に、これらの化合物を O 株由来のサブゲノムレプリコン Huh7/ORN3-5B #24 細胞を用いて、抑制効果の有無について検討を行った。その結果、#47 は、サブゲノムレプリコン細胞において抑制活性が見られなかったことから、この化合物は NS2/3 プロテアーゼの抑制活性を有することが示唆された。また、他の3種の化合物については、サブゲノムレプリコン細胞においても抑制活性が見られたことから、NS2/3 プロテアーゼ阻害以外の作用機序によってHCVの増殖を阻害する可能性が示唆された。今後は、#47 が、NS2/3 プロテアーゼ活性を特異的に抑制するかの再検討を行い、更に、In silico にて、類縁体の検索し、より効果的な化合物を見出す予定である。

II. 抗HCV剤開発における海洋生物抽出物ライブラリーの創薬ライブラリーとしての可能性

本年度は、沖縄近海に生息し、生物学的に分類されている海洋生物の抽出物61サンプルについて、PET法によるin vitro NS3 Helicase assay (II-図1) を用いて、NS3 Helicaseの阻害活性を検討した。その結果、海洋抽出物終濃度25 μ g/mlとして測定した場合、30%以下(% of control)となったサンプル数は5サンプル、30%~60%(% of control)となったサンプルは11サンプルあった。(II-表2)。その中で、ウミンダ類に属する *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画SG1-23-1に強いNS3 Helicaseの阻害活性が見られた (II-表2、図2、図3)。更に、その作用機序をしら

べるため、ATPase活性並びにRNA結合活性を検討したところ、ATPase抑制活性は見られず、RNA結合阻害活性は見られた。次に、SG1-23-1のHCVの増殖抑制活性の有無を検討するため、3つの株のサブゲノムレプリコン細胞、(Con1株、N株およびO株)、1株のフルゲノムレプリコン細胞(O株)を用いて検討を行った。その結果、いずれのレプリコン細胞においても、HCV増殖阻害活性が見られ、更に、検討した濃度では、細胞毒性が見られなかった(II-図5)従って、SG1-23-1のHCV増殖抑制メカニズムは、NS3のRNA結合活性を抑制する結果、NS3 Helicase活性に影響を及ぼし、最終的に、ウイルス増殖を抑制するという機序が考えられる。今後は、この抽出物より分画・精製を行い、抑制化合物の単離を進めていく予定である。

E. 結論

- 1). In silico screening 法により、1 種類の NS2/3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物を見出した。
- 2). 海洋生物 ウミシダ類に属する *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画中に、NS3 Helicase の活性阻害により、HCVのウイルス増殖を抑制する物質が存在することを見出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takaya D, Yamashita A, Kamiyo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S.

A new method for induced fit docking (GENIUS) and its application to virtual

screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors.

Bioorg Med Chem. 2011;19:6892-6905

2. 学会発表

山下 篤哉, 古田 篤史, 田中 淳一, 長浜 夏樹, 秋光 信佳, Kazi Abdus Salam, 谷 英典, 松田 泰嘉, 藤田 統, 藤本 雄介, 池田 正徳, 加藤 宣之, 前川 信哉, 榎本 信幸, 常田 聡, 関口 勇地, 野田 尚宏, 森石 恆司

海洋生物をライブラリーソースとしたHCV NS3 Helicase活性阻害化合物の検索
第21回抗ウイルス療法研究会, 金沢, 平成23年5月

山下 篤哉, 松本 武久, 高谷 大輔, 上條 加寿恵, 前川 伸哉, 坂本 直哉, 池田 正徳, 加藤 宣之, 梅山 秀明, 横山 茂之, 榎本 信幸, 森石 恆司

In silico分子設計手法によるHCV NS3 protease活性阻害化合物の創製
第21回抗ウイルス療法研究会, 金沢, 平成23年5月

古田 篤史, Kazi Abdus Salam, 長浜 夏樹, 秋光 信佳, 田中 淳一, 谷 英典, 山下 篤哉, 森石 恆司, 常田 聡, 関口 勇地, 野田 尚宏

海洋生物抽出物より取得したcholesterol sulfateによるC型肝炎ウイルスNS3 helicase阻害作用
第63回日本生物工学会大会, 東京, 平成23年9月

照沼 修, 後藤 才郎, 黒崎久仁彦, 植田
伸太郎, 王 瀝, Acuna Victor, 杉山 三郎,
山下 篤哉, 黒崎. 直子

メキシコ先住民におけるHBV感染および遺
伝型の分析

第34回日本分子生物学会, 横浜, 平成23年
12月

Kunihiro Kawakami, Hirotake Kasai,
Atsuya Yamashita, Yoshiharu Matsuura,
Masami Kusinoki, Kohji Moriishi
Regulation of HCV replication by
FKBP8-dependent or -independent Hsp90
activity.

第34回日本分子生物学会, 横浜, 平成23年
12月

Kazi Abdus Salam, Atsushi Furuta,
Natsuki Nagahama, Junichi Tanaka, Atsuya
Yamashita, Hidenori Tani, Yuji Sekiguchi,
Satoshi Tsuneda, Kohji Moriishi, Kenichi
Ijiri, Naohiro Noda, Nobuyoshi Akimitsu
Identification and biochemical
characterization of novel hepatitis C
virus NS3 inhibitors, Manoalide and
Psammaplin A.

16th Annual Meeting of the RNA Society,
Kyoto, June 2011

Atsuya Yamashita, Yuusuke Fujimoto,
Kohji Moriishi,
Marine natural products as a source of
the novel antiviral agent targeting to
HCV NS3 helicase.

International Union of Microbiological
Societies 2011 Congress, Sapporo,
September 2011

Yuusuke Fujimoto, Atsuya Yamashita,
Kohji Moriishi

Inhibitory effect of marine natural
products on the replication of hepatitis
C virus.

International Union of Microbiological
Societies 2011 Congress, Sapporo,
September 2011

Junichi Tanaka, Natsuki Nagahama,
Atsushi Furuta, Kazi Abdus Salam,
Nobuyoshi Akimitsu, Hidenori Tani,
Atsuya Yamashita, Kohji Moriishi,
Satoshi Tsuneda, Yuji Sekiguchi, Naohiro
Noda.

Inhibitors against NS3 helicase of
hepatitis C virus from coral reef
invertebrates.

52nd Annual American Society of
Pharmacognosy meeting, San Diego USA,
August 2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

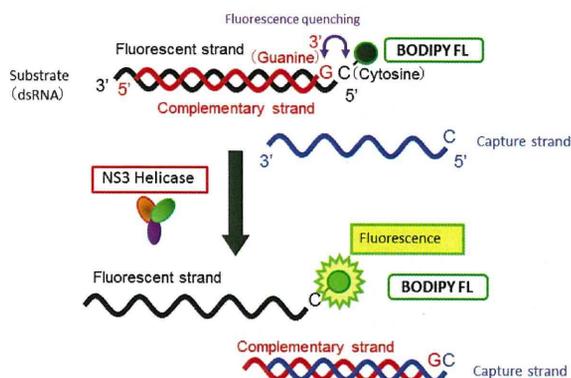
なし

	OR6 (Full genome)			ORN35B (Subgenome)		
	CC50(μM)	EC50(μM)	Selectivity Index	CC50(μM)	EC50(μM)	Selectivity Index
NS23 #6	28.1	2.1	13.3	30.3	1.25>	>24.2
NS23 #25	54.7	18.9	3.0	63.0	27.2	2.3
NS23 #44	58.7	4.1	14.3	>80	4.4	>18.2
NS23 #47	62.6	16.7	3.7	63.8	39.2	1.6

Ⅰ-表1 Full genome replicon 及び Subgenomic replicon における NS23 プロテアーゼ阻害剤候補化合物の抑制効果

Ⅱ-図1

Photoinduced Electron Transfer (PET) 法による NS3 Helicase 活性測定法の概略



Sample code	Helicase activity (% of control)	Species	Sample code	Helicase activity (% of control)	Species
OK-99-2	87	<i>Agelas sp.</i>	OK-99-58	385	<i>Agelas sp.</i>
OK-99-3	66	<i>Platarris sp.</i>	OK-99-62	83	<i>NC serpens</i>
OK-99-4	54	<i>Dysidea arenaria</i>	OK-99-63	83	<i>Epipolastis kashtimotensis</i>
OK-99-5	88	<i>Theonella cupola</i>	OK-99-64	89	<i>Xestospongia sp.</i>
OK-99-6	58	<i>Theonella canica</i>	SG1-1-2	70	<i>Comastus glideli</i>
OK-99-7	85	<i>Epipolastis kashtimotensis</i>	SG1-2-2	87	<i>Stephanometra indica</i>
OK-99-9	57	<i>Hyrrios sp.</i>	SG1-5-2	27	<i>Comastus cf. maculata</i>
OK-99-10	75	<i>Theonella sp.</i>	SG1-9-2	52	<i>Phanogenia gracilis</i>
OK-99-12	59	<i>Isis hippuris</i>	SG1-12-2	44	<i>Comastus parvicornis</i>
OK-99-13	62	<i>Acanthella sp.</i>	SG1-14-2	90	<i>Comastus schlegelii</i>
OK-99-15	59	<i>Phyllospongia sp.</i>	SG1-15-2	33	<i>Colobometridae sp.</i>
OK-99-17	66	<i>Petrobia sp.</i>	SG1-16-2	60	<i>Cenometra bella</i>
OK-99-18	67	<i>Fasciospongia rimosa</i>	SG1-19-2	60	<i>Comastus nobilis</i>
OK-99-20	64	<i>Echinoc lathria sp.</i>	SG1-21-2	40	<i>Oxycomastus sp.</i>
OK-99-21	68	<i>Sirocyllophora sp.</i>	SG1-23-1	-2.2	<i>Allocomastella polyclada</i>
OK-99-23	67	<i>Dysidea hebraea</i>	SG1-24-1	24	<i>Comastus sp.</i>
OK-99-26	69	<i>Dysidea cf. arenaria</i>	SG1-26-1	51	<i>Oxycomastus benetti</i>
OK-99-28	112	<i>Platarris sp.</i>	SG1-28-2	38	<i>Lamprometra palmaria</i>
OK-99-31	107	<i>Spongia sp.</i>	SG1-30-1	28	<i>Colobometra peripinnosa</i>
OK-99-34	119	<i>Theonella swinhoei</i>	SG1-31-1	22	<i>Comastus kami</i>
OK-99-35	108	<i>Petrobia sp.</i>	SG1-33-1	86	<i>Theonella sp.</i>
OK-99-36	100	<i>Acanthella sp.</i>	SG3-1	91	<i>Stereoneptilya sp.</i>
OK-99-37	102	<i>Luffariella sp.</i>	SG3-4	73	<i>Dysidea cf. arenaria</i>
OK-99-41	78	<i>Dysidea cf. arenaria</i>	SG3-6	107	<i>Stylotella sp.</i>
OK-99-43	77	<i>Xestospongia sp.</i>	SG3-10	102	<i>Epipolastis sp.</i>
OK-99-44	68	<i>Dysidea arenaria</i>	SG3-11	104	<i>Nepithaea sp.</i>
OK-99-47	90	<i>Dysidea cf. arenaria</i>	SG3-21	78	<i>Mymecioderma sp.</i>
OK-99-49	90	<i>Petrobia sp.</i>	SG3-25	77	<i>Xestospongia sp.</i>
OK-99-51	77	<i>Isis hippuris</i>	SG3-26	68	<i>Dysidea arenaria</i>
OK-99-52	87	<i>Petrobia sp.</i>	SG3-28	112	<i>Theonella sp.</i>
OK-99-55	81	<i>Acanthella sp.</i>	SG3-29	90	<i>Dysidea cf. arenaria</i>
OK-99-57	76	<i>Theonella swinhoei</i>			

Ⅱ-表2 海洋生物抽出物の NS3 Helicase 活性の阻害効果

II-図2

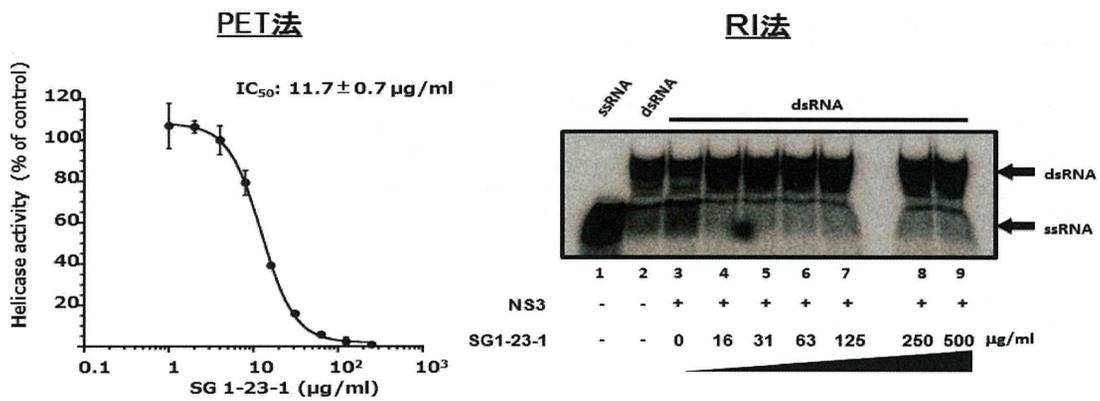
Alloeocomatella polycladia

ウミシダ類に属し、この酢酸エチル抽出分画が SG1-23-1 である。



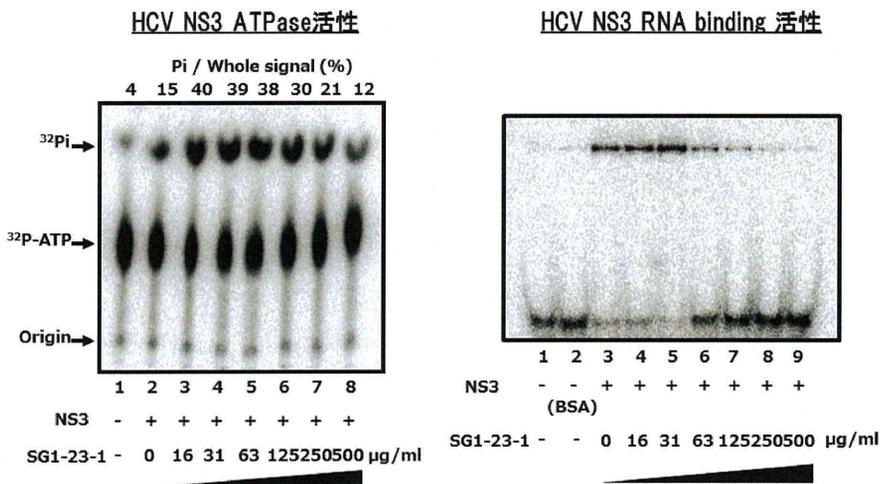
II-図3

PET法およびRI法による SG1-23-1 の NS3 Helicase unwinding 阻害活性の検討



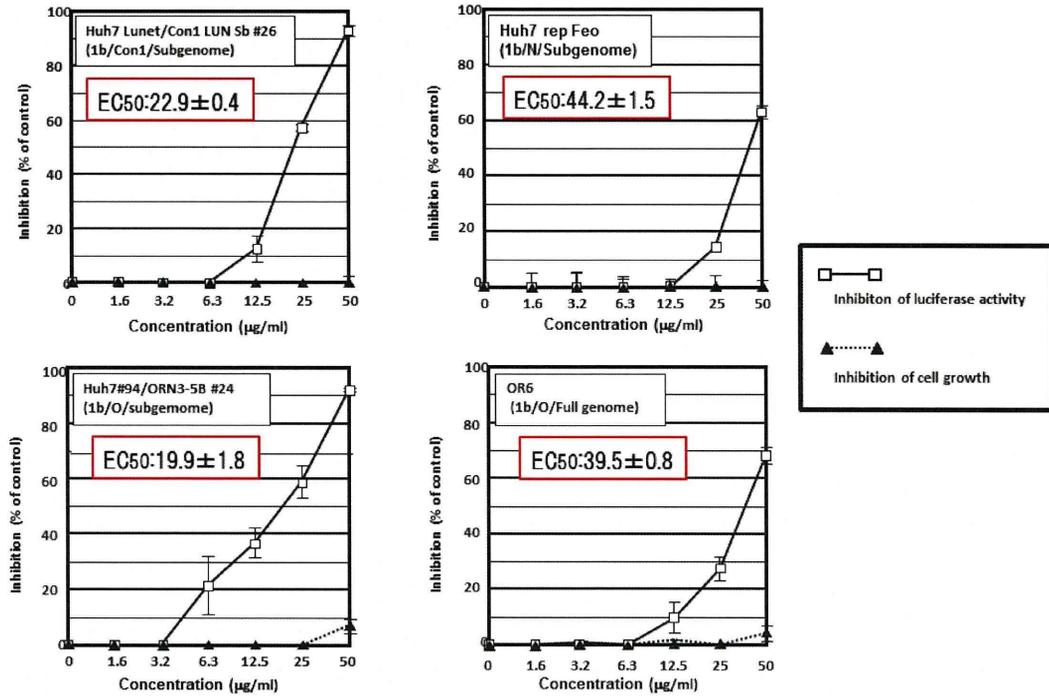
II-図4

SG1-23-1 の NS3 ATPase および NS3 RNA binding 阻害活性の検討



II-図5

SG1-23-1 のレプリコン細胞における HCV 増殖阻害効果の検討



薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究

分担研究者：松本 武久 独立行政法人理化学研究所 上級研究員

研究要旨

HCV NS3/4A プロテアーゼ阻害剤に続く新たなC型肝炎治療薬の標的分子をNS2/3 プロテアーゼとして昨年度末までにはほぼ完成させた阻害剤スクリーニン系を用いて、インシリコスクリーニングで酵素活性部位への結合を予測した化合物を評価した。

A. 研究目的

HCV タンパク質前駆体をプロセッシングする主たる酵素 NS3/4A プロテアーゼは、NS2/3 プロテアーゼがその N 端をポリペプチド鎖から切り離すことにより初めて活性化される。NS2/3 プロテアーゼは膜タンパク質であるため、一般に膜貫通ドメインを除いた不溶性のタンパク質を発現させた後、リフォールディングによって活性型に変化させるが、一過性に生じた活性はオートプロセッシング後に消失するため、阻害剤のアッセイには不向きである。近年、その立体構造が発表された (Nature, 442: 831-835, 2006) ことからインシリコによる薬剤設計の道が開かれた。本研究では NS2/3 プロテアーゼタンパク質発現細胞を阻害剤スクリーニングに使用して、これまでに滞っていた NS2/3 プロテアーゼ阻害剤探索研究を実施する。松本らは前年度まで、HCV 増殖を阻害する NS3/4A プロテアーゼ阻害剤の発見に続いて、NS2/3 プロテアーゼタンパク質の立体構造情報に基づいて、コンピューター上でプロテアーゼ活性部位に結合する化合物を探索するとともに、細胞ベースでの阻害剤スクリーニング系の構築を実施してきた。本研究では NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系を完成させ、阻害剤を探索・設計し、VX-950(telaprevir)、等の分子標的薬に続く、新たな薬剤標的を狙う C 型肝炎治療薬のシーズとする。

B. 研究方法

HCV NS2の膜貫通ドメインをN端に有する全長NS2/3プロテアーゼタンパク質のフォールディングと酵素活性化を細胞内環境において実現させるように、レポーター遺伝子としてGAL4を上流にもつホタルルシフェラーゼタンパク質と、CMVプロモーターの下流にNS2/3プロテアーゼ、NS3/4Aプロテアーゼおよび核内移行シグナルを付けたVP-16/GAL4転写因子DNA結合ドメインが連結する融合タンパク質の両方を経常的に発現するコンストラクトを作成し、その遺伝子を組み込んだ細胞に化合物を投与した後の光学的変化を測定することにより、インシリコスクリーニングで探索された活性候補低分子化合物のスクリーニングを実施する。第一段階の、ウイルスのレプリコンアッセイあるいは細胞感染実験でヒットした化合物について、NS2/3プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系で阻害活性の有無を確認する。NS2/3プロテアーゼ阻害活性が認められた化合物の周辺もインシリコスクリーニングで探索し、lead optimizationの種探しを目指す。この工程を繰り返すことにより、さらに発見された恐らくは50%活性阻害濃度が数マイクロモル程度の活性をナノモルレベルになるように、lead generationを目指して、その周辺化合物を再度インシリコスクリーニングを実施して探索する。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトならびに実験動物を研究の対象としない。

C. 研究結果

昨年度までに確立したリポーターアッセイ用細胞に、さらにリファレンス用レポーターとしてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を、その上流にCMVプロモーターを配して導入した。これによりスクリーニングされる化合物による細胞毒性やNS2/3プロテアーゼとNS3/4Aプロテアーゼの転写量を制御するプロモーターへの負の転写制御による実験データへの影響を取り除いた。創出された細胞のホタルルシフェラーゼ活性に対するNS3/4Aプロテアーゼ阻害剤であるVX-950のIC₅₀値は1.6 μMであった。一方、リファレンスリポーターであるウミシイタケルシフェラーゼ活性に対するVX-950のIC₅₀値は30 μMで、両値の比率で示すselectivity Indexは18.8であった。

2006年に公表されたNS2の立体構造(PDB ID: 2HD0)の座標に基づいてインシリコスクリーニングでデータベースから探索したNS2/3プロテアーゼ阻害剤候補化合物56種類のうち、山梨大が実施した全長ゲノムレプリコンアッセイでヒットした4化合物(#6, #25, #44, #47)と浜松医科大で実施したHCV trans-packaging systemによるアッセイでヒットしたNS2/3プロテアーゼに依存しないHCV産生阻害化合物2種類(#41, #42)を、我々が創出したレポーターアッセイ系で評価した。上記6化合物のうち2化合物(#42, #47)は、レポーターアッセイで測定したIC₅₀値は50 μM以下で、ほぼ同等の阻害活性を示した。ただし#42は50 μMでもリファレンスリポーターであるウミシイタケルシフェラーゼ活性を阻害しなかったのに対して、#47は50 μMでウミシイタケルシフェラーゼ活性を約30%阻害した。

D. 考察

一般に抗HCV増殖阻害剤のアッセイに利用されているサブゲノムレプリコンアッセイが示すVX-950のIC₅₀値3.6 μMとレプリコン細

胞増殖に対するVX-950のIC₅₀値34 μM、またそれから算出したselectivity Indexが9.5であることと比べると、本研究で創出したレポーターアッセイ系の細胞増殖に対するVX-950のIC₅₀値はさほど変わらないものの、VX-950感受性はサブゲノムレプリコンアッセイ系よりも高いことが示され、今後、NS2/3プロテアーゼおよびNS3/4Aプロテアーゼの阻害剤をスクリーニングするのに非常に適したアッセイ系であることが立証できた。

今回、レポーターアッセイで50 μM以下のIC₅₀値を示した2化合物のうち、#42はHCV trans-packaging systemでヒットしており、NS2/3プロテアーゼを阻害しなくてもウイルス産生を阻害することも期待される。しかしレポーターアッセイでも阻害活性を示すこと、またNS3/4Aプロテアーゼを阻害しなかったことから、NS2/3プロテアーゼ活性を阻害する可能性も期待される#42と#47は他の4化合物(#6, #25, #41, #44)とは構造的に異なり、お互いが非常に類似している。唯一異なるのは、母核となる構造に、化合物#42ではピプロリジン基が、一方、化合物#47ではピペリジン基が同じ位置に側鎖として繋がっている。両化合物のリファレンスリポーターに対する阻害活性、換言すれば細胞毒性のわずかな差は、この側鎖構造の違いに依ると考えられる。

#42と母核構造も、またその側鎖であるピプロリジン基を持ちながらも、もう一つの側鎖であるピリジン環の窒素原子の位置が違う化合物#37は、今回のすべてのアッセイ系でヒットしなかったことから、#42と#47の構造を最適化するうえで、構造活性相関のよいリファレンスとなる。

E. 結論

NS2/3プロテアーゼおよびNS3/4Aプロテアーゼの阻害剤をスクリーニングするのに非常に適したリポーターアッセイ系を確立した。またNS2の立体構造情報に基づいてインシリコスクリーニングで探索した化合物56種類のうち、構造が非常に類似した2種類の化合物は、HCV増殖を阻害すること、

リポーターアッセイ系でヒットしたから、NS2/3 プロテアーゼ阻害剤のリードになりうる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takaya D, Yamashita A, Kamiyo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S. A new method for induced fit docking (GENIUS) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19:6892-6905, 2011.

2. 学会発表

「Establishment of a cell-based assay for evaluation of compounds against HCV NS2-3 protease activity」 Takehisa Matsumoto, Kazue Kamiyo, Wataru Nishii, Shigeyuki Yokoyama. 第34回日本分子生物学会年会. 2011年12月13～16日. 横浜.

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

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）
分担研究報告書

ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス側因子の解明と治療応用
研究分担者 朝比奈 靖浩 武蔵野赤十字病院 消化器科部長

研究要旨

C 型肝炎ウイルス(HCV)の排除には RIG-I/IPS-1 系などの自然免疫が重要であるが、HCV はこれに対し自己の NS3/4A セリンプロテアーゼで IPS-1 を分解することで逃避するとされる。一方、IL28B 近傍の SNP が HCV の自然排除や PEG-IFN/RBV 併用療法の治療抵抗性に関与することが報告されている。今回 PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した 88 例を対象とし、IL28B 近傍の SNP と自然免疫機構との関連及び治療効果を明らかとした。IL28B minor 例の RIG-I、ISG15 の遺伝子発現は major に比し有意に高値であったが、IPS-1 及び RNF125 は IL28B minor で低かった。治療効果別では、NVR 例では治療中ウイルス反応 (VR) が得られた症例に比し有意に RIG-I、ISG15 の遺伝子発現が高値で、IL28B minor に限っても NVR 例では VR 例に比し有意に高値であった。多変量解析では RIG-I 高発現が NVR に独立して関与していた。IL28B 近傍の SNP と宿主自然免疫は共に治療抵抗性に関連しており、難治例における治療効果およびその抗ウイルス機構に重要な役割を担っていると考えられた。

A. 研究目的

IFN λ 3 をコードする IL28B SNP が minor allele の症例は α 型 PEG-IFN/RBV 療法の null viral response (NVR) に関連しており、IFN λ 系を中心とした抗ウイルス機構と λ 型 IFN による治療効果の解明が期待される。一方、HCV 排除には RIG-I/IPS-1 系などの自然免疫が重要であり、その遺伝子発現は治療効果と関連がある。今回 α 型 PEG-IFN/RBV 療法における宿主自然免疫と IFN λ の遺伝子発現と IL28B SNP 及び治療効果の関連を明らかとした。

B. 研究方法

α 型 PEG-IFN/RBV 施行例 88 例を対象とし (IL28B major=54、minor=34)、細胞内ウイルスセンサー (RIG-I)、IFN 誘導遺伝子 (ISG15)、アダプター分子 (IPS-1)、抑制系遺伝子 (RNF125) 及び IFN λ (IL28) の治療前

肝組織における遺伝子発現を解析し、IL28B SNP と治療効果との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

理上の問題が生じる場合には、武蔵野赤十字病院の倫理委員会において審議を行い、承認を得ることとした。

C. 研究結果

IL28B minor 例の RIG-I、ISG15 の遺伝子発現は major に比し有意に高値であった (RIG-I, 0.73 vs. 0.50, $p=0.002$; ISG15, 0.65 vs. 0.20, $p<0.001$) が、IPS-1 及び RNF125 は IL28B minor で低かった (IPS-1, 0.84 vs. 1.03, $p<0.001$; RNF125, 2.10 vs. 1.32, $p=0.37$)。一方、IFN λ 遺伝子の肝内発現には IL28B SNP 別に有意差がなかった (0.36 vs. 0.48, $p=0.47$)。治療効果別では、NVR 例では治療中ウイルス反応 (VR) が得ら