

201227006A (1/2)

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

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に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書 I

研究代表者 榎本 信幸

平成25(2013)年3月

**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**

**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**

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 榎本 信幸

平成25(2013)年3月

目 次

I. 総括研究報告		
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	榎本 信幸	1
II. 分担研究報告		
1. 遺伝子発現プロファイルの解析によるC型慢性肝炎を背景にした肝細胞癌発癌機構の検討	藤井 秀樹	11
2. 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	山下 篤哉	13
3. C型肝炎ウイルス(HCV)NS2-3プロテアーゼを標的とする抗HCV薬探索のためのスクリーニング系の開発とNS2タンパク質立体構造情報に基づくNS2-3プロテアーゼ阻害化合物の探索	松本 武久	17
4. インターフェロンの応答性に関わるウイルス・宿主免疫機構の解明	朝比奈靖浩	20
5. C型慢性肝炎のインターフェロン応答性と治療法選択に関する研究	黒崎 雅之	25
6. インターフェロン・リバビリン起因性貧血に関わる宿主因子の解析	坂本 直哉	28
7. 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—一次世代シーケンサーによるDAA耐性ウイルスの検討—	今村 道雄	32
8. ウイルス性肝炎の病態における制御性免疫機構の解析	中本 安成	34
9. HCV感染におけるPegIFN/RBV治療応答性あるいは肝癌発症リスクと相関するウイルス側因子	堀田 博	37
10. 培養細胞系を用いた薬剤耐性肝炎ウイルスの解析	鈴木 哲朗	44
11. B型肝炎及びC型肝炎ウイルスの変異と治療効果との関係	鈴木 文孝	47
12. 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：C型慢性肝炎の治療抵抗性および肝発癌におけるインターロイキン6 (IL-6)の関与	中川 美奈	52
13. 治療抵抗性HCV感染のウイルス遺伝子変異測定法の開発と応用	加藤 直也	56
14. HCVのインターフェロン・リバビリン抵抗性の分子機構に関する研究	加藤 宣之	60
15. HCV遺伝子変異による治療抵抗性機構の解析に関する研究	横須賀 収	65
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		68
IV. 研究成果の刊行物・別刷		102

I. 総括研究報告

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

研究代表者 榎本信幸 山梨大学医学部第一内科 教授

研究要旨：

(1)治療抵抗性肝炎ウイルスの病態解明と対策、および

(2)病変進展・発癌に関与するウイルス因子の解明と応用：

Deep sequence によって、わずかな TVR 耐性 NS3 変異 HCV が、多くの症例に Quasispecies としてすでに混在しており、治療開始後さらに増加することが示され、特にインターフェロン耐性プロフィールを有する症例では留意すべきことが考えられた。ただし臨床的意義についてはさらに検討が必要であった。一方、大規模な HCV ゲノムの deep haplotyping sequence を行うことにより、core aa. 70 の quasispecies と肝癌病態の間には密接な関連があることが明らかとなり、core aa. 70 の quasispecies は病態進展を予測する新たなバイオマーカーとなりうる可能性が考えられた。HCV 蛋白 NS5A により、MG132 および TG による肝アポトーシスに対する抵抗性が明らかとなり、肝発癌にウイルス蛋白 NS5A が関与する可能性を示した。ゲノムワイド関連解析を行い、HLA-DRB1/DQA/DQB1 の発現量を制御している 2 つの SNP が C 型慢性肝炎から肝硬変への進展に関与していることを見出した。RBV に感受性(3 株)、あるいは抵抗性(3 株)を示す細胞株を樹立し、cDNA マイクロアレイ解析により RBV 抵抗性細胞で発現レベルが高い 5 遺伝子と逆に発現レベルが低い 6 遺伝子を同定した。テラプレビル併用療法を開始する前に、Peg-IFN・RBV を 4 週間先行投与する Lead-in 治療を行い、Lead-in 反応性と治療有効性、耐性変異リスクの関連を検討することにより、Lead-in 治療反応性により治療有効性と耐性変異リスクが把握できることを明らかとした。HCV 全長クローン感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、検討したところ DAA 製剤を sequential に使用すると、多剤耐性型 HCV が出現するため、注意が必要であることが示された。ITPA 遺伝子多型はリバビリン単独投与期間中の貧血と関連し、ITPA-CA/AA 型の症例ではリバビリンによるヘモグロビン減少は全く出現しないことを明らかとした。IL-6 は小胞体ストレスと密接に関与し治療抵抗性に加え、肝線維化および肝発癌への進展に関与することが示唆された。肝がん患者において MDSC が抗腫瘍免疫の抑制、がんの進展に作用している可能性が示唆された。IL28B 近傍の SNP が規定するインターフェロン不応性には、インターフェロン治療における IL28B 発現誘導が障害されていることが関与していると考えられた。HCV Core-Gln70 及び NS3-Tyr1082/Gln1112 は肝癌発症リスクファクターとして診断に用いうる可能性が明らかとなった。一方、肝癌非癌部組織をマイクロアレイをを行った解析により非癌部遺伝子発現パターンで癌部のサブクラスを予測することが可能であった。

(3)治療抵抗性・病変進展・発癌に関与するウイルス側因子を標的とした新規治療法の開発基盤確立：

沖縄産カイメン Amphimedon sp の酢酸エチル抽出分画(C-29EA)に、強い HCV 複製阻害活性があることを見出した。更に、C-29EA は NS3 ヘリカーゼ及びプロテアーゼの阻害活性を有することを見出した。また、C-29EA はインターフェロン- α と相乗的に HCV 複製を阻害することを見出した。大腸菌セルフリー合成系で可溶性で比活性が高い NS2-3 プロテアーゼタンパク質を合成し、その合成タンパク質による触媒反応の最適化を実施し、アッセイ系を完成させた。(1) HCV 粒子産生阻害活性を有する抗 NS2 化合物#42 を見出した。化合物#42 を HCV 持続感染細胞へ長期間添加することにより耐性ウイルスが出現すること、このときアミノ酸 981 番セリンのグリシンへの置換変異を見出した。(2)HCV プロテアーゼ活性を指標とした薬剤耐性評価技術の開発:C 型肝炎患者中 HCV のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性を、実施の酵素活性を指標として評価するため、HCV 複製検体から RT-PCR/試験管内転写&翻訳によって HCV NS3 プロテアーゼを簡便に調製し NS5A/5B 切断活性を定量する技術の開発を行った(名古屋医療センター 杉浦博士との共同研究)。

(4)肝炎ウイルス遺伝子情報を臨床応用するための遺伝子検査・解析法の標準化：

ウイルス遺伝子情報を大規模にかつ網羅的に解析するために、ダイレクトシーケンシングによるハイスループットなウイルス全ゲノム遺伝子解析法、ならびに次世代シーケンサーを用いた Deep sequence 解析法を導入、確立した。

A.研究目的

● HBV および HCV による持続性感染は、無症状の慢性肝炎から高率に肝硬変、肝臓に進展し、日本においては年間 3 万人以上の死亡原因として大きな社会問題となっている。肝炎ウイルスに対する抗ウイルス治療は近年、長足の進歩を見せているが、HBV においては抗ウイルス薬の長期投与とそれによる新たな薬剤耐性ウイルスの出現、HCV においては治療抵抗性ウイルス感染が依然として多数存在することから、肝炎ウイルス持続感染を完全に制御して肝臓の発生を完全に抑制することは困難な状況にある。一方、ウイルス肝炎の自然経過および治療経過には大きな多様性が認められ、病態の進展が極めて緩徐な症例から、肝硬変・肝臓に進展する症例があるがこのような多様性の機序もほとんど解明されていない。肝炎ウイルスは遺伝子変異を高頻度に起こし、上記の治療反応性あるは病態の多様性は肝炎ウイルス遺伝子および宿主遺伝子の多様性を背景としており、ウイルス側因子の解明は難治性ウイルス肝炎の制御に不可欠と考えられる。

● したがって、本研究は以下の目的で実施する。

- (1) 治療抵抗性肝炎ウイルス感染の病態を肝炎ウイルス遺伝子変異から解析し診断・治療法を確立する。
- (2) ウイルス肝炎の多様な病態(病変進展、発癌)に関連する肝炎ウイルス遺伝子変異を明らかとして、宿主因子との相互作用を解明して診断・予防・治療に展開する。
- (3) 治療抵抗性・病変進展・発癌に関与するウイルス側因子を標的とした新規治療法の開発基盤確立を行う。
- (4) 肝炎ウイルス遺伝子情報を一般臨床に応用するために遺伝子検査・解析法の標準化を行う。

B.研究方法 C.結果 D.考察

(1) 治療抵抗性肝炎ウイルスの病態解明と対策、および

(2) 病変進展・発癌に関与するウイルス因子の解明

ウイルス変異と宿主ゲノムから見たインターフェロン・リバビリン・テラプレビル治療効果と肝発癌(榎本 信幸)

【方法】(1) 3 剤併用療法において、治療前と治療後の TVR に対するウイルス耐性変異について、次世代シーケンサーにて解析、その治療効果における意義を検討するため、治療前、治療後 12 時間の保存血清を用い、NS3 プロテアーゼ領域のアミノ酸変化を、(GS junior 454)にて deep sequence を行った。TVR 耐性変異に関しては NS3 領域の V36 A/M、T54S/A、R155K/T/Q、A156S/T/V について検討を行った。(2) HCV 感染症例 82 症例(HCC 27 例、LC30 例、CH25 例)を対象とした。次世代シーケンサー GS Junior に

よるコア領域 498bp 塩基長にわたる deep haplotyping sequence を行い、病態と HCV ゲノムの関連を、コア 70 番変異比率、系統樹解析を用い、臨床情報と合せて解析した。

【結果】(1)TVR 治療前から、17/21 (81%)例に TVR 耐性変異が見られ、治療後には 20/21 (95%) に増加した。全変異率は治療開始前 0.30% (258/85923)であったが、治療開始後 0.63% (739/115926)となり、有意な増加を認めた。(2) Core aa 70 番における野生型と変異型の混在は direct sequence では 15%のみ認められると判定されたが、deep sequence では 95%とその大部分が混在状態であることが示され、さらに病期の進行に伴って有意に Q/H の比率が増加した。各症例で系統樹解析を行うと、コア 70 の変異の有無で系統樹は大きく 2 分される傾向となり、コア 70 番配列はコア遺伝子全体の遺伝変化を規定する重要配列である可能性が示された

【考察】(1)Deep sequence によって、わずかな TVR 耐性 NS3 変異 HCV が、多くの症例に Quasispecies として混在し、治療開始後 12 時間で耐性変異率は有意に増加した。これらの臨床的意義については、さらなる検討が必要であるが、インターフェロン耐性プロフィールを有する症例では、これらの耐性変異の存在には留意すべき可能性が考えられた。(2)大規模な HCV ゲノムの deep haplotyping sequence を行うことにより、core aa. 70 の quasispecies と肝臓病態の間には密接な関連があることが示された。臨床情報と肝臓発現におけるウイルスゲノムの関与をさらに詳細に検討することにより、病態進展を予測する新たなバイオマーカーとなりうる可能性が考えられた。

NS5A による肝細胞アポトーシス抵抗性の検討と次世代シーケンサーによるウイルスゲノタイプ決定(横須賀 収)

【方法】HCV NS5A による肝細胞アポトーシス抵抗性およびプロテアーゼ阻害剤未使用 C 型慢性肝炎患者におけるウイルス遺伝子変異の検討を行なった。

【結果】(1) HCV NS5A はプロテオソーム阻害剤 MG132 および ER ストレス誘導剤 Thapsigargin (TG) によるアポトーシスを抑制したが、今回の検討では ISDR のアミノ酸変異数による違いはみられなかった。(2) C 型慢性肝炎患者(セログループ 1)の HCV NS5B 領域の Ultra Deep Sequence の解析を行なったところ、Genotype 決定領域に塩基置換が見つかった。

【考察】HCV NS5A により、MG132 および TG による肝アポトーシスに対する抵抗性が観察された。UltraDeep Sequence の解析をすることにより、Sanger 法による直接塩基配列決定では得られない塩基変異が得られた。

治療抵抗性 HCV 感染のウイルス遺伝子変異測定法の開発と応用(加藤 直也)

【方法】(1) HCV コアタンパク第 70 番目アミノ酸の Arg →Gln 変異を高感度に検出・定量する Taqman MGB

probe を用いた real time PCR 法により、PEG-IFN/RBV を受けた C 型慢性肝炎患者における野生型および変異型の存在状態を明らかにし、治療効果との関連につき検討する。(2) C 型慢性肝炎から肝硬変への進展に関連する宿主側因子(SNP)につき、ゲノムワイド関連解析(genome wide association study: GWAS)を行う。

【結果】

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

【考察】1) C 型慢性肝炎患者では、コアタンパク第 70 番目アミノ酸の野生型と変異型の定量法による変異型 HCV 比率が有用であり、本定量法の臨床的意義が示された。2) ゲノムワイド関連解析により、HLA 発現が、C 型慢性肝炎から肝硬変への進展に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

HCV のインターフェロン・リバビリン抵抗性の分子機構に関する研究(加藤 宣之)

【方法】C 型肝炎ウイルス(HCV) がリバビリン(RBV) に抵抗性を示す分子機構を解明することを目的とし、従来の HCV 研究に多用されてきたヒト肝がん細胞株 HuH-7 とは異なるヒト肝がん細胞株 Li23 を用いて開発した遺伝子型 1b で HCV O 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞を用いて検討した。

【結果】(1) RBV に感受性を示す Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞(3.5 年以上継代培養)から RBV に抵抗性を示すクローン化細胞株(3 株)を樹立した。(2) RBV に感受性を示す親細胞と今年度得られた RBV 抵抗性細胞を用いた cDNA マイクロアレイ解析により RBV 抵抗性細胞で発現レベルが高い 5 遺伝子と逆に発現レベルが低い 6 遺伝子を同定した。

【考察】Li23 由来で RBV に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製クローン化細胞株の樹立とその感受性と関連する因子を同定した。

C 型慢性肝炎のインターフェロン応答性と治療法選択に関する研究(黒崎 雅之)

【方法】テラプレビル併用療法は、治療効果も高いが副作用発現も多く、治療無効例では耐性変異が出現するため、治療が有効な症例を把握することは重要である。治療開始前、あるいは治療開始後早期に抗ウイ

ルス効果を予測することで、テラプレビル併用療法を行うべき症例の選択ができる。テラプレビル併用療法を開始する前に、Peg-IFN・RBV を 4 週間先行投与する Lead-in 治療を行い、Lead-in 反応性と治療有効性、耐性変異リスクの関連を検討した。

【結果】Lead-in 治療反応性が良好な症例では、治療開始前に NS3 変異があっても早期に HCV 陰性化が得られ、Breakthrough も生じないのに対し、Lead-in 治療反応性が不良の症例では、治療開始前に NS3 変異がなくても治療中に NS3 変異が出現し Breakthrough が生じることを見出した。【考察】Lead-in 治療反応性により治療有効性と耐性変異リスクが把握できる。

次世代シーケンサーによる DAA 耐性ウイルスの検討(今村 道雄)

【方法】C 型急性肝炎患者よりクローニングした HCV 全長クローンをを用いて、C 型肝炎ウイルス(HCV)の野生型あるいは Core および ISDR 変異型の HCV をヒト肝細胞キメラマウスに感染させ、ウイルス変異とインターフェロン(IFN)の効果を検討した。

【結果】HCV の Core 70 の変異はウイルスの感染、増殖、IFN 感受性には影響が無いのに対し、ISDR の変異数増加は HCV の感染および複製能を低下させることを見出した。また HCV 感染マウスを用いて HCV genotype による Direct-acting antiviral agent (DAA)併用療法の有効性を検討したところ、NS5A 阻害剤+第二世代 protease 阻害剤あるいは NS5A 阻害剤+非核酸型 NS5B 阻害剤の併用療法は genotype 1b 型 HCV には有効であるが、genotype 2a または 2b 型 HCV には効果が弱いことを見出した。HCV クローンをを用いて Telaprevir あるいは NS5A 阻害剤耐性型 HCV 感染マウスを作製し、これらに telaprevir+NS5A 阻害剤を併用投与すると両薬剤に対する二重耐性型 HCV が出現し breakthrough が生じ、さらに NS5B 阻害剤の投与により、三重耐性型 HCV が出現した。

【考察】DAA 製剤を sequential に使用すると、多剤耐性型 HCV が出現するため、注意が必要であることが示された。

インターフェロン・リバビリン起因性貧血に関わる宿主因子の解析(坂本 直哉)

【方法】インターフェロン・リバビリン薬剤抵抗性にはウイルス因子および遺伝子多型を含む宿主因子が密接に関連する。しかし両者の併用投与が標準治療であるためリバビリン単独の血球系の変動と IPTA 遺伝子多型の関連についての解析は困難である。我々は、リバビリン単独投与を 2 剤併用療法に先行して行い IPTA 遺伝子多型を含む宿主要因と貧血発症との関連を検討し、血球系の変動に関連する造血ホルモン動態との関連を解析した。

【結果】IPTA 遺伝子多型はリバビリン単独投与期間中の貧血と関連し、IPTA-CA/AA 型の症例ではリバビリンによるヘモグロビン減少は全く出現しなかった。リバ

ビルン単独投与期間中に認められる血小板増多の機序としてリバビリンによる貧血により惹起される内因性 erythropoietin 分泌が関与している可能性が示唆された。

【考察】本成果に基づき、赤血球、血小板値の変化に加え、治療に伴う顆粒球系の変化に関連する宿主、ウイルス因子を探索し、より安全な抗ウイルス療法の確立を目指す。

C 型慢性肝炎の治療抵抗性および肝発癌におけるインターロイキン 6(IL-6)の関与(中川 美奈)

【方法】本研究は、C 型慢性肝炎の治療抵抗性との関与が十分明らかにされていないインターロイキン 6(IL-6)の治療抵抗機序の解明を目指してゆく。

【結果】1)臨床的に治療抵抗型であるHCVコア蛋白変異株ではウイルス複製は保たれているものの、粒子形成および分泌低下を認め、小胞体ストレス蛋白、IL-6 発現誘導がみられ、IFN シグナル系の抑制因子である SOCS3 の発現亢進と IFN 誘導遺伝子(ISG)発現低下をみた(J Virology 2011; 85)。2))IFN 治療抵抗株である JFH 株では IL-6 およびその下流の SOCS3 発現が亢進し、ISG 抑制をみた(Virology.2010; 407)。3)CHC に対して IFN 治療を施行した臨床検体を用いた解析でも IL-6 発現抑制効果を有するとされるエストロゲンの効果を受け難い男性においては治療抵抗症例で IL-6 持続高値であることが確認された(Antiviral Therapy 2011; 16)。4)CHC を含む慢性肝疾患 337 例で IL-6 値を含めた臨床背景と肝発癌の有無を検討すると、肝硬変、糖尿病および肝細胞癌症例では有意に IL-6 高値であった。発癌に寄与する因子として同定された線維化、糖尿病の有無、男性など複数の因子に IL-6 が関連していることが分かった。

【考察】多機能サイトカインである IL-6 は小胞体ストレスと密接に関与し、治療抵抗性に加え、肝線維化および肝発癌への関与も示唆された。

ウイルス性肝炎の病態における制御性免疫機構の解析(中本 安成)

【方法】制御性Tリンパ球(Treg)とともに免疫反応を抑制する作用が注目されている骨髄由来抑制細胞(MDSC)について、C型慢性肝疾患の病態への関与について検討した。

【結果】肝がん患者末梢血中の CD14(+) HLA-DR(-/low) MDSCは、非がん患者に比較して増加しており、肝がんの病期(stages I-II / III-IV)と相関することが示された。また、RFA治療後にMDSCの低下した症例では再発(二次発がん)までの期間が延長する傾向があった。

【考察】肝がん患者においてMDSCが抗腫瘍免疫の抑制、がんの進展に作用している可能性が示唆された。

インターフェロンの応答性に関わるウイルス・宿主免疫

機構の解明(朝比奈 靖浩)

【方法】テラプレビル 3 剤併用療法でも IFN 不応例では治療成績は十分でない。これまで本研究では、IL28B 遺伝子近傍の SNP と宿主自然免疫系遺伝子発現およびインターフェロン治療におけるインターフェロン応答性との関連について検討し、PEG-IFN/RBV 併用療法における NVR に、IL28B minor type および RIG-I などの自然免疫系遺伝子や IFN 誘導遺伝子の治療前の肝内高発現が関与していることを明らかとしてきた。本年度は、IL28B major type と minor type の配列を持つ promoter reporter plasmid を構築し、自然免疫シグナル刺激による promoter 活性を解析し、患者末梢血単核球(PBMC)における ex vivo 刺激による IL28B 発現誘導能と治療効果との関連について検討した

【結果】IL28B minor type の配列を持つ promoter の活性は major type のものよりも低く、患者 PBMC における ex vivo 刺激による IL28B 発現誘導能は治療効果と関連し、NVR 例で有意に低値であった。

【考察】IL28B 近傍の SNP が規定するインターフェロン不応性には、インターフェロン治療における IL28B 発現誘導が障害されていることが関与していると考えられた。

HCV 感染における PegIFN/RBV 治療応答性あるいは肝癌発症リスクと相関するウイルス側因子(堀田 博)

【方法】本研究では、C型慢性肝炎時より肝癌発症まで平均 7 年以上経過を追えた 49 例の肝癌症例と、同時代に経過観察が可能でかつ肝癌を発症しなかった対照症例 100 例の血清サンプルを用いて、HCV コア蛋白、NS3 及び NS5A の特有のアミノ酸多様性、及び肝癌発症前後でのそれらのアミノ酸多様性の変化について検討した。

【結果】単変量解析により、コア蛋白 70 位のアミノ酸変異(Core-Gln70)、NS3 の 1082 位及び 1112 位の変異(NS3-Tyr1082/Gln1112)、NS5A の IRRDR 変異数 6 以上(NS5A-IRRDR \geq 6)、NS5A の 2218 位の変異(NS5A-Asn2218)、及び宿主因子として α フェトプロテイン(AFP)高値、ALT 高値、AST 高値及び肝の線維化スコア高値が、肝癌発症相関因子として抽出された。多変量解析により、Core-Gln70、NS3-Tyr1082/Gln1112 及び AFP 高値がそれぞれ独立した肝癌発症相関因子として同定された。

【考察】HCV コア蛋白 70 位及び NS3 の 1082/1112 位のアミノ酸は長期間にわたり変異がおこりにくいことから、Core-Gln70 及び NS3-Tyr1082/Gln1112 は肝癌発症リスクファクターとして予後診断の一助に用いることができると思われる。

B 型肝炎及びC型肝炎ウイルスの変異と治療効果との関係(鈴木 文孝)

【方法】C 型慢性肝炎症例(genotype 1b、高ウイルス量)に対する terapevir (TVR)と PEG-IFN+RBV の3者

併用療法にて sustained virological response (SVR)が得られなかった症例において耐性ウイルスが投与開始前より存在するかどうか HCV の NS3 領域の遺伝子配列を次世代シーケンサーを用いて解析した。また B 型慢性肝疾患に使用されている核酸アナログ製剤における耐性ウイルスの頻度とその後の治療効果について検討した。

【結果】 C 型肝炎; 開始時の検討では、TVR 耐性は 1 例で検出された (T54S 99.9%)。この症例は breakthrough 時 T54S (99.7%) 以外に R155K(96.0%) が新たに検出された。また残りの 13 例中投与中または投与終了後に TVR 耐性ウイルスが検出された症例は 7 例認めしたが、いずれも治療後に出現した。B 型肝炎; ラミブジン単独投与中の症例でポリメラーゼ領域の YMDD motif mutation が疑われた症例において YMDD motif 以外の rt 領域のアミノ酸変異を検討した。488 例中 13 例(3%)に YMDD motif 以外でアデフォビルまたはエンテカビルに耐性であると報告されているアミノ酸変異を認めた。これら 13 例のうち 11 例でラミブジンとアデフォビルの併用療法を施行した。3 年目での HBV DNA の陰性化は 7 例中 4 例であった。また開始時多剤耐性ウイルスを認めた症例を除いた 393 例中、併用療法開始後 12 例(3%)に両剤に対する耐性ウイルスが認められた。全例 genotype C、12 例中 11 例で rtA181T/S/V の変異を認めた。そのうち 2 例で rtA181T+rtN236T が認められた。これらのうち 5 例で DNA 量の再上昇を認めた。28 例の核酸アナログ(ラミブジン、アデホビル、エンテカビル)のいずれかまたは併用療法)の不適例に対してラミブジンまたはエンテカビルとテノホビルの併用療法を行った。全例でウイルス量の低下が認められ、1 年目の時点で 8 例中 7 例で HBV DNA 量が 2.6 未満に低下していた。

【考察】 C 型慢性肝炎に対する新規薬剤である TVR と PEG-IFN+RBV の 3 者併用療法 24 週間投与の治療効果は高いが、開始時の遺伝子解析では耐性ウイルスの出現や効果を予測できなかった。また B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤の長期投与では、多剤耐性ウイルスが出現する症例があり、テノホビルなどの新規治療薬の効果が期待される。

遺伝子発現プロファイルの解析による C 型慢性肝炎を背景にした肝細胞癌発癌機構の検討(藤井 秀樹)

【方法】HCV 関連 HCC の発癌に炎症や酸化ストレスなど非癌部の因子も発癌に重要な役割を果たしていることを踏まえ、これらのサブクラスに相当する症例の非癌部で特徴的に発現している遺伝子について、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につき検討を行った。【結果】 良好な予測ができる 8 つの遺伝子から成るモデルが構築された。

【考察】非癌部遺伝子発現パターンで癌部のサブクラスを予測することが可能であった。予測性能を測るため、別個のサンプルを用いてさらなる検討が必要である。

(3)治療抵抗性・病変進展・発癌に關与するウイルス側因子を標的とした新規治療法の開発基盤確立:

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(山下 篤哉)

【方法】HCV サブゲノムレプリコン細胞を用いて、海洋生物抽出物ライブラリーより HCV 複製阻害活性を有するものの検索を行った。

【結果】沖縄産カイメン *Amphimedon* sp の酢酸エチル抽出分画(C-29EA)に、強い HCV 複製阻害活性があることを見出した。更に、C-29EA は NS3 ヘリカーゼ及びプロテアーゼの阻害活性を有することを見出した。また、C-29EA はインターフェロン- α と相乗的に HCV 複製を阻害することを見出した。

【考察】海洋生物抽出物ライブラリーより HCV 抑制効果の高い海洋生物抽出物を見出すことが出来た。現在、この抽出物の分画・精製を行い、抑制化合物の単離を進めている。

C 型肝炎ウイルス(HCV) NS2-3 プロテアーゼを標的とする抗 HCV 薬探索のためのスクリーニング系の開発と NS2 タンパク質立体構造情報に基づく NS2-3 プロテアーゼ阻害化合物の探索(松本 武久)

【方法】HCV NS2 タンパク質の立体構造情報に基づいて、インシリコで探索した NS2-3 プロテアーゼ阻害候補化合物のうち、2 次スクリーニングでヒットした 3 化合物の直接的な NS2-3 プロテアーゼに対する阻害活性を評価するために、可溶性で比活性が高い NS2-3 プロテアーゼタンパクアッセイ系を構築する。

【結果】大腸菌セルフリー合成系で可溶性で比活性が高い NS2-3 プロテアーゼタンパク質を合成し、その合成タンパク質による触媒反応の最適化を実施し、アッセイ系を完成させた。さらにこのアッセイ系を用いて上記 3 化合物の直接的な NS2-3 プロテアーゼ阻害活性を測定した。

【考察】NS2-3 プロテアーゼに対する化合物の直接的な阻害活性を評価するのに非常に適したアッセイ系を構築することが可能となった。これを用いてさらなる抗 HCV 薬の探索を進める。

培養細胞系を用いた薬剤耐性肝炎ウイルスの解析(鈴木 哲朗)

【方法】本研究では理化学研究所 松本博士らと共同で抗 NS2 化合物の探索、ならびに HCV-NS3 プロテアーゼ活性を指標とした薬剤耐性評価技術を開発する。

【結果】(1) HCV 粒子産生阻害活性を有する抗 NS2 化合物 #42 を見出した。化合物 #42 を HCV 持続感染細胞へ長期間添加することにより耐性ウイルスが出現すること、このときアミノ酸 981 番セリンのグリシンへの置換変異を見出した。(2) HCV プロテアーゼ活性を指標とした薬剤耐性評価技術の開発:C 型肝炎患者中

HCV のプロテアーゼ阻害剤に対する感受性を、実施の酵素活性を指標として評価するため、HCV 複製検体から RT-PCR/試験管内転写&翻訳によって HCV NS3 プロテアーゼを簡便に調製し NS5A/5B 切断活性を定量する技術の開発を行った(名古屋医療センター 杉浦博士との共同研究)。

【考察】 薬剤抵抗性に関与する NS2 変異を初めて見出した。HCV NS3 プロテアーゼ活性を指標とした阻害剤耐性検査法の開発に成功した。

(4)肝炎ウイルス遺伝子情報を臨床応用するための遺伝子検査・解析法の標準化：

ウイルス遺伝子情報を大規模にかつ網羅的に解析するために、ダイレクトシーケンスによるハイスループットなウイルス全ゲノム遺伝子解析法、ならびに次世代シーケンサーを用いた Deep sequence 解析法を導入、確立した。さらに本研究で得られた肝炎ウイルス遺伝子情報を臨床応用し広く患者診療の向上に役立てるために、遺伝子情報・機能情報・臨床情報を統合した知見を集積した。今後、診療上の有用性を示すエビデンスを集積して一般臨床導入への基盤を確立する。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行においては各研究施設において必要な申請を行い各種倫理規定を遵守している。

E. 結論

PEG-IFN/RBV 療法、PEG-IFN/RBV/TPV 療法、DAA による各種抗ウイルス治療における反応性、あるいは肝病態進展・肝発癌に関連する HCV 遺伝子領域の検索において、臨床検体、キメラマウス、培養細胞を用いた次世代シーケンスを用いた deep sequence 技術を含む網羅的解析により、HCV Core、NS3、NS5A の関与が非常に明らかとなり、同時に IL28B、MICA、IL-6、STAT を含む宿主因子の病態への関与も示された。さらに創薬に関しても酵素活性を指標にした抗ウイルス剤スクリーニングの系を確立しつつある。今後これらのウイルス因子と宿主因子の関連をさらに明らかにして病態の理解をさらに深めつつ、創薬につなげてゆく必要がある。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

1. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komatsu N, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication. *J Viral Hepat* 2013;20:281-9.

2. Saibara T, Enomoto N, Kaneko S, Chayama K, Sata M, Imawari M, Onishi S, Okita K. Clinical efficacy of combination therapy with ME3738 and pegylated interferon alpha-2a in patients with hepatitis C virus genotype 1. *Hepatol Res* 2013.
3. Nakanishi H, Kurosaki M, Nakanishi K, Tsuchiya K, Noda T, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Itakura J, Anami K, Asahina Y, Enomoto N, Higuchi T, Izumi N. Impaired brain activity in cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy: Evaluation by near-infrared spectroscopy. *Hepatol Res* 2013.
4. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2013;85:449-58.
5. Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N. Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2013.
6. Asahina Y, Tsuchiya K, Nishimura T, Muraoka M, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe M, Izumi N. alpha-fetoprotein levels after interferon therapy and risk of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2013.
7. Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Mar Drugs* 2012; 10:744-61.
8. Tsukui Y, Mochizuki H, Hoshino Y, Kawakami S, Kuno T, Fukasawa Y, Iwamoto F, Hirose S, Yoshida T, Hosoda K, Suzuki Y, Kojima Y, Hirose Y, Shindou K, Matsuda M, Yagawa S, Tawara A, Kobayashi M, Konishi T, Yamazaki T, Takahashi S, Fuji H, Enomoto N, Omata M. Factors contributing to the overall survival in patients with hepatocellular carcinoma treated by sorafenib. *Hepatogastroenterology* 2012; 59:2536-9.
9. Sueki R, Maekawa S, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Kanayama A, Ohmori T, Shindo

K, Amemiya F, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Enomoto N. Correlation between pretreatment viral sequences and the emergence of lamivudine resistance in hepatitis B virus infection. *J Med Virol* 2012; 84:1360-8.

10. Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2012; 42:958-965.

11. Motosugi U, Ichikawa T, Araki T, Matsuda M, Fujii H, Enomoto N. Bayesian prediction for liver fibrosis staging: Combined use of elastography and serum fibrosis markers. *Hepatology* 2012.

12. Maekawa S, Sakamoto M, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Komatsu N, Shindo K, Kanayama A, Ohmori T, Amemiya F, Takano S, Yamaguchi T, Nakayama Y, Kitamura T, Inoue T, Okada S, Enomoto N. Comprehensive analysis for viral elements and interleukin-28B polymorphisms in response to pegylated interferon plus ribavirin therapy in hepatitis C virus 1B infection. *Hepatology* 2012; 56:1611-21.

13. Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K. Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp. *PLoS One* 2012; 7:e48685.

14. 坂本 穰, 榎本信幸. 肝癌診療の最前線 ―知っておきたい診断・治療の新情報― 発癌・再発予防「C型肝炎と肝癌」内科 109(3):420-424, 2012

15. 坂本 穰, 榎本信幸. 特集Ⅱ「C型肝炎治療の新しい展開」2.ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみたPEG-IFN+RBV療法とprotease阻害剤の適応 消化器内科 54(2): ,2012

16. 坂本 穰, 榎本信幸. 抗ウイルス薬―最新の動向―Ⅱ抗ウイルス剤の特性と適応・使い分け 6. 抗肝炎ウイルス薬、インターフェロン製剤 2)抗HCV薬 日本臨床 70(4) , 2012

18. 坂本 穰, 榎本信幸. C型肝炎の個別化医療―肝発癌の危険性とウイルス排除の可能性を考慮して― *Medical Practice* 29(6), 2012

19. 坂本 穰, 榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみたPEG-IFN+RBV療法とProtease阻害剤の適応. *消化器内科* 54(4): 454-458, 2012

20. 坂本 穰, 榎本信幸. 特集・C型肝炎―新時代の

治療戦略 新時代における各治療法の位置付けとその実際 ペグインターフェロン+リバビリン+テラプレビル併用療法―宿主・ウイルス因子の解析からみた最適な治療 消化器の臨床 15(3): 249-256, 2012

2.学会発表

- 1) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノムから見たPEG-IFN+RBV療法の治療成績と発癌リスクを考慮した新規治療法への展望. 第98回日本消化器病学会総会(シンポ) 2012.4.20 東京(京王プラザホテル)
- 2) 中山康弘, 坂本 穰, 榎本信幸. 消化器専門医に必要な腹部超音波技術の習得とその検証. 第98回日本消化器病学会総会(パネル)2012.4.21 東京(京王プラザホテル)
- 3) Hiroko Shindo, Shinya Maekawa, Nobutoshi Komatsu, Kazuki Komase, Mika Miura, Makoto Kadokura, Ryota Sueki, Kuniaki Shindo, Fumitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Taisuke Inoue, Minoru Sakamoto, Atsuya Yamashita, Kohji Moriishi, Nobuyuki Enomoto. IL-28B(IFN λ -3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication. 第3回国際交流フォーラム 2012.4.21 東京(京王プラザホテル)
- 4) Nobuyuki Enomoto, Shinya Maekawa. Comprehensive analysis for viral genetic elements and IL28B polymorphisms in response to peginterferon plus ribavirin therapy in HCV-1b infection. 第3回国際交流フォーラム 2012.4.21 東京(京王プラザホテル)
- 5) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 臨床背景とウイルス変異・宿主ゲノムからみたC型慢性肝炎に対する治療法選択. 第48回日本肝臓学会総会(ワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 6) 三浦美香, 前川伸哉, 小松信俊, 進藤浩子, 小馬瀬一樹, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連するHCV遺伝子変異の解析. 第48回日本肝臓学会総会(ワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 7) 進藤邦明, 坂本 穰, 榎本信幸. 肝予備能不良症例への肝癌治療戦略. 第48回日本肝臓学会総会(ワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 8) 鈴木雄一朗, 土谷 薫, 村岡 優, 田中佳祐, 星岡英賢, 玉城信治, 加藤知爾, 安井 豊, 細川貴範, 上田 研, 中西裕之, 板倉 潤, 高橋有香, 黒崎雅之, 朝比奈靖浩, 泉 並木. MDCT,EOB-MRI, Sonazoid CEUSを用いた総合画像診断による術前肉眼分類の有用性. 第48回日本肝臓学会総会(ワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 9) 村岡 優, 加藤知爾, 土谷 薫, 田中佳祐, 鈴木雄一朗, 星岡英賢, 玉城信治, 安井 豊, 細川

- 貴範, 上田 研, 中西裕之, 板倉 潤, 高橋有香, 黒崎雅之, 朝朝比奈靖浩, 泉 並木. C型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌局所根治療法後ペグインターフェロン・リバビリン併用療法における IL-28B 遺伝子多型の臨床的意義. 第 48 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 10) 田中佳祐, 中西裕之, 村岡 優, 星岡賢英, 鈴木雄一朗, 玉城信治, 加藤知爾, 安井 豊, 細川貴範, 土谷 薫, 板倉 潤, 黒崎雅之, 朝比奈靖浩, 泉 並木. 肝表突出型肝細胞癌に対する腹腔鏡下 RFA と人口胸腹水下 RFA の 3 次元構築 CT 画像を用いた比較検討. 第 48 回日本肝臓学会総会(オープンワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 11) 小松信俊, 進藤邦明, 榎本信幸. EOB-MRI 肝細胞相を用いた新しいサーベイランスの可能性～clean liver からの発癌経過～. 第 48 回日本肝臓学会総会(オープンワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 12) 小松信俊, 前川伸哉, 進藤邦明, 三浦美香, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 次世代 deep sequencer を用いた Telaprevir 耐性変異株の検討. 第 48 回日本肝臓学会総会(オープンワーク) 2012.6.8(石川県立音楽堂)
- 13) 中山康弘, 坂本 穰, 榎本信幸. 初発 HCC 患者に対する RFA 治療後の予後の検討. 第 48 回日本肝臓学会総会(ポスター) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 14) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 臨床背景とウイルス変異・宿主ゲノムからみた C 型慢性肝炎に対する治療法選択. 第 48 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 15) 三浦美香, 前川伸哉, 小松信俊, 進藤浩子, 小馬瀬一樹, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析. 第 48 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 16) 進藤邦明, 坂本 穰, 榎本信幸. 肝予備能不良症例への肝癌治療戦略. 第 48 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 17) 鈴木雄一朗, 土谷 薫, 村岡 優, 田中佳祐, 星岡賢英, 玉城信治, 加藤知爾, 安井 豊, 細川貴範, 上田 研, 中西裕之, 板倉 潤, 高橋有香, 黒崎雅之, 朝比奈靖浩, 泉 並木. MDCT, EOB-MRI, Sonazoid CEUS を用いた総合画像診断による術前肉眼分類の有用性. 第 48 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 18) 村岡 優, 加藤知爾, 土谷 薫, 田中佳祐, 鈴木雄一朗, 星岡賢英, 玉城信治, 安井 豊, 細川貴範, 上田 研, 中西裕之, 板倉 潤, 高橋有香, 黒崎雅之, 朝朝比奈靖浩, 泉 並木. C 型肝炎ウイルス陽性肝細胞癌局所根治療法後ペグインターフェロン・リバビリン併用療法における IL-28B 遺伝子多型の臨床的意義. 第 48 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 19) 田中佳祐, 中西裕之, 村岡 優, 星岡賢英, 鈴木雄一朗, 玉城信治, 加藤知爾, 安井 豊, 細川貴範, 土谷 薫, 板倉 潤, 黒崎雅之, 朝比奈靖浩, 泉 並木. 肝表突出型肝細胞癌に対する腹腔鏡下 RFA と人口胸腹水下 RFA の 3 次元構築 CT 画像を用いた比較検討. 第 48 回日本肝臓学会総会(オープンワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 20) 小松信俊, 進藤邦明, 榎本信幸. EOB-MRI 肝細胞相を用いた新しいサーベイランスの可能性～clean liver からの発癌経過～. 第 48 回日本肝臓学会総会(オープンワーク) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 21) 小松信俊, 前川伸哉, 進藤邦明, 三浦美香, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 次世代 deep sequencer を用いた Telaprevir 耐性変異株の検討. 第 48 回日本肝臓学会総会(オープンワーク) 2012.6.8(石川県立音楽堂)
- 22) 中山康弘, 坂本 穰, 榎本信幸. 初発 HCC 患者に対する RFA 治療後の予後の検討. 第 48 回日本肝臓学会総会(ポスター) 2012.6.7(石川県立音楽堂)
- 23) 中山康弘, 坂本 穰, 松田秀哉, 佐藤光明, 小松信俊, 辰巳明久, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. Volume-navigation system を活用した新たな RFA 手技. 第 48 回日本肝臓学会(診療技術セッション 7-3) 2012.7.21 金沢
- 24) 辰巳明久, 中山康弘, 松田秀哉, 佐藤光明, 小松信俊, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 問題症例検討会(治療 6-2) 第 48 回日本肝臓学会 2012.7.21 金沢
- 25) 雨宮史武, 石田泰章, 小松信俊, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 問題症例検討会(治療 6-3) 第 48 回日本肝臓学会 2012.7.21 金沢
- 26) 進藤邦明, 深澤光晴, 小松信俊, 三浦美香, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. ENGBD 挿入下胆嚢冷却 RFA の有用性. 第 48 回日本肝臓学会(ポスター) 2012.7.20 金沢
- 27) 岩本史光, 望月 仁, 川上 智, 久野 徹, 深澤佳満, 廣瀬純穂, 津久井雄也, 細田健司, 星野裕治, 鈴木洋司, 小嶋裕一郎, 廣瀬雄一, 三井照夫, 小俣政男. NBNC 肝癌の臨床的検討—メタボリック肝癌とは?— 第 48 回日本肝臓学会

- (ポスター) 2012.7.20 金沢
- 28) 鈴木雄一朗, 土谷 薫, 村岡 優, 田中佳祐, 星岡英賢, 玉城信治, 加藤知爾, 安井 豊, 細川貴範, 上田 研, 中西裕之, 板倉 潤, 高橋有香, 黒崎雅之, 朝比奈靖浩, 泉 並木. 術前肉眼分類における総合画像診断と主要マーカーの有用性. 第 48 回日本肝癌研究会(ポスター) 2012.7.20 金沢
 - 29) 佐藤光明, 坂本 穰, 辰巳明久, 小松信俊, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 榎本信幸. 肝癌診療における画像情報ネットワークの構築と有用性. 第 48 回日本肝癌研究会(ポスター) 2012.7.21 金沢
 - 30) 小松信俊, 中山康弘, 進藤邦明, 三浦美香, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 大栗実彦, 富永理人, 前島良康, 栗山健吾, 大西洋, 荒木 力, 榎本信幸. 進行肝癌に対する放射線治療の役割. 第 48 回日本肝癌研究会(ポスター) 2012.7.21 金沢
 - 31) 鈴木雄一朗, 黒崎雅之, 泉 並木. 高齢者のインターフェロンリハビリ併用療法における SVR 関連因子. JDDW(日本消化器病学会週間)(ワーク)2012.10.10 神戸
 - 32) 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 高齢 C 型肝炎に対するインターフェロン治療の検討. JDDW(日本消化器病学会週間)(ワーク)2012.10.10 神戸
 - 33) 三浦美香, 前川伸哉, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析. JDDW(日本消化器病学会週間)2012.10.10 神戸
 - 34) 小松信俊, 前川伸哉, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 次世代 Deep sequencer を用いた Telaprevir 耐性変異株の検討. JDDW(日本消化器病学会週間)2012.10.10 神戸
 - 35) 進藤邦明, 前川伸哉, 榎本信幸. 6 か月の画像サーベイランスはNBNC HCC の生存率改善に關与する. JDDW(日本消化器病学会週間) 2012.10.10 神戸
 - 36) 佐藤光明, 坂本 穰, 辰巳明久, 小松信俊, 三浦美香, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. 肝癌診療における画像情報ネットワーク. JDDW(日本消化器病学会週間) 2012.10.10 神戸
 - 37) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 発癌リスクとウイルス排除の可能性から見た最新の C 型肝炎治療. JDDW(日本消化器病学会週間)(シンポ) 2012.10.10 神戸
 - 38) 村岡 優, 黒崎雅之, 泉 並木. 当院における急性肝不全の検討～成因不明例の特徴とガイドラインを用いた肝移植適応～. JDDW(日本消化器病学会週間)(パネル)2012.10.11 神戸
 - 39) 前川伸哉, 三浦美香, 榎本信幸. Deep sequence を用いた PEG-IFN/RBV 療法における HCV の動態解析. JDDW(日本消化器病学会週間)(シンポ)2012.10.11 神戸
 - 40) 津久井雄也, 望月 仁, 星野祐治, 廣瀬雄一, 中山康弘, 松田政徳, 小西利幸, 阿部 徹, 小林正史, 志村和弘, 矢川彰治, 俵 章夫, 雨宮史武, 山崎貴久, 高橋正一郎, 藤井秀樹, 榎本信幸, 小俣政男. Sorafenib 肝癌治療;山梨県多施設共同顕微鏡報告～生存期間に寄与する因子の検討～. JDDW(日本消化器病学会週間) 2012.10.11 神戸
 - 41) 辰巳明久, 進藤邦明, 榎本信幸. 肝硬度を用いた慢性肝疾患における肝発癌リスクの評価. JDDW(日本消化器病学会週間)(ワーク) 2012.10.11 神戸
 - 42) 坂本 穰, 渡邊真里, 井上泰輔, 榎本信幸. 肝炎診療ネットワークにおける肝疾患コーディネーターと肝炎治療サポート外来. JDDW(日本消化器病学会週間)2012.10.10 神戸
 - 43) 中山康弘, 坂本 穰, 松田秀哉, 佐藤光明, 小松信俊, 辰巳明久, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 荒木拓次, 松田政徳, 荒木 力, 藤井秀樹, 榎本信幸. 3cm3 個の基準を超えた HCC の治療方. JDDW(日本消化器病学会週間)2012.10.11 神戸
 - 44) 津久井雄也, 坂本 穰, 高田ひとみ, 田中佳祐, 佐藤光明, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 山本佐織, 安藤典子, 原田和俊, 島田眞路, 榎本信幸. C 型慢性肝炎に対して Peg-IFN α 2b+Ribavirin+Telaprevir 3 剤併用療法を行い、中毒性表皮壊死融解症 (Toxic Epidermal Necrolysis: TEN) を発症した 1 例. 第 51 回日本消化器病学会甲信越支部、第 73 回日本消化器内視鏡学会甲信越支部合同支部例会 2012.11.17 松本
 - 45) 早川 宏, 雨宮史武, 横田雄大, 小林祥司, 小松信俊, 門倉 信, 山口達也, 大塚博之, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本穰, 榎本信幸. 肝細胞癌と門脈血栓症を同時に発症し、ダナパロイドによる門脈血栓治療直後に RFA を行った C 型肝炎肝硬変の一例. 第 51 回日本消化器病学会甲信越支部、第 73 回日本消化器内視鏡学会甲信越支部合同支部例会 2012.11.17 松本
 - 46) Akihisa Tathumi, Nobutoshi Komatsu, Shinya Maekawa, Yukiko Asakawa, Mika Miura, Shunichi Takano, Kuniaki Shindo, Fumitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Taisuke Inoue, Minoru Sakamoto, Nobuyuki Enomoto. Naturally-occurring telaprevir-resistant HCVs and their early response to triple therapy analyzed by ultra-deep sequencing. The 10th JSH Single

Topic Conference Nov.21-22, 2012 Tokyo

- 47) Mika Miura, Shinya Maekawa, Nobutoshi Komatsu, Akihisa Tatsumi, Yukiko Asakawa, Shinichi Takano, Mitsuaki Sato, Kuniaki Shindo, Fumitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Taisuke Inoue, minoru Sakamoto, Nibuyuki Enomoto. An association between quasispecies nature of hepatitis C virus core region and disease progression analyzed by deep sequencing. The 10th JSH Single Topic Conference Nov.21-22, 2012 Tokyo
- 48) 三浦美香, 前川伸哉, 榎本信幸. 次世代シーケンセスを用いた肝発癌症例における HCV ゲノム解析. 第 39 回日本肝臓学会東部会(シンポ) 2012.12.6 東京
- 49) 進藤邦明, 坂本 穰, 榎本信幸. Child-Pugh C 肝硬変患者に対する治療戦略. 第 39 回日本肝臓学会東部会(シンポ) 2012.12.6 東京
- 50) 中山康弘, 進藤邦明, 榎本信幸. Child-Pugh C 肝硬変患者に対する BCAA 投与の有用性. 第 39 回日本肝臓学会東部会 2012.12.6 東京
- 51) 坂本 穰, 井上泰輔, 榎本信幸. 病診連携ネットワークにおける肝疾患コーディネーターと肝炎治療サポート外来. 第 39 回日本肝臓学会東部会(ワーク) 2012.12.6 東京
- 52) 辰巳明久, 進藤邦明, 榎本信幸. 肝硬度を用いた慢性肝疾患における肝発癌リスクの評価. 第 39 回日本肝臓学会東部会(ワーク) 2012.12.7 東京
- 53) 小松信俊, 前川伸哉, 浅川幸子, 辰巳明久, 三浦美香, 雨宮史武, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連した HBV Pre-S 領域の検討. 第 39 回日本肝臓学会東部会 2012.12.6 東京

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

遺伝子発現プロファイルの解析による C 型慢性肝炎を背景にした肝細胞癌発癌機構の検討

分担研究者：藤井秀樹 山梨大学大学院医学工学総合研究部 教授

研究要旨

これまで複数のグループが癌部の遺伝子発現パターンによる HCC のサブクラス分類を報告してきた。昨年度まで我々は HCV 関連 HCC の発癌に炎症や酸化ストレスなど非癌部の因子も発癌に重要な役割を果たしていることを踏まえ、これらのサブクラスに相当する症例の非癌部で特徴的に発現している遺伝子の解析を行ってきた。

今回の検討はその続きとして、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につき検討を行った。その結果、良好な予測が期待できる 8 つの遺伝子から成るモデルが構築された。

A. 研究目的

近年、癌部の遺伝子発現パターンより肝細胞癌の分類が可能であることが複数の研究グループより報告されてきた。本研究では各サブクラスの非腫瘍部での遺伝子発現パターンを比較し、分子生物学的特性を明らかにすることを目的とする。また、非腫瘍部の遺伝子発現パターンからも前述の分類が可能であると考えられ、サブクラスの統計学的予測モデルを作成する。

B. 研究方法

対象は 2000 年から 2007 年までに当科で根治的切除術が行われた HCV 関連 HCC 患者 40 例である。これに加え、転移性肝癌症例 8 例も対照群として含めた。

①マイクロアレイを用いて、癌部・非癌部の遺伝子発現プロファイルを得る。

②癌部遺伝子発現プロファイルを用いて、当研究の症例を既知の 3 つのサブクラスに分類する。

③当研究の症例をもちいて②で行ったクラス分類の非癌部の遺伝子発現プロファイルによる予測を行う。非癌部の遺伝子発現プロファイルと癌部のサブクラスデータを RandomForest にアプライし、予測モデルを構築する。Cross-validation で予測モデルの精度を検討し、モデルに用いた全遺伝子の重要度をスコ

ア化する。スコアが低い遺伝子を除去したものを新しい遺伝子発現プロファイルとして再度 RandomForest にアプライし、予測性能を検討する。これを繰り返して予測性能が最高になる遺伝子群を抽出する。

C. 研究結果

遺伝子の数が減少するにつれて予測精度は徐々に上がり、8 個の遺伝子で予測性能が最高となった。これよりも少なくなると予測精度は急速に低下した。

Cross-validation による予測精度の検証では misclassification error はわずか 5%であった。

予測モデルに用いられた遺伝子は TSPAN1、SMUG1、CRTC2、SLC22A9、DIS3L2、BAHCC1、B3GNT8、および A_24_P66548（プローブ名のみ）であった。選択された遺伝子でクラスター解析を行ったところ、今回の検討に用いた症例はほぼサブクラスに一致したのクラスターに分類された。

D. 考察

HCC には背景肝の異常が発癌に関与しているという見地から、非癌部の遺伝子発現パターンによる癌部のサブクラス分類の予測を試みた。昨年 の 検 討 で は Prediction Analysis of Microarray (PAM) を用い

たが、満足のいく予測性能は得られなかった。そこで近年精度の高いモデルを作成できるとして注目されている Random Forest を用いた。Random Forest ではランダムに選択されたサンプルと遺伝子を tree model (予測木) にあてはめて予測モデルを作成し、選択されなかったのサンプルをこのモデルに当てはめてそのサブクラスを予測する。1つの tree model の性能は低いですが、これを何度も繰り返してより強固な予測モデルを作る。また各遺伝子の予測に対する重要度が Gini 係数でスコア化されるので、この結果を用いて遺伝子数を調節した。結果、8つの遺伝子で作られるモデルで95%の予測精度がみられた。これはすなわち非癌部における遺伝子変化が癌のサブタイプを決定する一つの要素になっている可能性を示唆するものであり、当教室の提唱する炎症性発癌の一つの裏付けになるといえる。また予測に用いられた遺伝子のうち、TSPAN31 は細胞発達、成長や運動を調整しており、発癌に関連していた。SMUG1 は DNA の修復に関連、CRTC2 は cAMP 関連のタンパクが標的とする遺伝子の転写を制御しているなど、遺伝子そのものの働きも興味深いものであった。

今回の検討では予測モデルの性能を Random Forest に内蔵されている Cross-validation で検討しており精度の信頼性は保たれるが、今後別個のサンプルでさらに検証する必要がある。

E. 結論

非癌部遺伝子発現パターンで癌部のサブクラスを予測することが可能であった。予測性能を測るため、別個のサンプルを用い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

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

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

HCV サブゲノムレプリコン細胞を用いて、海洋生物抽出物ライブラリーより HCV 複製阻害活性を有するものの検索を行った。その結果、沖縄産カイメン *Amphimedon* sp の酢酸エチル抽出分画 (C-29EA) に、強い HCV 複製阻害活性があることを見出した。更に、C-29EA は NS3 ヘリカーゼ及びプロテアーゼの阻害活性を有することを見出した。また、C-29EA はインターフェロン- α と相乗的に HCV 複製を阻害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、DAA 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 ヘリカーゼをターゲットタンパクとして、その検索を行う。

本年度は、レプリコン細胞を用いて、抗 HCV 活性を持つ海洋生物抽出物のスクリーニングを行い、ヒットしたものについてその抑制機序の詳細な検討を行った。

B. 研究方法

1) *In vitro* NS3 Helicase assay

Photoinduced Electron Transfer (PET) 法では

5-UAGUACCGCCACCCUCAGAAC-

CUUUUUUUUUUUUUU-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'-TAGTACCGCCACCCUCAGAACC-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/ORN3-5B #24 細胞 (0 株) を用いた。

5) レプリコン細胞を用いた HCV 増殖抑制試験

抗 HCV 効果は、検討サンプル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。

6) 細胞毒性試験

細胞毒性試験は、検討サンプル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。

7) ウイルス増殖抑制試験

ウイルス増殖抑制試験は、JFH-1 を用いて focus forming assay 及び real-time PCR 法により検討を行った。

C. 研究結果

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スクリーニング

沖縄近海に生息する海洋生物 (54 種) のメタノール及び酢酸エチル抽出物、計 84 サンプルについて、一次スクリーニングとして 0 株及び Con1 株のサブゲノミックレプリコン細胞を用いて、海洋抽出物終濃度 25 μ g/ml における HCV 複製阻害活性を検討した。細胞生存率 85%以上、ルシフェラーゼ活性 15%以下のものをヒット抽出物と定義した結果、沖縄県 西表島近海由来 カイメン *Amphimedon* sp の酢酸エチル抽出分画 C-29EA がヒット抽出物として得えられた (図 1)。

次に、Con1 株及び JFH-1 株のサブゲノミックレプリコン細胞を用いて、C-29EA の濃度依存的な抑制活性を検討した。その結果、C-29EA は Con1 株及び JFH-1 株レプリコン細胞において、濃度依存的に HCV 複製を阻害した。更に、Con1 株の EC50 は 1.5 μ g/ml に対して、JFH-1 株の EC50 は 24.9 μ g/ml であった。また、2 つレプリコン細胞における C-29EA の CC50 は >50 μ g/ml であり、検討した濃度では細胞毒性は見られなかった (表 1)。

HCVcc システムを用いて C-29EA の抑制効果を検討したところ、濃度依存的に抑制した。(図 2)。

2) C-29EA の HCV NS3 ヘリカーゼ及びプロテアーゼ活性阻害効果

C-29EA が HCV NS3 ヘリカーゼの RNA unwinding 活性を阻害するかについて、蛍光法及び RI 法の *in vitro* RNA unwinding 活性測定法を用いて検討を行った。その結果、C-29EA は濃度依存的に RNA unwinding 活性を阻害した。また、その IC50 は 18.9 μ g/ml であ

った (図 3)。次に、C-29EA が NS3 A T P ase 活性を阻害するかについて検討を行った。その結果、A T P ase の活性は阻害しなかった (図 4)。更に、C-29EA が NS3 タンパクと RNA との結合を阻害するか検討を行った。その結果、C-29EA は NS3 と RNA との結合を阻害することが判った (図 5)。

C-29EA が HCV NS3 プロテアーゼ活性を阻害するかについて、*in vitro* NS3 プロテアーゼ活性測定法を用いて検討を行った。その結果、C-29EA は濃度依存的に NS3 プロテアーゼ活性を阻害した。また、その IC50 は 10.9 μ g/ml であった (図 6)。

3) C-29EA とインターフェロン- α と相乗効果

C-29EA とインターフェロン- α との相乗効果について Con1 株サブゲノミックレプリコン細胞を用いて検討を行った。その結果、C-29EA は、HCV 複製阻害においてとインターフェロン- α との相乗効果を示した (図 7)。

D. 考察

本年度は、一次スクリーニングの方法の変更を試みた。具体的には、HCV サブゲノミックレプリコン細胞を用いて、複製阻害活性を有する海洋生物抽出物の探索する方法を一次スクリーニングの方法とした。その結果、カイメン *Amphimedon* sp の酢酸エチル抽出分画 C-29EA に強い阻害活性があることを見出した。*In vitro* NS3 ヘリカーゼ測定法を一次スクリーニング法として用いた時に比べ、ヒット率は下がったが、レプリコン細胞において抑制効果の高い海洋生物抽出物を見出すことが出来た。

次に、その抑制機序についての解析を行ったところ、HCV NS3 ヘリカーゼ及びプロテアーゼの 2 つ酵素活性を抑制することを見出した。従って、C-29EA の HCV 複製阻害活性は、この 2 つの酵素活性を阻害することに起因するものと考えられる。更に、C-29EA とインターフェロン- α との相乗効果について Con1 株サブゲノミックレプリコン細胞を用いて検討したところ、複製阻害効果の相乗効果が見られた。

現在、この抽出物の分画・精製を行い、抑制化合物の単離を進めている。

E. 結論

カイメン *Amphimedon* sp の酢酸エチル抽出分画 C-29EA に強い HCV 複製阻害活性があることを見出した。また、C-29EA は HCV NS3 ヘリカーゼ及びプロテアーゼの 2 つ酵素の活性を阻害することを見出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamashita A, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Fujita Y, Fujimoto Y, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Tanaka J, Moriishi K.
Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*.
Mar Drugs. 2012;10:744-61.

Fujimoto Y, Salam KA, Furuta A, Matsuda Y, Fujita O, Tani H, Ikeda M, Kato N, Sakamoto N, Maekawa S, Enomoto N, de Voogd NJ, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Akimitsu N, Noda N, Yamashita A, Tanaka J, Moriishi K.
Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp.
PLoS One. 2012;7:e48685

Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Tani H, Tanaka J, Akimitsu N.
Inhibition of hepatitis C virus NS3 helicase by manoalide.
J Nat Prod. 2012;75(4):650-4.

Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.

Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology Res*. in press 2013

Shindo H, Maekawa S, Kamatsu N, Kamase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoe T, Sakamoto N, Yamashita A, Moriishi K, Enomoto N.

IL-28B and IFN-alpha synergistically inhibit HCV replication. *J Viral Hepatitis* in press 2013

Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Tani H, Tanaka J, Akimitsu N.

Psammaphin A inhibits hepatitis C virus NS3 helicase. *J Nat Med*. in press 2013

Furuta A, Salam KA, Akimitsu N, Tanaka J, Tani H, Yamashita A, Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N.

Cholesterol sulfate as a potential inhibitor of hepatitis C virus NS3 helicase.
J Enzyme Inhib Med Chem. in press 2013

2. 学会発表

藤本 雄介、山下 篤哉、池田 正徳、
加藤 宣之、森石 恆司
海綿動物 *Amphimedon* sp. 抽出画分による HCV NS3 プロテアーゼ・ヘリカーゼ活性阻害の解析
第 60 回日本ウイルス学会, 大阪, 平成 24 年 11 月

山下 篤哉、沈 暉、葛西 宏威、藤本 雄介、森石 恆司

Caffeic acid phenethyl ester とその類縁化合物による HCV ゲノム複製阻害効果の検討
第 60 回日本ウイルス学会, 大阪, 平成 24 年 11 月

古田 篤史, Kazi Abdus Salam, 秋光 信佳, 田中 淳一, 谷 英典, 山下 篤哉,
森石 恆司, 中越 雅道、津吹 政可、