

- 138) Mika Miura, Shinya Maekawa, Makoto Kadokura, Ryouta Sueki, Kazuki Komase, Hiroko Shindo, Kuniaki Shindo, Fumitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Takatoshi Kitamura, Tomoyoshi Uetake, Taisuke Inoue, Minoru Sakamoto, Syun-ichi Okada, Nobuyuki Enomoto. Investigation for viral genomic regions associated to hepatocarcinogenesis in hepatitis C. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Sep.10-14, 2010 Yokohama
- 139) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた C 型慢性肝炎に対する治療戦略. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(パネル) 2010.10.14 横浜
- 140) 雨宮史武, 前川伸哉, 榎本信幸. HCV 増殖における細胞内脂質の重要性. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(パネル) 2010.10.14 横浜
- 141) 進藤邦明, 井上泰輔, 榎本信幸. 山梨県における日本住血吸虫症の現状と慢性肝疾患に与える影響. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ワーク) 2010.10.13 横浜
- 142) 佐藤光明, 進藤邦明, 榎本信幸. 初発肝細胞癌早期発見、早期治療のためのスクリーニング期間. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ワーク) 2010.10.14 横浜
- 143) 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. IL28B SNP による PEG-IFN/RBV 療法における HCV 動態変化の検討. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ワーク) 2010.10.14 横浜
- 144) 進藤浩子, 雨宮史武, 小馬瀬一樹, 門倉 信, 末木良太, 三浦美香, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. HCV replicon におかる IFN λ の HCV 増殖抑制効果の検討. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ポスター) 2010.10.13 横浜
- 145) 門倉 信, 前川伸哉, 末木良太, 三浦美香, 雨宮史武, 北村敬利, 植竹智義, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 中川美奈, 坂本直哉, 榎本信幸. ゲノム全長解析による genotype2b 型 HCV における治療効果規定の検索. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ポスター) 2010.10.13 横浜
- 146) 辰巳明久, 北村敬利, 雨宮史武, 岩本史光, 進藤邦明, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 肝硬度からみた慢性肝疾患からの発癌リスクの評価. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ポスター) 2010.10.13 横浜
- 147) 三浦美香, 前川伸哉, 末木良太, 門倉 信, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. 肝発癌に関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ポスター) 2010.10.13 横浜
- 148) 小松信俊, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 早期肝細胞癌診断における Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 検査の有用性. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ポスター) 2010.10.13 横浜
- 149) 高橋 英, 雨宮史武, 進藤邦明, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 肝細胞癌に対する放射線治療～放射線治療は肝細胞癌治療のアルゴリズムになり得るか. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ポスター) 2010.10.13 横浜
- 150) 末木良太, 前川伸哉, 三浦美香, 門倉 信, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. B 型肝炎における核酸アナログ導入後の肝発癌臨床の変化. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ポスター) 2010.10.14 横浜
- 151) 小馬瀬一樹, 前川伸哉, 進藤浩子, 門倉 信, 末木良太, 三浦美香, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. Cytokine Array 解析を用いた HCV の PEG-IFN+RBV 治療効果と関連する宿主因子の同定. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ポスター) 2010.10.14 横浜
- 152) 中山康弘, 坂本 穰, 進藤邦明, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. 臨床背景、腫瘍因子、背景肝病変からみた非 B 非 C 型肝炎の現状と問題点. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会(ポスター) 2010.10.14 横浜
- 153) 井上泰輔, 末木良太, 雨宮史武, 北村敬利, 植竹智義, 坂本穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. エンテカビル投与症例における HB コア関連抗原値測定による病態の検討. JDDW2010 第 52 回日本消化器病学会大会(ポスター) 2010.10.14 横浜
- 154) 坂本 穰. C 型肝炎に対する治療のテーラーメイド戦略. JDDW2010 ランチョン 2010.10.16 横浜
- 155) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異(とくに IRRDR)と宿主ゲノム解析からみた C 型肝炎に対する治療戦略. 第 38 回日本肝臓学会東部会(パネル) 2010.12.3 東京
- 156) 小松信俊, 雨宮史武, 榎本信幸. EOB-MRI 肝細胞相で低信号を呈する乏血性結節の治療方針. 第 38 回日本肝臓学会東部会(ワーク) 2010.12.2 東京
- 157) 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. ウイルス肝炎診療ネットワークの構築. 第 38 回日本肝臓学会東部会(ワーク) 2010.12.3 東京
- 158) 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 肝細胞癌早期発見のために～適切なサーベイランス期間の検討. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.2 東京

- 159) 雨宮史武, 辰巳明久, 榎本信幸. 肝硬度を用いた肝細胞癌発癌のリスクの評価. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京
- 160) 進藤浩子, 雨宮史武, 小馬瀬一樹, 門倉 信, 末木良太, 三浦美香, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. HCV replicon における IFN λ の HCV 増殖抑制効果の検討. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京
- 161) 三浦美香, 前川伸哉, 門倉 信, 末木良太, 進藤邦明, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 雨宮史武, 中山康弘, 植竹智義, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 肝炎の進展、癌化と関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京
- 162) 浅川幸子, 坂本 穰, 佐藤光明, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた IFN 単独療法の位置づけ. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京
- 163) 中山康弘, 坂本 穰, 榎本信幸. 非ウイルス性肝細胞癌の予後と背景因子の検討. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京
- 164) 佐藤光明, 中山康弘, 榎本信幸. 進行肝細胞癌に対するソラフェニブ療法の治療経験. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 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。HCV 関連 HCC は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、今回我々は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た。解析の結果、異常な細胞増殖を来すタイプの HCC の非癌部では炎症や線維化といった因子が、 β -カテニンの変異を来すタイプの HCC の非癌部ではアポトーシス関連の因子が関連している可能性が示唆された。特に非癌部 MAGEH1 の低発現と癌部 β -カテニンの変異との関連が示唆された。

また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 1) ~ 3)。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各サブクラスに該当する症例の非癌部での遺伝子発現パターンで比較検討し、各サブクラスに特異的に発現している遺伝子を特定、それをもとに各サブクラスの分子生物学的特徴を探る。

- ④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

- (1) 本研究に用いるサブクラスの定義と対象症例のサブクラス分類
Boyault ら 1)、Chiang ら 2)、および Hoshida ら 3) の報告を参考にし、癌部遺伝子発現パターンによる HCC のサブクラスを Class 1, Class 2, Class 3 の 3 つと定義した。Class 1 は Chiang らの Proliferation Class に、Class 2 は CTNNB1 Class に、Class 3 はその他に相当する。マイクロアレイに耐えうる十分な quality をもった RNA の抽出が可能であった HCV

関連 HCC40 症例の凍結サンプルを用い、マイクロアレイによる癌部・非癌部の遺伝子発現プロファイルを得た。

前述の複数の報告の遺伝子発現データと対象 40 症例の癌部遺伝子発現データ用い、Prediction analysis of microarray (PAM) で対象症例をサブクラス分類したところ、12 例が Class 1 に、12 例が Class 2 に、16 例が Class 3 に分類された。

(2) 各サブクラスの臨床学的、腫瘍学的特徴の検討

対象症例の臨床データ、病理データなどを用いて、これらのサブクラスの臨床学的、腫瘍学的特徴を分析した。 α -フェトプロテイン (AFP) が Class 1 で有意に高値であり、この結果は過去の報告と合致するものであった。

その他のパラメータではサブクラス間で統計学的有意差を示すものはなかった。

(3) 非癌部における各サブクラスの特徴的遺伝子の探索

対象症例の非癌部遺伝子発現プロファイルを用いてサブクラスに特徴的に発現している遺伝子を同定した。Significance Analysis of Microarray (SAM) をアルゴリズムとして使用し、目的のサブクラスと他のサブクラス、目的のサブクラスと対照群 (転移性肝癌) の両方で有意に発現パターン異なる遺伝子を目的の遺伝子とした。FDR<0.3 を有意差ありとしたところ、Class 1 で 1855, Class 2 で 12, Class 3 で 165 の遺伝子が選択された。

(4) 各サブクラスの特徴的遺伝子からの分子生物学的特性の検討

選択された遺伝子群で overrepresent していると考えられる Gene Ontology (GO) category を Hypergeometric test で検討した。表 4 に示すように Class 1 では主に炎症や免疫反応に関連するカテゴリーが上位にランクされた。Class 2 ではアポトーシスや DNA の修復に関連するカテゴリーが有意差ありとして浮かび上がった。Class 3 ではリンパ球や白血球の活性化に関連するカテゴリーが有意差ありとして選択された。

(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、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 Random Forest 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。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。

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。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、免疫染色の結果から、この遺伝子と β -カテニンの変異との間に何らかの関連が示唆

された。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。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のサブクラス分類の予測を試みた。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

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。また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

【参考文献】

①Boyault S, et al: Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007 Jan;45(1):42-52

②Chiang D, et al: Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008 Aug 15;68(16):6779-88.

③Hoshida 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.

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

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、本研究では以下の 2 つの目的で研究を行った。

- 1) これまで治療薬開発がなされていない NS2/3 プロテアーゼ阻害剤の研究開発基盤を構築する。
- 2) 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

上記の目的で 3 年間の研究を行い、以下のような結果を得た。

- 1) NS2/3 プロテアーゼ阻害剤の候補化合物については、in silico screening 法を用いて 57 種を選択した後、NS2/3 プロテアーゼ阻害活性及び HCV 複製阻害活性について検討を行った。しかしながら、有力な阻害剤の候補化合物を見出すことが出来なかった。
- 2) 海洋生物抽出物をライブラリーソースとしてスクリーニングを行った結果、ウミシダ *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画に、NS3 ヘリカーゼ活性及び HCV 複製阻害活性があることを見出した。また、カイメン *Amphimedon* sp の酢酸エチル抽出分画に、NS3 ヘリカーゼ、NS3 プロテアーゼ、及び HCV 複製阻害活性があることを見出した。

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。猶、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。

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
フルゲノムレプリコン OR6 細胞(0 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-

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’

-TAGTACCGCCACCTCAGAACC-3’ と混合し、LightCycler

1.5 (Roche)にて蛍光強度を測定し、NS3 ヘリカーゼ

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物を混合し、37°C1 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

洋生物抽出物精製物を混合し、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、Huh7 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。

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

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 μ M 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。これらのヒット化合物について in vitro NS2/3 プロテアーゼ活性測定系を用いて NS2/3 プロテアーゼの阻害活性を検討したが、抑制活性を有するものはなかった。

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). ウミシダ *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 ヘリカーゼ測定系を用いて、NS3 ヘリカーゼ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。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 ヘリカーゼ阻害活性が見られた。更に、SG1-23-1 は NS3 タンパクと RNA との結合を阻害するが、NS3 ATPase の活性は阻害しなかった。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。

2). カイメン *Amphimedon sp* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 O 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 25ug/ml における HCV 複製阻害活性を検討した。細

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 μ M 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。これらのヒット化合物について in vitro NS2/3 プロテアーゼ活性測定系を用いて NS2/3 プロテアーゼの阻害活性を検討したが、抑制活性を有するものはなかった。

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). ウミシダ *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 ヘリカーゼ測定系を用いて、NS3 ヘリカーゼ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。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 ヘリカーゼ阻害活性が見られた。更に、SG1-23-1 は NS3 タンパクと RNA との結合を阻害するが、NS3 ATPase の活性は阻害しなかった。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。

2). カイメン *Amphimedon sp* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 O 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 25ug/ml における HCV 複製阻害活性を検討した。細

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 μ M 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。これらのヒット化合物について in vitro NS2/3 プロテアーゼ活性測定系を用いて NS2/3 プロテアーゼの阻害活性を検討したが、抑制活性を有するものはなかった。

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). ウミシダ *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 ヘリカーゼ測定系を用いて、NS3 ヘリカーゼ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。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 ヘリカーゼ阻害活性が見られた。更に、SG1-23-1 は NS3 タンパクと RNA との結合を阻害するが、NS3 ATPase の活性は阻害しなかった。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。

2). カイメン *Amphimedon sp* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 O 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 25ug/ml における HCV 複製阻害活性を検討した。細

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 μ M 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。これらのヒット化合物について in vitro NS2/3 プロテアーゼ活性測定系を用いて NS2/3 プロテアーゼの阻害活性を検討したが、抑制活性を有するものはなかった。

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). ウミシダ *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 ヘリカーゼ測定系を用いて、NS3 ヘリカーゼ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。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 ヘリカーゼ阻害活性が見られた。更に、SG1-23-1 は NS3 タンパクと RNA との結合を阻害するが、NS3 ATPase の活性は阻害しなかった。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。

2). カイメン *Amphimedon sp* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 O 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 25ug/ml における HCV 複製阻害活性を検討した。細

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 μ M 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。これらのヒット化合物について in vitro NS2/3 プロテアーゼ活性測定系を用いて NS2/3 プロテアーゼの阻害活性を検討したが、抑制活性を有するものはなかった。

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). ウミシダ *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 ヘリカーゼ測定系を用いて、NS3 ヘリカーゼ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。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 ヘリカーゼ阻害活性が見られた。更に、SG1-23-1 は NS3 タンパクと RNA との結合を阻害するが、NS3 ATPase の活性は阻害しなかった。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。

2). カイメン *Amphimedon sp* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 O 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 25ug/ml における HCV 複製阻害活性を検討した。細

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 μ M 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。これらのヒット化合物について in vitro NS2/3 プロテアーゼ活性測定系を用いて NS2/3 プロテアーゼの阻害活性を検討したが、抑制活性を有するものはなかった。

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). ウミシダ *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画の抗 HCV 活性

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 ヘリカーゼ測定系を用いて、NS3 ヘリカーゼ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。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 ヘリカーゼ阻害活性が見られた。更に、SG1-23-1 は NS3 タンパクと RNA との結合を阻害するが、NS3 ATPase の活性は阻害しなかった。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。

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られた。更に、C-29EA は、Con1 株及び JFH-1 株のサブゲノミックレプリコン細胞において、C-29EA 濃度依存的に抑制活性を示した。また、HCVcc システムを用いて C-29EA の抑制効果を検討したところ、濃度依存的に抑制効果があることが判った。

C-29EA は、HCV NS3 ヘリカーゼ阻害活性を示した。更に、C-29EA は NS3 タンパクと RNA との結合を阻害するが、NS3 ATPase の活性は阻害しなかった。また、C-29EA は HCV NS3 プロテアーゼ阻害活性も有することが判った。

C-29EA とインターフェロン- α との相乗効果について検討を行ったところ、C-29EA は HCV 複製阻害においてインターフェロン- α との相乗効果を示した。

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 種について、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、これらの化合物について、NS2/3 プロテアーゼの阻害活性を検討したが抑制活性を有するものはなかった。

今後は、海洋生物抽出物をライブラリーソースとし、NS2/3 プロテアーゼの阻害活性を有する化合物の探索を行う予定である。

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

海洋生物抽出物ライブラリーから、抗 HCV 活性を有する海洋生物抽出物の検索を行った。その結果、ウミシダ *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画 SG1-23-1、カイメン *Amphimedon* sp の酢酸エチル抽出分画 C-29EA に強い抗 HCV 活性があることを見出した。

それぞれ海洋生物抽出物について、その抑制機序についての解析を行った。その結果、SG1-23-1 は HCV NS3 ヘリカーゼを抑制、また、C-29EA は NS3 ヘリカーゼ及びプロテアーゼの 2 つ酵素活性を抑制した。従って、SG1-23-1 は HCV NS3 ヘリカーゼを抑制することにより、C-29EA は 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により、HCV の複製を阻害することが考えられる。

現在、これら抽出物の分画・精製を行い、抑制化合物の単離を進めている。

E. 結論

1) NS2/3 プロテアーゼをターゲットタンパクとして、In silico screening よって候補化合物を選択し、その抗 HCV 活性を検討したが、抑止活性が強いものを見出すことが出来なかった。

2) 抗 HCV 活性を有する海洋生物抽出物の検索を行った。その結果、ウミシダ *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画、カイメン *Amphimedon* sp の酢酸エチル抽出分画に抗 HCV 活性があることを見出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takaya D, Yamashita A, Kamijo 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

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. Hepatol 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

山下 篤哉、古田 篤史、松田 泰嘉、谷 英典、藤田 統、秋光 信佳、田中 淳一、池田 正徳、加藤 宣之、前川 信哉、榎本 信幸、伊藤 正彦、森石 恆司、常田 聡、関口 勇地、野田 尚宏

沖縄産ウミシダ (Alloeocomatella polycladia) 抽出物の抗 HCV NS3 helicase 阻害活性による HCV 増殖抑制効果

第 58 回日本ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月

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

Kunihiko 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
Psammaphin 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

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、

谷 英典, 関口 勇地, 常田 聡, 野田 尚宏

海洋生物抽出物より取得した複数種の硫酸化合物に
よる C 型肝炎ウイルス NS3 helicase 阻害作用

第 64 回日本生物工学会大会, 神戸, 平成 24 年 10
月

後藤才郎, 照沼脩, 黒崎久仁彦, 植田信太, 王瀝,
Acuna Victor, Celta Gomez-Trejo, Julio Granados,
杉山三郎, 山下篤哉,

黒崎直子

メキシコ先住民族における HBV 感染および遺伝子型
の分析 (第 2 報)

第 35 回日本分子生物学会, 福岡, 平成 24 年 12 月

葛西 宏威, 河上 國洋, 平田 有佳理, 山下 篤
哉, 池田 正徳, 加藤 宣之,

岡本 徹, 松浦 善治, 楠木 正巳,

森石 恆司

HCV 複製増殖に関わる新規宿主因子 FKBP6:FKBP6 は
NS5A と結合し HCV 複製を制御する
第 35 回日本分子生物学会, 福岡, 平成 24 年 12 月

Atsuya Yamashita, Nobuyoshi Akimitsu, Naohiro Noda,
Satoshi Tsuneda, Masayoshi Tsubuki, Nobuyuki
Enomoto, Junichi Tanaka, Kohji Moriishi.

Inhibition of hepatitis C virus replication and viral
helicase by ethyl acetate extract of the marine feather
star *Alloeocomatella polycladia*.

25th International Conference on Antiviral Research,
April 2012, Sapporo.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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

分担研究者：松本武久 理化学研究所 上級研究院

研究要旨

HCV NS2-3 プロテアーゼを NS3-4A プロテアーゼに続く新たな C型肝炎治療薬の標的分子として、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活性を評価するためのスクリーニング系を開発した。HCV ポリペプチドの一部である p7/NS2/NS3/NS4A/NS4A-B junction を領域とするポリペプチドのフォールディングとプロセッシングを細胞内環境において実現させ、細胞内で発現した NS2-3, NS3-4A プロテアーゼによるポリペプチドプロセッシング活性を反映するレポーターアッセイ系を構築した。さらに化合物の、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、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条件を最適化したアッセイ系を構築した。ふたつのアッセイ系を二次および三次スクリーニング系として、一次スクリーニングである HCV 全長ゲノムレプリコンアッセイあるいは HCV 増殖阻害試験、HCV トランスパッケージングシステムによるアッセイでヒットした 6 化合物を評価した。いずれも NS2-3 プロテアーゼ阻害活性は検出されなかった。しかしながらこれらの化合物のうち、HCV トランスパッケージングシステムによるアッセイと HCV 増殖阻害試験の両アッセイでヒットした 1 化合物は NS2 分子による NS2-3 プロテアーゼ活性非依存性のウイルス粒子形成に関わる機能を直接的に阻害する可能性が残る。

A. 研究目的

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。

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の二次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。さらに二次スクリーニングでヒットした化合物については、さらに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て、直接的な NS2-3 プロテアーゼ阻害活性を評価できるア

ッセイ系を確立し、これを三次スクリーニングとしてヒット化合物の活性を評価する。

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变化を測定するレポーターアッセイ系を完成させ、化合物の NS2-3 プロテアーゼ阻害活性あるいは NS3-4A プロテアーゼ阻害活性を測定した。インシリコスクリーニングで探索された活性阻害剤候補低分子化合物のうち、一次スクリーニングとしての、ウイルスの完全長ゲノムレプリコンアッセイ、HCV 増殖阻害試験、あるいは HCV トランスパッケージングシステムによるアッセイでヒットした化合物について、二次スクリーニングとしてのレポーターアッセイを実施した。さらに、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、触媒反応条件を最適化したアッセイ系を完成させ、二次スクリーニングでもヒットした化合物の直接的な NS2-3 プロテアーゼ阻害活性を評価した。

C. 研究結果

本研究では NS2-3 プロテアーゼ活性を阻害する化合物のスクリーニングに利用できる二種類のアッセイ系を確立した。そのひとつは細胞内発現 NS2-3、NS3-4A プロテアーゼによるポリペプチドプロセッシング活性を反映するリポーターアッセイ系で、浮遊性培養細胞株 HeLa S3 に GAL4 を上流に配するレポーター遺伝子としてのホタルルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子と、CMV プロモーターの下流に p7/NS2/NS3/NS4A/NS4A-B junction 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遺伝子を導入した。さらにこの細胞に、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 $1.6 \cdot \text{M}$ 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 $30 \cdot \text{M}$ で、両値の比率で示す selectivity Index は 18.8 であった。もう一つのアッセイ系では、大腸菌セルフリー合成系で NS2-3 プロテアーゼタンパク質を合成し、化合物による直接的な NS2-3 プロテアーゼ阻害活性を評価できるように、合成反応条件および合成後タンパク質の触媒反応条件の最適化を実施した。その結果、以下のようなことが明らかになった。

- ①NS2-3 プロテアーゼタンパク質の合成量、可溶性およびプロテアーゼ比活性は、合成反応液に添加する界面活性剤に依存する。
- ②NS2-3 プロテアーゼタンパク質の合成およびフォールディングには、界面活性剤としてジギトニンを濃度依存的に必要とする。
- ③NS2-3 プロテアーゼタンパク質のプロテアーゼ活性は亜鉛イオン濃度に依存する。
- ④NS2-3 プロテアーゼ活性は NS3-4A プロテアーゼ活性に依存しない。

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、理研が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 増殖阻害試験および HCV trans-packaging system によるアッセイでヒットした NS2-3 プロテア

ーゼ活性に依存しない 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 化合物のうち化合物#25, #42 および#47 が、レポーターアッセイで測定した IC50 値は 50 μ M 以下で、細胞毒性を示すことなくほぼ同等の阻害活性を示した。次に大腸菌セルフリー合成系で合成した NS2-3 プロテアーゼタンパク質を用いたアッセイでは、3 化合物(#25, #42 および#47) の直接的な NS2-3 プロテアーゼ阻害活性は検出されなかった。

D. 考察

これまで、NS2-3 プロテアーゼを標的とした阻害剤スクリーニング系の発表はごくわずかであり、大腸菌の菌体内で不溶性に発現させた後に、リフォールディングによって活性化した NS2-3 プロテアーゼタンパク質を用いた測定は、そのリフォールディングの再現性が低いことから、安定したアッセイ系としては利用が躊躇われてきた。再現性が高い NS2-3 プロテアーゼ活性のアッセイ系としては、ウサギ網状赤血球破碎液内で放射性同位元素を取り込ませながらごく微量に発現させた上で測定する方法のみであり、スクリーニング系への応用は困難であった。本研究では、細胞内で発現した NS2-3, NS3-4A プロテアーゼによるポリペプチドプロセッシング活性を反映するレポーターアッセイ系を構築した。これにより、細胞内で NS2-3, NS3-4A プロテアーゼのそれぞれの活性に対する阻害剤をハイスループットにスクリーニングできるようになった。さらには、大腸菌セルフリー合成系を用いることにより、比活性が高い NS2-3 プロテアーゼタンパク質を効率よく大量合成し、触媒反応条件の最適化を図ることにより、合成後の触媒反応を制御することが可能になった。これにより、NS2-3 プロテアーゼの生化学的プロフィールをさらに詳細に解析できるだけでなく、NS2-3 プロテアーゼ活性阻害剤候補化合物のスクリーニングにも使用できる。ただし、最終的な触媒反応産物の検出には、SDS-PAGE とウェスタンブロットのようなロースループットな工程を経なければいけないことから、大腸菌セルフリー合成した NS2-3 プロテアー

ゼタンパク質を用いたアッセイ系のハイスループット化には、検出面で解決すべき課題が残っている。本研究では、ウイルス増殖阻害あるいはレプリコン複製阻害 (#25, #42 および#47) が確認されたのち、レポーターアッセイでもヒットした 3 化合物は、いずれも NS2-3 プロテアーゼ活性を直接には阻害しなかった。ただし、#42 はウイルス増殖阻害試験と HCV trans-packaging system によるアッセイでヒットした化合物であることから、NS2 に直接結合してウイルス粒子形成を阻害する可能性が残る。

E. 結論

- ①細胞内で発現した NS2-3, NS3-4A プロテアーゼによるポリペプチドプロセッシング活性を反映するレポーターアッセイ系を構築し、細胞ベースでのハイスループットな NS2-3, NS3-4A プロテアーゼに対するそれぞれの阻害剤をスクリーニングすることが可能になった。
- ②大腸菌セルフリー合成系で合成した NS2-3 プロテアーゼタンパク質を用いることにより、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確立した。
- ③NS2 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 5 6 種類のうち、#42 は NS2-3 プロテアーゼ活性を直接には阻害しないが、NS2 に直接結合してウイルス粒子形成を阻害する可能性がある。

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, Kamijo 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

「誘導適合を考慮したバーチャルスクリーニングによる新規 HCV NS3-4A プロテアーゼ阻害剤の探索」
高谷大輔、上條加寿恵、山下篤哉、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、脇田隆字、榎本信幸、伊藤正彦、本間光貴、梅山秀明、松本武久、横山茂之。第 38 回構造活性相関シンポジウム。2010 年 10 月 30 日。
徳島大学工学部共通講義棟

「Establishment of a cell-based assay for evaluation of compounds against HCV NS2-3 protease activity」 Takehisa Matsumoto, Kazue Kamijo, 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

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

研究分担者 朝比奈靖浩 東京医科歯科大学 教授

研究要旨

テラプレビル3剤併用療法でもインターフェロン(IFN)不応例では治療成績は十分でない。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 IFN 治療における IFN 応答性との関連について検討し、IL28B SNP が規定する IFN 不応性に関与する宿主・ウイルス分子機構を解明した。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た。また、IL28B 近傍の SNP が minor allele の症例では、これらの遺伝子の高発現を認め NVR に関連していた。一方、同一の IL28B genotype でも NVR の症例では、自然免疫系遺伝子や IFN 誘導遺伝子の治療前の肝内発現が高かった。従って、宿主自然免疫系遺伝子および IFN 誘導遺伝子の発現状態は、IL28B SNP が規定する治療不応性機構のより本質に近い現象と考えられた。さらに *in vitro* の検討では、IL28B minor type の配列を持つ promoter の活性は major type のものよりも低く、患者末梢血単核球(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。従って、IL28B 近傍の SNP が規定する IFN 不応性には、IFN 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。

A. 研究目的

これまで我々は、宿主における自然免疫系遺伝子発現が、C型慢性肝炎に対するPEG-IFN/RBV併用療法の難治要因として重要であることを報告してきた(Gastroenterology 2008)。一方最近、宿主IL28B遺伝子近傍のSNPがPEG-IFN/RBV併用療法のNVRに関連していることが報告されたが、IL28B遺伝子近傍のSNPと宿主遺伝子発現および抗ウイルス療法の治療効果については不明な点が多い。そこで本研究では、IL28B遺伝子近傍のSNPと宿主自然免疫系遺伝子発現および治療効果の関連について明らかにするとともに、IL28B SNPが規定するIFN不応性機構について解明した。

B. 研究方法

PEG-IFN/RBV 施行 genotype 1b 型 C 型慢性肝炎例を対象とし、IFN 応答性に関わるウイルス・宿主因子を明らかとすると共に、治療前における肝内宿主自

然免疫遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で測定し、IL28B SNP および治療効果との関連を検討した。さらに、RIG-I/IPS-1 系を中心とした宿主自然免疫と HCV の逃避機構を治療前肝組織、末梢血単核球 (PBMC) 及び細胞培養系を用いて解析した。

(倫理面の配慮)

臨床データのデータベースにおいては、氏名、年齢など個人情報を連結可能匿名化するなど、患者プライバシーを完全に保護すること、患者尊厳、人権、利益を完全な形で尊重すること、研究の目的と手段が科学的に理にかなったものであることなど倫理面で配慮する。本研究における遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく「研究開発二種省令・研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」に準拠し遂行する。研究の施行に当たっては、東京医科歯科大学組み換え DNA 実験安全管理

委員会の承認、および文部科学大臣の確認を取得している。

C. 研究結果

IL28B SNP は測定例の 73%が major homozygote で、残りは heterozygote および minor homozygote であった。IL28B hetero または minor の症例では、PEG-IFN/RBV 併用療法中の HCV 動態第 1 相・第 2 相双方における HCV 減少率が有意に低かった。IL28B major の 48 週治療の著効率は 54%であったのに対し、hetero または minor の症例では 54%が NVR であった。IL28B hetero または minor の症例は、肝脂肪化、 γ -GTP 高値、LDL-C 低値および ISDR 野生型、HCV コア変異が関連し、従来から難治要因として報告されている因子と関連があった。一方、年齢、性別および肝線維化とは有意な関連はなかった。治療前の肝における、細胞内ウイルスセンサー (RIG-I, MDA5, LGP2)、IFN 誘導遺伝子 (ISG15, USP18) は IL28B hetero または minor の症例で有意に高発現であった。一方、アダプター分子 (IPS-1) および抑制系遺伝子 (RNF125) は hetero または minor の症例で低値であった。しかし、IL28B major でも NVR となった症例では細胞内ウイルスセンサーや IFN 誘導遺伝子の発現は高値で、同様に IL28B hetero または minor でもウイルス反応が得られた症例では低値であった。多変量解析では NVR に関与する因子として IL28B SNP 以外に RIG-I 高発現が抽出された。

C 型慢性肝炎患者由来の PBMC において IFN α 及び poly (I:C) 刺激による IL28B の発現誘導は rs8099917 nonTT で低い傾向を認め、NVR 例では有意に低かった ($p = 0.004$) が、IL28A や IFN β の誘導能には差を認めなかった。nonTT 患者由来 IL28B promoter を用いた reporter assay では RIG-I, IRF7, p50-p65 による promoter の活性化が TT 患者由来のものに比べて低かった。一方、in vitro では RIG-I 誘導性 IFN β の活性は NS3/4A の他 NS4B によっても抑制され、切断体 IPS-1 の強制発現により活性化される IFN β の promoter 活性は NS3/4A では抑制されないが、NS4B では完全に抑制された。また NS4B は IPS-1 の下流分子である STING と共局在し、これを

介して RIG-I 誘導性 IFN 経路を抑制していると考えられた。

D. 考察

IFN 応答性には HCV コア変異、IL28B SNP とともに、治療前肝組織における宿主自然免疫の IFN 促進系と抑制系の遺伝子発現が関連していると考えられた。一方外因性 IFN による PBMC における IL28B 誘導能は治療効果と関連し、NVR 例では VR 症例に比し低く、これには IL28B の SNP で規定される promoter 活性の差が関与している可能性が考えられた。また、IFN 治療効果には NS3/4A・4B による HCV 逃避機構が関連していることが示唆された

E. 結論

C 型慢性肝炎に対する治療効果には、治療前肝組織における宿主自然免疫と IFN 応答系の遺伝子発現が関連し、治療中は IL28B の SNP で規定される promoter 活性の違いによる、IL28B の誘導能の差が関与することが示唆された。また治療効果には、HCV 逃避機構が複雑に関連していると考えられるが、プロテアーゼ阻害剤 3 剤併用療法の難治例である IFN 不応例では RIG-I/IPS-1 を中心とした自然免疫経路が新規治療の標的となり得ると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Itakura J, Kurosaki M, Itakura Y, Maekawa S, Asahina Y, Izumi N, Enomoto N: Reproducibility and usability of chronic virus infection model using agent-based simulation; comparing with a mathematical model. *Biosystems* 99: 70-78, 2010.
2. Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Ikeda H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Higaki M, Enomoto N, Izumi N: A predictive model of response to peginterferon ribavirin in chronic hepatitis C

- using classification and regression tree analysis. *Hepatol Res* 40: 251-260, 2010.
3. Namiki I, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M: Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). *Hepatol Res* 40: 347-368, 2010.
 4. Asahina Y, Tsuchiya K, Tamaki N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N: Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52: 518-527, 2010.
 5. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M: Predictors of virological response to a combination therapy with pegylated interferon plus ribavirin including virus and host factors. *Hepat Res Treat* 2010: 703602, 2010.
 6. Kurosaki M, Hosokawa T, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N: Hepatic steatosis in chronic hepatitis C is a significant risk factor for developing hepatocellular carcinoma independent of age, sex, obesity, fibrosis stage and response to interferon therapy. *Hepatol Res* 40: 870-877, 2010.
 7. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M: Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol* 54: 439-448, 2011
 8. Itakura J, Asahina Y, Tamaki N, Hirayama I, Yasui Y, Tanaka T, Sato M, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Kurosaki M, Gabriel GS, Schneider GJ, Izumi N: Changes in hepatitis C viral load during first 14 days can predict the undetectable time point of serum viral load by pegylated interferon and ribavirin therapy. *Hepatol Res* 41: 217-224, 2011.
 9. Tsuchiya K, Komuta M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Itakura J, Nakanishi H, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Enomoto N, Sakamoto M, Izumi N: Expression of Keratin19 is Related to High Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Radiofrequency Ablation. *Oncology* 80:278-288,2011
 10. Kurosaki M, Tanaka Y, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Matsuura K, Sugauchi F, Enomoto N, Nishida N, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N: Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antivir Ther* 16:685-694,2011
 11. Kuzuya T, Asahina Y, Tsuchiya K, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka T, Tamaki S, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N: Early decrease in α -fetoprotein, but not des- γ -carboxy prothrombin, predicts sorafenib efficacy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology* 81:251-258,2011
 12. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Sueki R, Miura M, Kadokura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, Okada SI, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N: Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatol Int* 6:482-490,2012
 13. Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, Sakamoto N, Izumi N: Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response. *Hepatology* 55: 20- 29, 2012.

14. Kiyohashi K, Kakinuma S, Kamiya A, Sakamoto N, Nitta S, Yamanaka H, Yoshino K, Fujiki J, Murakawa M, Kusano-Kitazume A, Shimizu H, Okamoto R, Azuma S, Nakagawa M, Asahina Y, Tanimizu N, Kikuchi A, Nakauchi H, Watanabe M: Wnt5a signaling mediates biliary differentiation of fetal hepatic stem/progenitor cells. *Hepatology* in press, 2012
15. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Morikawa H, Adachi K, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsushashi H, Oketani M, Kumada H: Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN α 2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multi-center cooperative study. *J Gastroenterol* (Epub ahead of print), 2012.
16. Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Ttoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T: Genome-wide association study confirming association of HLA-DP with protection against chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean. *PLoS One* 7(6):e39175, 2012.
17. Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K: No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet* 13: 47, 2012.
18. Tamaki N, Kurosaki M, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Izumi N: Noninvasive estimation of fibrosis progression overtime using the FIB-4 index in chronic hepatitis CN. *J Viral Hepat* 20(1):72-76, 2012.
19. Toyoda J, Ozeki I, Asahina Y, Izumi N, Takahashi S, Kawakami Y, Chayama K, Kamiya N, Aoki K, Yamada I, Suzuki Y, Suzuki F, Kumada H: Virologic response and safety of 24-week telaprevir alone in Japanese patients infected with hepatitis C virus subtype 1b. *J Viral Hepat* 20(3):167-73, 2012.
20. 朝比奈靖浩、泉 並木、桶谷 眞、熊田博光、小池和彦、鈴木文孝、滝川 一、田中 篤、坪内博仁、林 紀夫、平松直樹、四柳 宏 (日本肝臓学会 肝炎ガイドライン作成委員会): C型肝炎治療ガイドライン (第1版) 肝臓. 53(6): 355-395 社団法人日本肝臓学会, 2012
21. Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Nishimura-Sakurai Y, Azuma S, Tasaka-Fujita M, Asahina Y, Yoneyama M, Fujita T, Watanabe M: Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type-I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 57(1):46-58, 2013.
22. Asahina Y, Hayashi N, Izumi N, Koike K, Kumada H, Oketani M, Suzuki F, Takikawa H, Tanaka A, Tsubouchi H, Yotsuyanagi H: editors of the Drafting Committee for Hepatitis Management Guidelines. *Guidelines for the Management of Hepatitis C Virus Infection. Hepatology Research* 2013; 43: 1-34, 2013
2. 著書
- 朝比奈靖浩: 肝疾患 臨床検査のガイドライン. 272-278 株式会社宇宙堂八木書店, 2012
 - 朝比奈靖浩: C型肝炎ウイルスマーカー 感度と特異度からひもとく 感染症診療の Decision Making 242-247 文光堂, 2012
 - 朝比奈靖浩: C型肝炎の経過と予後 肝炎ウイルス-B型・C型 70-75 医薬ジャーナル社, 2012
 - 朝比奈靖浩: 肝発癌抑制を目指したインターフェロン療法 最新! C型肝炎の使いかた. 43-45 診断と治療社, 2012