

最近、我々は ORL8 細胞で観察された RBV の顕著な抗 HCV 活性がグアノシンの添加によりキャンセルされることを見出した。この現象から、我々は RBV の抗 HCV 活性はイノシンーリン酸脱水素酵素 (IMPDH) が阻害され、それに伴い GTP のレベルが急速に低下することに起因するのではないかと考えた。IMPDH 特異的 siRNA を用いて ORL8 細胞における IMPDH の機能を阻害すると、細胞内の HCV RNA の複製レベルが顕著に低下することも確認した。

そこで、我々は、RBV 処理により細胞内の GTP 量が実際に低下することを実験的に確かめることとした。RBV の抗 HCV 活性が顕著な ORL8 細胞と RBV の抗 HCV 活性があまり観察されない HuH-7 由来の OR6 細胞について、RBV 添加後に細胞内のヌクレオチドを抽出して HPLC 法により GTP を定量する実験を行った。

ORL8 細胞と OR6 細胞に RBV (ORL8 細胞で EC90 に相当する  $50 \cdot M$ ) を添加して8時間後に細胞からヌクレオチドを抽出し、HPLC 解析を行った。対照として、RBV を添加しない細胞を用いた。

その結果、ORL8 細胞では RBV 処理(8 時間)により GTP が約 60%低下することが明らかとなった。同条件での OR6 細胞における GTP の低下率は 30%弱であることから ORL8 細胞では GTP レベルが有意に低下することが示された。さらに、それに伴って、ORL8 細胞では IMP の蓄積が顕著に起っていることが明らかとなった。ORL8 細胞での IMP のレベルは RBV 添加前に比べて約 30 倍亢進した。これとは対照的に OR6 細胞では IMP レベルの顕著な上昇はほとんど認められなかった。

### (3) Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株から RBV 抵抗性の樹立と HCV 遺伝子解析

ORL8 細胞に RBV を長期間添加して RBV 抵抗性株の樹立を種々の方法により試みたが、RBV の抵抗性を示す細胞株を得ることは出来なかった。

これらの結果から、ORL8 細胞を断念して、ルシフェラーゼ遺伝子を含まない全長 HCV RNA 複製細胞である OL8 細胞や OL11 細胞を用いて、G418 存在下で RBV 処理をすることにより RBV 耐性コロニーを選択する方式で実験を行うこととした。RBV 添加を繰り返すことにより、RBV に耐性を示す細胞コロニーが幾つか得られたが、

Western blot 法による確認実験において再現性を得ることはできなかった。

そこで、我々は OL8 細胞や OL11 細胞を2年以上継代培養して、HCV の遺伝的多様性が増した細胞を得ていたため、これらの細胞を親細胞として使う方が RBV 耐性株がとれる可能性が高まるのではないかと考えた。

OL8 細胞を2年間継代培養した OL8(2Y)細胞と OL11 細胞を2年間継代培養した OL11(2Y)細胞を用いて、RBV  $100 \cdot M$  の添加(4日置きに添加して 26 日間培養)実験を行い、RBV に抵抗性を示す細胞コロニーが、OL8(2Y)細胞から1個、OL11(2Y)細胞から 12 個得られた。それぞれを増殖させ、細胞株とした。

得られた細胞株の RBV 抵抗性を Western blot 法により調べたところ、OL8 細胞などから得られた RBV 耐性として残って来た細胞株の場合と同じように、得られた細胞株は親株と同程度に RBV に対して高感受性を示すことが分かった。このような結果になった原因として、RBV 耐性としてコロニー化した細胞から細胞株として樹立増殖させる際に、RBV Free にしてしまったことにより、元の高感受性に戻ってしまった可能性が考えられた。別の可能性として、2年の継代培養期間では HCV や細胞の多様性という面で RBV 耐性の表現型がまだ現れて来ていない可能性も考えられた。

そこで、今度は、OL8 細胞を 3.4 年間継代培養した OL8(3.4Y)細胞、OL11 細胞を 3.4 年間継代培養した OL11(3.4Y)細胞および OL14 細胞を 3.2 年間継代培養した OL14(3.2Y)細胞を用いて、RBV に抵抗性を示す細胞株の樹立を目指した。前回とは少し方法を変え、1週間ごとに継代を行っている細胞培養のラインにのせて継代ごとに RBV( $100 \cdot M$ )を添加することとした。通常の細胞継代では、1週間ごとに細胞を 50-80 倍希釈している。そこで、それぞれの細胞について、RBV を加えない細胞系列(コントロール)と RBV を添加する細胞系列の 2系統の細胞を作成した。1週間ごとの継代時に RBV を添加した。このような継代を10週間にわたって継続させた。

その結果、OL8(3.4Y)細胞では、継代 10 週目に RBV に抵抗性を示しながら増殖する数個の細胞コロニーが得られた。これらの細胞コロニーはプールする形で回収して OL8(3.6Y)R 細胞と名付けた。一方、OL11(3.4Y)細

胞と OL14(3.2Y)細胞については、RBV 存在下で細胞の増殖能が低下するものの、全体としては徐々に細胞が増殖してくることが分かった。これらの細胞についても、RBV 添加後 10 週を経過した時点で、細胞を回収してそれぞれ OL11(3.6Y)R と OL14(3.4Y)R 細胞と名付けた。

これらの細胞についても、同様に Western blot 法により RBV 抵抗性になっているかどうかを検討した。その結果、これらの細胞[OL8(3.6Y)R, OL11(3.6Y)R および OL14(3.4Y)R]では、RBV (25  $\mu$ M) 添加後の NS5B の減少度がそれぞれコントロールに用いた親株細胞[OL8(3.6Y), OL11(3.6Y)および OL14(3.4Y)]と比較して少なく、得られた細胞がいずれも RBV に抵抗性を示していることが分かった。

そこで、次に RBV 抵抗性を示すポリクローナル細胞として得られた OL8(3.6)R、OL11(3.6Y)R および OL14(3.4Y)R から RT-PCR 法により細胞内に存在する全長 HCV RNA を増幅して、HCV の遺伝子解析を行った。それぞれ独立的に得られた 7 クローンについて塩基配列を決定した。比較対象として、細胞継代を 3.6 年あるいは 3.4 年続けた細胞 OL8(3.6Y)、OL11(3.6Y)および OL14(3.4Y)についても、同様に 7 クローンずつ全長 HCV RNA の塩基配列を決定した。OL8、OL11 および OL14 細胞の系列で RBV 感受性細胞と抵抗性細胞間における HCV RNA の塩基配列を比較した。

OL8(3.6Y)と OL8(3.6Y)R との比較を行った結果、解析した 7 クローンすべてで変化したアミノ酸があることが分かった。コア領域に 3 アミノ酸 (F24L, C172R, S175P)、E2 領域に 1 アミノ酸 (R460C)、NS3 領域に 1 アミノ酸 (I1461M)、NS5A 領域に 2 アミノ酸 (V2244A と T2351A) 認められた (F24L とは 24 番目のアミノ酸が F から L に変化したことを示す)。しかしながら、OL11(3.6Y)と OL11(3.6Y)R や OL14(3.4Y)と OL14(3.4Y)R との比較においては、解析した 7 クローンすべてで変化したアミノ酸はなかった。従って、OL8、OL11 および OL14 細胞系列で RBV 感受性の変化に伴い、共通してアミノ酸が変化する HCV タンパク質はないことが分かった。

決定した HCV RNA の塩基配列の情報から Neighbor-joining 法により系統樹を作成してそれぞれの HCV RNA の類似性を解析したところ、OL8(3.6Y)R から得られた 7 クローンはかなりの均一性を示し、

OL8(3.6Y)集団の中の限られた分子種であることが分かった。それとは対照的に、OL11(3.6Y)R から得られた 7 クローンは OL11(3.6Y)から得られた 7 クローンと系統樹の中では混在する位置関係となったことから、HCV RNA としてはほとんど selection がかかっていないことが分かった。OL14(3.4Y)R については、OL8 と OL11 細胞系列の結果の中間のような系統樹の中での位置関係が得られた。OL14(3.4Y)R 由来の HCV RNA はある程度のクラスターを形成するものの、そのクラスター内には OL14(3.4Y)由来の HCV RNA も一部存在するような形になっていた。

OL8(3.6Y)R 細胞からさらに RBV に抵抗性を示す細胞を得るために RBV を再度添加して、10 日ごとに RBV の濃度を 150  $\mu$ M、200  $\mu$ M と上げて培養した。その結果、多くの細胞の G418 耐性度が低下して浮遊状態となったが、最終的に RBV に抵抗性を示す細胞コロニーが 10 数個得られた。OL11(3.6Y)R や OL14(3.4Y)R 細胞についても同様の実験を行ったが、細胞コロニーとなることはなく全体的に徐々に細胞が増えてくるような状態となった。そのため、これらの細胞については、細胞のクローン化は断念して、細胞コロニーの得られた OL8(3.6Y)R 細胞について、クローン化細胞株の樹立を試みた。その結果、12 種類のクローン化細胞株 (R200#1 から R200#12 と命名) を樹立することができた。これらの細胞株について、RBV (最大 50  $\mu$ M) で 72 時間処理して、HCV NS5B の発現レベルの変化を Western blot 法により調べた。その結果、R200#1、R200#8 および R200#11 の 3 種類のクローン化細胞では、RBV 処理 (72 時間) を行っても、NS5B の量がほとんど減っていないことが分かり、他のクローン化細胞と比較すると、高度な RBV 抵抗性を示すことが分かった。次に、これらの 3 種類の細胞について、RBV 添加 (72 時間) による HCV RNA 量の変化を定量的に解析した。その結果、親細胞の OL8(3.6Y)における RBV の 50%有効濃度 (EC50) は  $31 \pm 3.2 \mu$ M であったのに対して、R200#1、R200#8 および R200#11 ではそれぞれ  $89 \pm 9.0$ 、 $80 \pm 4.7$  および  $>100 \mu$ M と高い EC50 値を示した。これらの結果から、今回得られたクローン化細胞は、タンパク質レベルでも、RNA レベルでも明らかに RBV に抵抗性を示すことが分かった。

(4) RBV 抵抗性細胞において発現レベルが変化している宿主遺伝子の同定

RBV 抵抗性を示す細胞内で複製して HCV RNA の遺伝子解析と並行して、宿主因子の発現レベルの変動が RBV に対する感受性の変化に関与している可能性を探るために、RBV に感受性を示す親細胞(OL8(3.6Y))と抵抗性を示す細胞(R200#1、R200#8 および R200#11) 間で発現量が異なる宿主因子が得られるかどうかを cDNA Microarray により解析した。

RBV 感受性細胞と比較して RBV 抵抗性細胞で発現レベルが高い遺伝子については、発現レベルが 4 倍以上高く、かつ発現量が 500 以上になっている遺伝子を対象にして選択作業を行った。その結果、R200#1 など RBV 抵抗性細胞で共通して発現レベルが亢進している 5 遺伝子 (RNA binding protein with multiple splicing 2、Phospholipase A2 VII、Fibrinogen alpha chain、SRY-box 6 および Interleukin 32) を同定した。最も、発現レベルが亢進していた RNA binding protein with multiple splicing 2 ではいずれの RBV 抵抗性細胞においても、10 倍程度或はそれ以上の発現亢進が認められた。また、RBV 感受性細胞と比較して RBV 抵抗性細胞で発現レベルが低い遺伝子については、OL8(3.6Y)細胞で発現量が 500 以上のものが R200#1 などの RBV 抵抗性細胞で 1/4 以下に低くなっている遺伝子を対象にして選択作業を行った。その結果、R200#1 など RBV 抵抗性細胞で共通して発現レベルが低下している 6 遺伝子 (protein kinase D1、Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2、SRY-box 4、C-terminal binding protein 2、Thioredoxin interacting protein および CD70 molecule) を同定した。最も発現レベルが低下していた protein kinase D1 では、いずれの RBV 抵抗性細胞においても、1/20 以下或はそれ以下の発現低下が認められた。

#### D. 考察

(1) Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株から IFN 抵抗性株の樹立

Li23 由来の OL8 細胞等からは、HuH-7 由来の細胞を用いた解析結果から予想されていたほどの IFN 抵抗性株が得られなかった。また、HCV の遺伝的多様性を生

じていると考えられる 2 年間培養した細胞においても、予想外に IFN 抵抗性となったコロニー数が少なかった。HuH-7 細胞と Li23 細胞では最近明らかになっている IFN と RBV との併用療法における治療効果を規定すると考えられる IL28B の遺伝子多型が異なり、HuH-7 細胞では治療抵抗性、Li23 細胞では治療感受性の遺伝子型であった。この違いが、本研究において得られたような IFN 抵抗性コロニーの出現頻度の違いになっている可能性がある。

本研究では、OL11 細胞および OL11(2Y)細胞由来の IFN 抵抗性細胞 OL11r と OL11(2Y)r から得られた HCV 遺伝子の解析を行い、IFN に抵抗性を示す細胞内では、遺伝的にかなり均一性を示す HCV RNA が複製していることを明らかにした。遺伝的系統樹解析においても、これらの HCV RNA は 1 つのクラスターを形成していた。HCV 遺伝子の広範囲にわたって特定のアミノ酸置換が認められた。これらのアミノ酸置換が IFN 抵抗性を担っている可能性も否定できないが、このようなアミノ酸置換を有する HCV 分子種が増えている均一の細胞集団が IFN の長期投与により選択されてきた可能性がある。最近、OL8(2Y)r 細胞由来の HCV 遺伝子の解析結果も得られたが、OL11(2Y)r 細胞で得られたアミノ酸置換に共通するアミノ酸置換はなかったことから、ウイルス側の特定のアミノ酸置換により IFN 感受性が決定されている可能性は少ないものと考えられる。宿主側因子が関与する可能性については、OL11(2Y)r 細胞を IFN- $\cdot$  で処理することにより治癒細胞を作成後、細胞樹立当時の全長 HCV RNA を作成した治癒細胞に再度導入することにより全長 HCV RNA 複製細胞を作成し、IFN 感受性試験を行う予定である。

(2) RBV の抗 HCV 活性の作用機序の解析

ORL8 細胞において見出された RBV の顕著な抗 HCV 活性は、IMPDH の阻害によるものであると考えていたので、今回、RBV を添加した ORL8 細胞において細胞内の GTP のレベルが OR6 細胞の場合と比べて顕著に低下することを確認できたことは、我々の考えを支持するものであると思われる。予想外に IMP が蓄積してくることが分かったので、今後は、IMP の蓄積が HCV の複製にど

のような影響を及ぼすかについても検討する必要がある。

### (3) Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株から RBV 抵抗性の樹立と HCV 遺伝子解析

本研究においては、様々な種類の全長 HCV RNA 複製細胞株から RBV に抵抗性を示す細胞株の樹立を試みた。結果的には、3.5年ほど継代培養した OL8 細胞を使った場合に、ある程度の RBV 抵抗性を示す細胞 (OL8(3.6Y)R) が得られ、さらに RBV の濃度を段階的に上げることにより、RBV 耐性細胞クローン (R200#1, R200#8 および R200#11) まで得ることができた。

このことは、RBV に対する抵抗性が HCV RNA のどこが変化したためなのか、或はどの宿主遺伝子の発現レベルが変化したためかなどを詳細に検討できるモデル細胞系ができたことを意味している。

HCV 遺伝子の解析結果により、OL8 細胞系列では顕著なアミノ酸の変化や系統樹解析によるクラスター形成が認められたので、RBV 感受性の変化に伴う HCV RNA の選択或は細胞の選択が進んだことが示されたと思われる。アミノ酸変化で得られた V2244A と T2351A は PEG-IFN と RBV による治療の感受性を規定している領域として知られている ISDR (2209-2248) と IRRDR (2334-2379) 内に位置していることは興味深い。ISDR や IRRDR がどのような分子機序により治療効果に関与しているかは分かっていないので、今後の研究によりこれらのアミノ酸変化と RBV 感受性の変化の関係が明らかになった場合には、ISDR や IRRDR が存在する意味も理解できる可能性がある。現在、OL8(3.6Y)R に対して、さらに RBV 処理を行い、クローン化した細胞株 (R200#1, R200#8 および R200#11) 由来の HCV RNA の塩基配列を解析しているので、さらにアミノ酸変化と RBV 抵抗性との関係を理解する上で必要な情報が得られるのではないかと考えられる。ただ、今回の遺伝子解析では、RBV 抵抗性を示した OL11(3.6Y)R や OL14(3.4Y)R では、OL8(3.6Y)R で認められたような顕著なアミノ酸変化がほとんど認められなかったため、一概に HCV RNA の変異により RBV 感受性が規定されているとも考えにくく、宿主因子の変化と連動している可能性もある。この可能性については、次項で述べるマイクロアレイ解析で得ら

れた宿主遺伝子についての機能解析 (RBV 感受性に関わるか否かについて) により、ある程度分かってくるのではないかと期待される。

### (4) RBV 抵抗性細胞において発現レベルが変化している宿主遺伝子の同定

RBV に対して抵抗性を示す細胞クローンで共通して発現レベルが亢進あるいは低下している宿主遺伝子が cDNA マイクロアレイ解析により存在していることが分かったので、今後、それぞれの遺伝子を発現させたり、抑制させたりして、RBV に対する感受性の変化に関与する遺伝子を同定する作業を行う予定である。このような遺伝子が同定されると、RBV に対する抵抗性獲得機構や RBV の抗 HCV 活性の分子機序の詳細が解明されるのではないかと期待される。

## E. 結論

本研究による成果として (1) 全長 HCV RNA 複製細胞から IFN- $\alpha$  に抵抗性を示す細胞株を得た。IFN 抵抗性細胞内の HCV は遺伝的系統樹上クラスターを形成していることを明らかにした。 (2) RBV の抗 HCV 活性を測定できる Li23 由来の ORL8 細胞では、RBV の添加により細胞内の GTP 量が顕著に低下し、IMP の蓄積が起こることを明らかにした。 (3) Li23 細胞株由来の全長 HCV RNA 複製細胞から RBV に抵抗性を示す複数の細胞株を樹立した。RBV 抵抗性細胞内の HCV は遺伝的系統樹上クラスターを形成していることを明らかにした。 (4) RBV 感受性の親細胞と比較して 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。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison

- with HuH-7 and other hepatic cell lines. *Hepatol. Res.* 40:1248–1253 (2010).
- 2) Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, Ariumi Y, Miyake Y, Takaki A, Nouse K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K. Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon- $\alpha$  in vitro. *Liver Int.* 30:1324–1331 (2010).
- 3) Nozaki A, Morimoto M, Kondo M, Oshima T, Numata K, Fujisawa, Kaneko T, Miyajima E, Morita S, Mori K, Ikeda M, Kato N, Tanaka K. Hydroxyurea as an inhibitor of hepatitis C virus RNA replication. *Arch. Virol.* 155:601–605 (2010).
- 4) Nozaki A, Numata K, Morimoto M, Kondo M, Sugimori K, Morita S, Miyajima E, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Tanaka K. Hydroxyurea Suppresses Hepatitis C Virus Replication in Human: A Phase I Trial of Oral Hydroxyurea in Chronic Hepatitis C Patients. *Antiviral Therapy* 15:1179–1183 (2010).
- 5) Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Hokari R, Kato N, Hibi T, Miura S. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. *World J. Gastroenterol.* 16:184–192 (2010).
- 6) Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T, Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Path. Int.* 60:351–357 (2010).
- 7) Yu S, Chen J, Wu M, Chen H, Kato N, Yuan Z. Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *J. Gen. Virol.* 91:2080–2090 (2010).
- 8) Tanaka T, Hasegawa Y, Saito M, Ikeda M, Kato N. Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating procedure. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 374–376 (2010).
- 9) Oshiumi H, Ikeda M, Matsumoto M, Watanabe A, Takeuchi O, Akira S, Kato N, Shimotohno K, Seya T. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- $\beta$  induction. *PLoS One* 5(12):e14258 (2010).
- 10) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS One* 6(1):e14517 (2011).
- 11) Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One* 6(1): e15967 (2011).
- 12) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. *Virus Res.*, 151(1):61–70 (2011).
- 13) Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: Potential treatment for hepatitis C. *Liver Int.*, 31(6):871–880 (2011).
- 14) Ariumi Y, Kuroki M, Kushima Y, Osugi K, Hijikata M, Maki M, Ikeda M, Kato N. Hepatitis C virus hijacks P-body and stress granule components around lipid droplets. *J. Virol.*, 85(14):6882–6892 (2011).
- 15) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and hepatitis C virus strains are required for the objective evaluation of anti-hepatitis C virus reagents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 409(4):663–668 (2011).
- 16) Takeshita S, Ichikawa T, Taura N, Miyaaki H., Matsuzaki T, Otani M, Muraoka T, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Ikeda M, Kato N, Isomoto H, Takeshima F, Nakao K. Geranylgeranylacetone has anti-hepatitis C virus activity via activation of mTOR in human hepatoma cells. *J. Gastroenterol.*, 47:195–201(2012).

- 17)Mori K, Ueda Y, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M, Kato N. Development of a drug assay system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Virus Genes*, 44:374-381(2012)
- 18) Seijima H, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Identification of host genes showing differential expression profiles with cell-based long-term replication of hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 167:74-85 (2012).
- 19) Takeda M, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Development of hepatitis C virus production reporter assay systems using two different hepatoma cell lines. *J. Gen. Virol.* 93:1422-1431 (2012).
- 20) Takeda M, Ikeda M, Mori K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Raloxifene inhibits hepatitis C virus infection and replication. *FEBS Open Bio*, 2:279-283 (2012).
- 21) Marozin S, Altomonte J, Apfel S, Dinh P, Toni ED, Rizzani A, Nüssler A, Kato N, Schmid R, Pattnaik A, Ebert, O. Post-translational modification of VSV glycoprotein, but not JNK inhibition, is the antiviral mechanism of SP600125. *J. Virol.* 86:4844-4855 (2012).
- 22) Iikura M, Furihata T, Mizuguchi M, Nagai M, Ikeda M, Kato N, Tsubota A, Chiba K. ENT1, a ribavirin transporter, plays a pivotal role in antiviral efficacy of ribavirin in a hepatitis C virus replication cell system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56:1407-1413 (2012).
- 23) 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 *Alloecomatella polycladia*. *Mar. Drugs* 10: 744-761(2012).
- 24) 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*, 7:e48685 (2012).
- 25)Koike K, Takaki A, Kato N, Ouchida M, Kanzaki H, Yasunak T, Shiraha H, Miyake Y, Yamamoto K. Eradication of hepatitis C virus subgenomic replicon by interferon results in aberrant retinol related protein expression. *Acta Med.Okayama*, 66:461-468 (2012).
- 26) Kuroki M, Ariumi Y, Hijikata M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Shimotohno K, Kato N. PML tumor suppressor protein is required for HCV production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 430:592-597 (2013).
2. 学会発表
- 1)Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Anti-HCV mechanism of ribavirin in novel HCV replication cell systems. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.
- 2)Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication assay systems derived from different HCV strains using HuH-7 and Li23 cells. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.
- 3)Shinohara Y, Fujita K, Mawatari H, Yoneda M, Nozaki Y, Kirikoshi H, Imajo K, Suzuki K, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. Clearance of the hepatitis C virus replicon by interferon-alpha treatment restored the signal pathway involving JNK. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.
- 4)Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Mechanism of Anti-HCV of Ribavirin in a Novel HCV Replication Cell System. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月。
- 5) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、  
團迫 浩方、加藤 宣之。ヒト肝癌細胞株 Li23 由来の新しい HCV-RNA 複製システムを用いたリバビリンの作用機序の解明。第 18 回日本消化器関連学会週間

(JDDW 2010)/第14回日本肝臓学会大会、横浜、2010年10月。

6)池田 正徳、森 京子、中澤 貴秀、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之。C型肝炎ウイルスに対する新しい抗ウイルス剤スクリーニング系の開発。第18回日本消化器関連学会週間(JDDW 20110)/第14回日本肝臓学会大会、横浜、2010年10月。

7)森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之。リバビリンの抗HCV活性を決定する因子の解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月。

8)温 暁玉、阿部 隆之、久木原 博、田鍬 修平、谷 英樹、加藤 宣之、

鈴木 哲朗、巽 正志、森石 恆司、松浦 善治。C型肝炎ウイルス感染細胞特異的なウイルス排除システム

第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月。

9) Mori K, Hiraoka O, Ikeda M, Ariumi Y, Hiramoto A, Wataya Y, Kato N. Identification of a host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, September 2011.

10) Ueda Y, Mori K, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. Plural assay systems derived from different cell lines and HCV strains are required for the objective evaluation of anti-HCV reagents. 18th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Seattle, September 2011.

11)森 京子、平岡 修、池田 正徳、有海 康雄、平本 晃子、綿矢 有佑、加藤 宣之。リバビリンの抗HCV活

性を決定する因子。第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月。

12)森 京子、平岡 修、池田 正徳、有海 康雄、平本 晃子、綿矢 有佑、加藤 宣之。リバビリンの抗HCV活性を決定する宿主因子の同定。第19回日本消化器関連学会週間(JDDW 2011)/第15回日本肝臓学会大会、福岡、2011年10月。

13)上田 優輝、森 京子、池田 正徳、有海 康雄、加藤 宣之。抗HCV剤の活性評価には複数の細胞株由来のHCVアッセイ系が必要である。第47回日本肝臓学会総会、東京、2011年6月。

14) 森 京子、本多 政夫、池田 正徳、團迫 浩方、金子 周一、加藤 宣之。

抗HCV薬リバビリンに対する感受性を決定する宿主因子の多面的解析。第71回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月。

15)Mori K, Honda M, Ikeda M, Dansako H, Kaneko S, Kato N. Multidirectional analysis for a host factor determining the anti-HCV activity of ribavirin. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italy, October, 2012.

16) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆字、加藤 宣之。

リバビリンに対する感受性を決定する宿主因子の同定とその因子の病態進行への関与について。第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012年11月。

#### 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

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

分担研究者：横須賀 収 千葉大学大学院医学研究院消化器・腎臓内科学教授

研究要旨

C型慢性肝炎の治療効果予測において IL28B SNP に治療前肝細胞内 STAT1 の核内移行を評価することは有用である。IL28B SNP は治療効果と強く関連するのみならず、HCV コア変異や脂質代謝との関連も示唆された。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。今後更なる検討が必要であると考えられた。

<研究協力者>

神田達郎（同，講師）

中本晋吾（同分子ウイルス学，助教）

今関文夫（千葉大学総合安全衛生管理機構，機構長・教授）

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法には著しい進歩が見られるが、薬剤耐性、薬剤不応などの問題があり、治療成績も十分満足できるものではない。C型慢性肝炎における感染ウイルスの遺伝子変異、IL28B 遺伝子多型（SNP）と治療効果、各種病態、予後との関係を検討することにより、治療効果を予測し、治療効果を改善する方策を検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 千葉大学医学部消化器内科で標準的ペグインターフェロン、リバビリン併用療法を施行した C 型慢性肝炎ジェノタイプ 1b 型高ウイルス症例のうち、肝組織所見が解析可能であった 101 例を対象とし、HCV コア変異、IL28B SNP との関連を検討した。肝生検組織から肝脂肪化の程度を半定量的（%）に評価し、5% 以上を肝脂肪化ありとした。HCV コア 70/91 アミノ酸配列は direct sequence 法で決定し 70R、91L をそれぞれ wild type とした。IL28B 関連 SNP（rs8099917）

を RFLP 法で評価し、TT を major type

（responder-type）、TG/GG を minor type とした。有意な因子の検定には多重 Logistic 回帰分析を行った。

(2) IFN 非著効または IFN 未施行例のうち 10 年以上経過観察され少なくとも 10 年間は肝発癌を認めなかった HCV G1 持続感染例 108 例を対象とした。IL28B genotype（rs8099917）別に経過観察開始時と長期経過観察後の HCV コア 70 アミノ酸の変化、肝発癌等について検討した。HCV コア 70 アミノ酸配列は直接塩基配列決定法にて、70Arg、70 non-Arg をそれぞれ野生型、変異型と判定し、IL28B genotype は TaqMan SNP 法にて決定した。

(3) 治療前に肝生検を施行した 79 例の肝組織標本で STAT1 の免疫組織学的染色を DAB 法で行い、IL28B SNP およびペグインターフェロン、リバビリン併用療法の治療効果と比較検討した。核小体が判別出来ないほど核が濃染したものを STAT1 の核内移行と判断して肝細胞 STAT1 の活性化と定義した。

(4) 各種アポトーシス刺激[Thapsigargin(TG), H2O2, MG132, TNF, CDDP, Sorafenib]による HepG2-control および HepG2-HCVNS5A における細胞死の検討をおこなった。さらに HCV NS5A ISDR に wild type-ISDR、intermediate type-ISDR、mutant type-ISDR をもつ HCV NS5A 発現ベクターを作成し



ISDR 変異のアポトーシス抵抗性に対する影響を比較検討した。

(5) Roche 454 GS Junior Sequencer により HCV NS5B 領域の HCV Genotyping 決定領域における Ultra Deep Sequence の検討を行なった。Sanger 法による直接塩基配列決定法から得られた塩基配列と Ultra Deep Sequence を比較検討した。

(倫理面への配慮) 千葉大学では少数民族を含む人権に十分配慮をおこなっている。臨床検体は千葉大学医学部倫理委員会の承諾を得た上で取り扱った。遺伝子 SNP に関しては同生命倫理委員会の承諾を得た上で解析した。

### C. 研究結果

(1) ペグインターフェロン、リバビリン併用治療を行った 1 型高ウイルス症例のうち肝組織所見が解析可能であった 101 例において RVR と関連する因子を検討したところ IL28B major type、血小板高値、耐糖能異常なしが、cEVR と関連する因子では IL28B major type、男性、白血球高値が抽出された。IL28B SNP は治療効果と強く関連するとともに、HCV コア変異や肝脂肪化との関連も示唆された。

(2) C 型慢性肝炎 361 例 (IFN 著効 73 例、非著効 202 例、非投与 86 例) を 10 年 (中央値) 観察し、IL28B rs8099917 SNP と肝発癌の関連を Log rank test で検討したところ、全体 ( $p=0.71$ )、SVR 以外の症例 ( $p=0.24$ )、非硬変症例 ( $p=0.17$ )、SVR 以外の非硬変症例 ( $p=0.1$ ) における累積肝発癌率に有意差はなく、SVR 以外の症例における肝硬変進展率にも有意差は見られなかった ( $p=0.65$ )。

(4) ペグインターフェロン、リバビリン併用治療を行った 1 型高ウイルス 124 例のうち治療前肝組織における Stat1 核染色の解析が可能であった 79 例において、IL28B SNP と SVR の関連を検討したところ SVR の正診率は IL28B SNP が 57%、Stat1 核染色陰性 (<5%) が 63%、両者を合わせると 71% と治療効果予測に有用であった。

(5) 本邦のプロテアーゼ阻害剤未使用 C 型慢性肝炎患者 (ジェノタイプ 1b) 88 例における HCV NS3/4A 領

域のプロテアーゼ阻害剤耐性変異を Sanger 法による直接塩基配列決定法で調べると T54S 6.8%、Q80L 21.5%、D168N 1.1%が見られたが、V36、V55、R155、A156、V170 位の変異は見られなかった。

(6) HCV NS3/4A 領域の Sequence-specific primer および HCV NS5B 領域の MGB probe を用いて C 型慢性肝炎患者 (セログループ 1) における HCV ジェノタイプを決定し、判定困難例について Ultra Deep Sequence も解析したところ、HCV NS5B MGB probe 領域に塩基置換が見つかった。

### D. 考察

HCV G1 高ウイルス量症例の治療効果予測において IL28B Genotyping と治療前肝細胞内 STAT1 の核内移行を評価することにより正診率の向上がみられ有用であることを明らかにした。

各種アポトーシス刺激に対する HCV NS5A による肝細胞アポトーシス抵抗性を検討した。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。今回の検討では HCV NS5A ISDR の変異の違いによるアポトーシス抵抗性の差異は観察されなかった。今後更に細胞培養系を用いて HCV NS5A の機能解析、特に HCV NS5A ISDR の機能解析を進めたいと考えている。HCV NS3/4A 領域の Sequence-specific primer および HCV NS5B 領域の MGB probe を用いて C 型慢性肝炎患者 (セログループ 1) における HCV ジェノタイプを決定し、判定困難例について Ultra Deep Sequence も解析したところ、HCV NS5B MGB probe 領域に塩基置換が見つかった。Ultra Deep 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。その意義については今後の検討課題である。

### E. 結論

C 型慢性肝炎の治療効果予測において IL28B Genotyping に治療前肝細胞内 STAT1 の核内移行を評価することは有用である。IL28B SNP は治療効果と強く関連するのみならず、HCV コア変異や脂質代謝との関連も示唆された。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。今後更なる検討が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表 (論文発表)

1.Kanda T, Wu S, Kiyohara T, Nakamoto S, Jiang X, Miyamura T, Imazeki F, Ishii K, Wakita T, Yokosuka O. Interleukin-29 suppresses hepatitis a and C viral internal ribosomal entry site-mediated translation. *Viral Immunol.* 2012 Oct;25(5):379-86.

2.Miyamura T, Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Jiang X, Arai M, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Roles of ITPA and IL28B Genotypes in Chronic Hepatitis C Patients Treated with Peginterferon Plus Ribavirin. *Viruses.* 2012 Aug;4(8):1264-78.

3.Wu S, Kanda T, Imazeki F, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Roger T, Shirasawa H, Nomura F, Yokosuka O. Hepatitis B virus e antigen physically associates with receptor-interacting serine/threonine protein kinase 2 and regulates IL-6 gene expression. *J Infect Dis.* 2012 Aug 1;206(3):415-20.

4.Yan J, Kanda T, Wu S, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatitis A, B, C and E virus markers in Chinese residing in Tokyo, Japan. *Hepatol Res.* 2012; 42(10):974-81.

5.Arai M, Togo S, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Quantification of hepatitis B surface antigen can help predict spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2012 Apr;24(4):414-8.

6.Maroka D, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Fujiwara K, Yokosuka O. Longitudinal changes of the laboratory data of chronic hepatitis C patients with sustained virological response on long-term follow-up. *J Viral Hepat.* 19(2):e97-e104.

7.Kanda T, Shinozaki M, Kamezaki H, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Fujiwara K, Goto N, Imazeki F, Yokosuka O. Efficacy of lamivudine or Entecavir on acute exacerbation of chronic hepatitis B. *Int J Med Sci.* 2012;9(1):27-32.

8.Kanda T, Yokosuka O. Pegylated interferon-alfa plus ribavirin therapies for chronic hepatitis C. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2011;51(181):41-8.

9.Kanda T, Imazeki F, Mikami S, Kato K, Shimada N, Yonemitsu Y, Miyauchi T, Arai M, Fujiwara K, Tsubota A, Takada N, Nishino T, Takashi M, Sugiura N, Kimura M, Fukai K, Yokosuka O. Occurrence of hepatocellular carcinoma was not a rare event during and immediately after antiviral treatment in Japanese HCV-positive patients. *Oncology.* 2011;80(5-6):366-72.

10.Kanda T, Imazeki F, Wu S, Nakamoto S, Yokosuka O. The assessment of serum hepatitis C virus RNA 12 weeks after the end of treatment using TaqMan polymerase chain reaction is less relevant than after 24 weeks for predicting sustained virological response. *Hepatology.* 2011;54(4):1482.

11.Miyamura T, Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatic STAT1-Nuclear Translocation and Interleukin 28B Polymorphisms Predict Treatment Outcomes in Hepatitis C Virus Genotype 1-Infected Patients. *PLoS One* 2011;6(12):e28617.

12.Kanda T, Imazeki F, Azemoto R, Yonemitsu Y, Mikami S, Kita K, Takashi M, Sunaga M, Wu S, Nakamoto S, Tawada A, Arai M, Kato K, Yoshida Y, Koma Y, Fujiwara K, Fukai K, Suzuki N, Yokosuka O. Response to Peginterferon-alfa 2b and Ribavirin in Japanese Patients with Chronic Hepatitis C Genotype 2. *Dig Dis Sci.* 2011 Nov;56(11):3335-42.

13.Kanda T, Imazeki F, Wu S, Nakamoto S, Yokosuka O. The assessment of serum hepatitis C virus RNA 12 weeks after the end of treatment using TaqMan polymerase chain reaction is less relevant than after 24 weeks for predicting sustained virological response. *Hepatology.* 2011 Oct;54(4):1482; author reply 1482-3.

14. Togo S, Arai M, Tawada A, Chiba T, Kanda T, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Clinical importance of serum hepatitis B surface antigen levels in chronic hepatitis B. *J Viral Hepat.* 2011 Oct;18(10):e508-15.
15. Tamura R, Kanda T, Imazeki F, Wu S, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Fujiwara K, Saito K, Roger T, Wakita T, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C Virus nonstructural 5A protein inhibits lipopolysaccharide-mediated apoptosis of hepatocytes by decreasing expression of Toll-like receptor 4. *J Infect Dis.* 2011 Sep 1;204(5):793-801.
16. Kamezaki H, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Arai M, Maruyama H, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Emergence of entecavir-resistant mutations in nucleos(t)ide-naïve Japanese patients infected with hepatitis B virus: virological breakthrough is also dependent on adherence to medication. *Scand J Gastroenterol.* 2011 Sep;46(9):1111-7.
17. Etoh R, Imazeki F, Kurihara T, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Mikata R, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Pegylated interferon-alfa-2a monotherapy in patients infected with HCV genotype 2 and importance of rapid virological response. *BMC Res Notes.* 2011 Aug 31;4:316.
18. Maruoka D, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Fujiwara K, Yokosuka O. Long-Term Cohort Study of Chronic Hepatitis C according to Interferon Efficacy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27(2):291-9.
19. Kanda T, Imazeki F, Yonemitsu Y, Mikami S, Takada N, Nishino T, Takashi M, Tsubota A, Kato K, Sugiura N, Tawada A, Wu S, Tanaka T, Nakamoto S, Mikata R, Tada M, Chiba T, Kurihara T, Arai M, Fujiwara K, Kanai F, Yokosuka O. Quantification of hepatitis C virus in patients treated with peginterferon-alfa 2a plus ribavirin treatment by COBAS TaqMan HCV test. *J Viral Hepat.* 2011 Jul;18(7):e292-7.
20. Nakamoto S, Kanda T, Imazeki F, Wu S, Arai M, Fujiwara K, Yokosuka O. Simple assay based on restriction fragment length polymorphism associated with IL28B in chronic hepatitis C patients. *Scand J Gastroenterol.* 2011 Jul;46(7-8):955-61.
21. Wu S, Fukai K, Imazeki F, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Initial Virological Response and Viral Mutation with Adefovir Dipivoxil Added to Ongoing Lamivudine Therapy in Lamivudine-Resistant Chronic Hepatitis B. *Dig Dis Sci.* 2010 Oct 7.
22. Wu S, Kanda T, Imazeki F, Arai M, Yonemitsu Y, Nakamoto S, Fujiwara K, Fukai K, Nomura F, Yokosuka O. Hepatitis B virus e antigen downregulates cytokine production in human hepatoma cell lines. *Viral Immunol.* 2010 Oct;23(5):467-76.
23. Yang L, Kiyohara T, Kanda T, Imazeki F, Fujiwara K, Gauss-Müller V, Ishii K, Wakita T, Yokosuka O. Inhibitory effects on HAV IRES-mediated translation and replication by a combination of amantadine and interferon-alpha. *Virology.* 2010 Sep 3;7:212
24. Kanda T, Gauss-Müller V, Cordes S, Tamura R, Okitsu K, Shuang W, Nakamoto S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatitis A virus (HAV) proteinase 3C inhibits HAV IRES-dependent translation and cleaves the polypyrimidine tract-binding protein. *J Viral Hepat.* 2010 Sep;17(9):618-23.
25. Kanda T, Nakamoto S, Nishino T, Takada N, Tsubota A, Kato K, Miyamura T, Maruoka D, Wu S, Tanaka T, Arai M, Mikami S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 2 who failed previous interferon therapy. *Int J Med Sci.* 2013;10(1):43-9.
- G. 知的所有権の取得状況  
特になし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	19	6892-905	2011
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 <i>Alloeocomatella polycladia</i> .	Mar Drugs.	10	744-6	2012
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 <i>Amphimedon</i> sp.	PLoS One.	7	e48685	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Salam KA, Furuta A, Noda N, Tsuneda S, Sekiguchi Y, <u>Yamashita A</u> , Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Tani H, Tanaka J, Akimitsu N.	Inhibition of hepatitis C virus NS3 helicase by manoalide.	J Nat Prod.	75	650-4.	2012
Komase K, Maekawa S, Miura M, Sueki R, Kadokura M, Shindo H, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Inoue T, Sakamoto M, <u>Yamashita A</u> , Moriishi K, Enomoto N.	Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.	Hepato 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, <u>Yamashita A</u> , 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, <u>Yamashita A</u> , Moriishi K, Nakakoshi M, Tsubuki M, Tani H, Tanaka J, Akimitsu N.	Psammaplin A inhibits hepatitis C virus NS3 helicase.	J Nat Med.	in press		2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	<i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry</i>	19	6892-6905	2011



## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
朝比奈靖浩	肝疾患	日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会	臨床検査のガイドライン	株式会社宇宙堂八木書店	東京	2012	272-278
朝比奈靖浩	C型肝炎ウイルスマーカー	細川 直登	感度と特異度からひもとく感染症診療のDecision Making	文光堂	東京	2012	242-247
朝比奈靖浩	C型肝炎の経過と予後	熊田 博光	肝炎ウイルスーB型・C型	医薬ジャーナル	大阪	2012	70-75
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	芥田 憲夫 斉藤 聡 角田 圭雄	最新!C型肝炎の使いかた	診断と治療社	東京	2012	43-45
朝比奈靖浩	4. ウイルス学的検査 A. A型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	34
朝比奈靖浩	4. ウイルス学的検査 B. B型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	35-40
朝比奈靖浩	4. ウイルス学的検査 C. C型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	40-43
朝比奈靖浩	4. ウイルス学的検査 D. D型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールデンハンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	43-44

朝比奈 靖浩	4. ウイルス学的検査 E.E 型肝炎ウイルスマーカー	泉 並木	肝臓病診療 ゴールドデンハ ンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	44
朝比奈 靖浩	6. C型慢性肝炎	泉 並木	肝臓病診療 ゴールドデンハ ンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	95-101
朝比奈 靖浩	A-2. C型慢性肝炎	泉 並木	肝臓病診療 ゴールドデンハ ンドブック 改訂第2版	南江堂	東京	2012	189-219

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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	A predictive model of response to peginterferon ribavirin in chronic hepatitis C using classification and regression tree analysis.	Hepatol Res	40	251-260	2010
Namiki I, Nishiguchi S, Hino K, Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hasegawa 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
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	Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection.	Hepatology	52	518-527	2010

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
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	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
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	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
Itakura J, Asahina Y, Tamaki N, Hirayama I, Yasui Y, Tanaka T, Sato M, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K, Nakanishi H, i Kurosaki M, Gabriel GS, Schneider GI	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
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	Expression of Keratin19 is Related to High Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Radiofrequency Ablation.	Oncology	80	278-288	2011

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, Mizushima M, Ueda K	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
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 $\alpha$ -fetoprotein, but not des- $\gamma$ -carboxy prothrombin, predicts sorafenib efficacy in patients with advanced hepatocellular carcinoma.	Oncology	81	251-258	2011
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	Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients.	Hepatol Int	6	482-490	2012
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