

厚生労働科学研究費補助金(B型肝炎創薬実用化等研究事業)
分担研究報告書(平成 24 年度)

次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HBV preS 領域変異の検討

研究分担者：榎本 信幸 山梨大学医学部第一内科 教授

研究協力者：前川 伸哉 山梨大学医学部第一内科 講師

研究要旨： B型慢性肝疾患におけるpreS領域の欠失あるいは変異は、肝病態の進行や肝発癌と関連することがダイレクトシーケンスによる解析にて報告されているが、病態形成における詳細な意義やメカニズムは明らかとなっていない。本研究では、本邦のB型慢性肝疾患におけるpreS領域の欠失・変異、HBs抗原量と肝病態との関連を明らかにすることを目的として次世代シーケンスを用いた検討を行った。その結果、PreS欠失・変異は多くの症例に1%に満たないわずかなクローンとして存在するが、高齢化や肝病態の進展に、その割合は次第に増大してくることが明らかになった。またHBs抗原量の多いものに肝癌が多発することが中国などで報告されているものの、本検討では肝硬変・肝癌などの病態進行症例においてもHBs抗原量の少ない症例を認め、必ずしも抗原量の多寡と肝病態に明確な相関を認めなかった。しかしながらHBs抗原量の少ない肝病態進展症例ではPreSの欠失・変異が多い症例が多く、PreSの変異に伴って、HBs抗原が細胞から分泌不能となり、血中では見かけ上HBs抗原が低下しているものの肝細胞内では存在し、病態改善には結びついていない症例がある可能性を示唆した。

A. 研究目的

近年 B 型慢性肝疾患における病態と関連する因子として、HBs 抗原定量値の重要性が注目されている。すなわち中国を中心としたアジア諸国からの報告にて、高 HBs 抗原症例では、HBV-DNA 量とは独立に肝発癌リスクが高いことが報告されている。B 型慢性肝疾患は病態と年齢に大きな関連があることが知られているが、これらの国における肝疾患の年齢層は若く、比較的高齢者の多い日本において HBs 抗原量と肝疾患に同様の関連が認められるのか明らかとなっていない。

一方、HBV における preS 領域の欠失あるいは変異は、肝病態の進行や肝発癌と関連することがダイレクトシーケンスを用いた検討等にて以前より報告されているが、病態形成における詳細な意義は明らかとなっていない。

本研究では、本邦の B 型慢性肝疾患における肝病態と HBs 抗原量、PreS 変異・欠失の関連を明らかにすることを目的として次世代シーケンスを

用いた検討を行った。

B. 研究方法

B 型肝炎のウイルス量が 4 未満で肝炎の活動性が臨床的に認められないキャリア群 12 例、ならびに肝癌を合併した肝硬変症 12 症例における血清から PreS⁺S 領域をパイロシーケンサーをもちいて deep sequence を行い、HBs 抗原量の値と含めて、臨床的関連性について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は山梨大学における倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

その結果、PreS 欠失・変異は多くの症例にわずかなクローンとして存在するが、高齢化、肝病態の進展に、その割合は増大してくることが明らかになった。また HBs 抗原量は軽度の慢性肝炎症例

よりも、むしろ肝硬変・肝癌などの病態の進行したものにおいて少ない傾向を認めた。しかしながら、これら HBs 抗原量の少ない病態進展症例では PreS の変異・欠失が多い症例が多かった。

D. 考察

肝病態進展症例において PreS、特に PreS2 の欠失あるいは開始コドン変異症例が多い一方で、これら PreS の変異・欠失した肝病態進展例では、HBs 抗原量が低い傾向を呈したことから、PreS 変異に伴って HBs 抗原は細胞内に蓄積し、細胞外に放出される HBs 抗原量が低下する可能性が示唆された。しかしながらさらなる多数症例による検討を行うことによって、高齢者の多い本邦での B 型肝炎症例における特徴をさらに明らかにする必要があることが考えられた。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いた deep sequence による HBV の quasispecies 解析を行うことにより、日本における B 型肝炎の臨床的特徴を明らかにしうる可能性が考えられ、B 型慢性肝疾患の病態理解が進むことが考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

The serum RANTES level influences the response to pegylated-interferon and ribavirin therapy in chronic hepatitis C.

Hepatol Res. 2012, in press.

2) 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 Sep;84(9):1360-8.

3) 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(11):e48685.

4) 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 Hepatitis. 2012, in press.

5) 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 IL28B polymorphisms in response to peginterferon plus ribavirin therapy in hcv-1b infection.

Hepatology. 2012 May 10.

6) 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 Apr;10(4):744-61.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書（平成24年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究分担者：馬場昌範（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

研究協力者：濱崎隆之，岡本実佳（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

分担研究課題：カプシド蛋白を標的とした抗HBV薬の同定と開発

研究要旨：B型肝炎ウイルス（HBV）の治療薬は、インターフェロンを除くと、臨床開発中のものを含めて、その全てが、逆転写酵素として働くHBVのDNAポリメラーゼを標的とする核酸アナログである。本研究では、既存の薬剤とは異なる作用機序を持つ、新規抗HBV薬の同定と開発を目的として、HBVのカプシド蛋白を標的とする薬剤の*in silico*アッセイ系を確立した。次に、それを用いて薬剤ライブラリー（169,320薬剤）のスクリーニングを行い、ドッキングスコアの高い50種類の薬剤を選択した。その中の19種類について、抗HBVアッセイを行ったところ、濃度依存的にウイルスの産生を抑制する薬剤を同定した。

A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）による慢性肝炎の治療として、現在使用可能な抗ウイルス薬としては、インターフェロンを除くと、臨床開発中のものを含めて全てが核酸アナログである。これら全ての薬剤は逆転写機能を有するHBVのDNAポリメラーゼを標的としており、それ以外の分子を標的とした抗HBV薬の開発が遅れている。核酸アナログの実用化によって、慢性B型肝炎の治療成績は大幅に改善したが、これらの薬剤に対する耐性ウイルスの出現がみられ、薬剤の中断による肝炎の再燃・増悪も報告されている。これに対してHIV感染の場合には、逆転写酵素阻害薬、プロテアーゼ阻害薬、そしてインテグラーゼ阻害薬などが開発されており、これらの薬剤を複数用いた多剤併用療法の確立により、「不治の病」と言われたHIV感染症の予後を劇的に改善させることに成功している。

そこで本研究では、HIV感染症治療における上記のような成功例を踏まえ、核酸アナログ以外の新規抗HBV薬の同定と開発を目的とした研究を行う。HBVの場合はHIVと比較して、ウイルスの感染複製機構が解明されていない部分も多いが、カプシド

蛋白を標的とする薬剤の*in silico*アッセイ系（*docking study*）を確立し、それを用いて薬剤のスクリーニングを行うことで、効率的に有効な薬剤の同定を試みる。このスクリーニングによって選ばれた薬剤は、HBV感染培養細胞を用いた*in vitro*アッセイにより、抗HBV効果を確認する。この操作により、リード化合物が得られたら、その周辺化合物や誘導体について、抗HBV効果を検討することで薬剤の最適化を行うとともに、作用機序（分子標的）を明らかにする。最終的には、動物を用いた毒性試験や薬物動態試験を行い、これらの結果を総合することで、当該薬剤の臨床開発の可能性を決定する。

本研究の目的が達成されれば、我が国に110-140万人と推定されるHBV持続感染者に対し、既存の抗HBV薬とは異なる作用機序を有する新規薬剤を提供することにより、新しいB型肝炎治療への展望を開くことが可能となる。すなわち、既存の核酸アナログと本研究により開発が期待される新規薬剤を併用することで、高価で副作用の強いインターフェロンが不要になるだけでなく、薬剤耐性ウイルスの出現による肝炎の再燃を防ぎ、感染者に対して長

期にわたる安定的な治療を提供することができる。その結果、肝硬変や肝がんの発症率や死亡率を減少させることで、感染者の将来に対する不安を軽減するとともに、国民の福祉の向上と医療費の削減をもたらすことができると思われる。

B. 研究方法

1. *In silico* スクリーニング : *In silico* アッセイ系の構築には、統合計算化学システム Molecular Operating Environment (MOE, Chemical Computing Group Inc.) を用いた。169,320 種類の薬剤からなるデータベースから、薬剤として好ましい条件 (分子量 : 350 - 600, 水素結合数 : < 13, 回転可能な結合数 : < 7, logP : 0-6) を有する化合物を選別し、それぞれの薬剤の配座解析を行った。*In silico* スクリーニングの標的分子である HBV カプシド蛋白複合体の結晶構造 [Protein Data Bank (PDB) ID: 1QGT] に水素原子を付加し、構造の最適化を行うことで、カプシド-カプシド蛋白間のインターフェイスにおけるポケットサイトを同定した。このサイトを標的とし、薬剤の *in silico* スクリーニングアッセイを行い、ドッキングスコアを計算した。次に、ドッキングスコアとドッキングポーズが良い化合物 19 種類を選別し、*in vitro* アッセイ系を用いて抗 HBV 活性を評価した。

2. 抗 HBV アッセイ : *In silico* スクリーニングにより選び出された薬剤は、ヒト肝癌細胞株 HepG2 に HBV DNA を導入した HepG2.2.15 細胞のクローン HepG2.2.15.7 を用いて、抗 HBV 効果について検討した。具体的には、 1×10^4 個/well の細胞を、コラーゲンがコートされたマイクロプレートに播種し、37°C にて培養した。24 時間後に種々の濃度の薬剤を添加した。薬剤添加後 3 日目に、同じ濃度の薬剤を含む新鮮な培養液と交換し、さらに 3 日間培養した。その後、細胞はテトラゾリウムを用いた色素胞にて、生細胞数を定量した。一方、培養上清は lysis buffer にてウイルス粒子を融解した後、リアルタイム PCR 方を用いて、ウイルス DNA の定量を行った。リアルタイム PCR に用いた TaqMan プライマー/プローブの塩基配列は以下の通りである。

• Forward primer

5'-ACTCACCAACCTCCTGTCCT-3'

• Reverse primer

5'-GACAAACGGGCAACATACCT-3'

• Probe (5'-FAM and 3'-TAMURA)

5'-TATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGT-3'

(Liu et al. *J. Clin. Microbiol.* **45**:553, 2007)

(倫理面への配慮)

本研究では、個人が特定出来るようなヒトのサンプルは用いていない。

C. 研究結果

1. カプシド蛋白間のインターフェイスを標的とする *in silico* スクリーニング : カプシド-カプシド蛋白間の相互作用を解析したところ、カプシド蛋白のアミノ酸残基、P20, D22, F23, F24, P25, D29, T33, L37, F110, F122, P135, A137, I139, L140 がインターフェイスに含まれ、さらにこれらのアミノ酸残基を含むサイトを解析したところ、**図 1** の赤と白の球体で示すように、薬剤がはまり込むポケットサイトが同定された。このポケットサイトに対して 169,320 薬剤の *in silico* スクリーニングを行った。また、ドッキングスコアの良い 50 種類の化合物のカプシドタンパク質との相互作用解析を行ったところ、**表 1** に示すようなアミノ酸と結合することが示唆された。この中には、インターフェイスに存在するアミノ酸残基 D22, F23, P135, A137, I139, L140 が含まれており、標的として用いたポケットサイトが適切であることが示された。また、選び出された薬剤はこれらのアミノ酸の相互作用を阻害し、カプシド形成を出来なくすることで、抗 HBV 活性を示す可能性があると思われた。

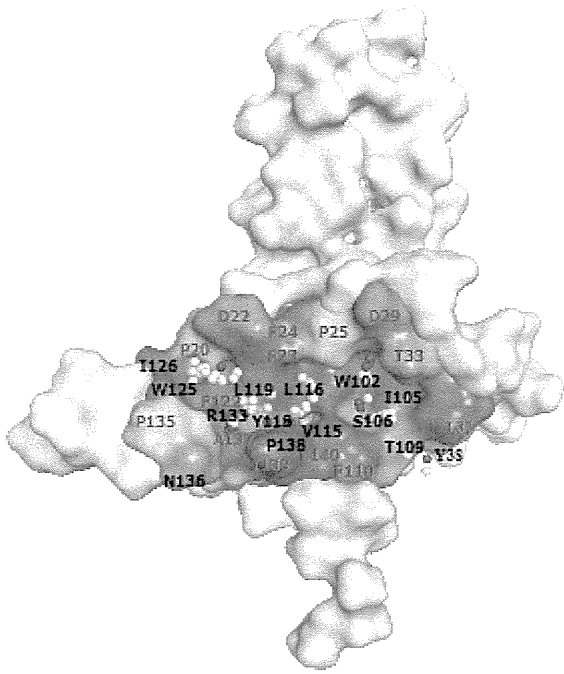
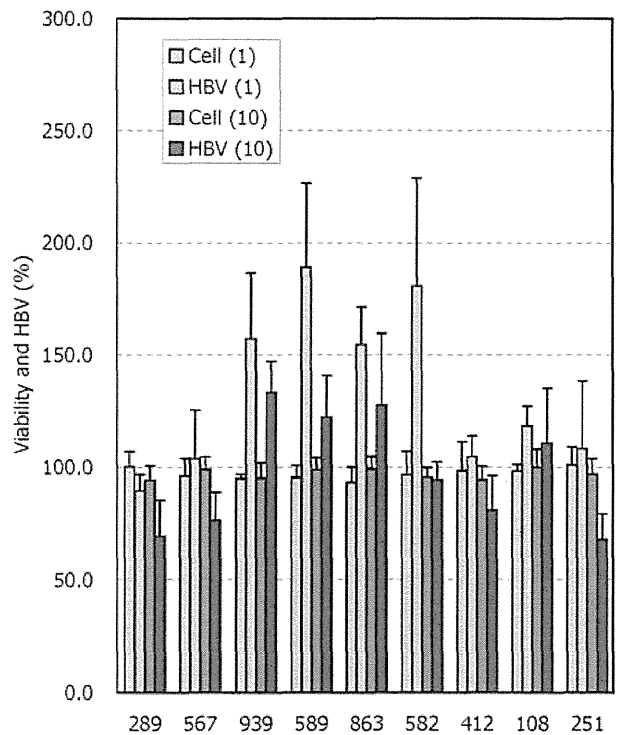


図1. カプシド-カプシド蛋白間のインターフェイスと *in silico* スクリーニングの標的サイト. 標的サイトを赤球と白球で示しており, それぞれの球は, 親水性と疎水性の性質を示す. また, カプシドのインターフェイスに関わるアミノ酸も示されており, この標的サイトに含まれるアミノ酸を赤文字で示す.

表1. 薬剤と HBV カプシド蛋白アミノ酸との相互作用. *In silico* スクリーニングにおいて, ドッキングスコアが良い結果を示した 50 薬剤との相互作用が示唆されるカプシド蛋白のアミノ酸を灰色で示した.

2. 抗 HBV 効果: *In silico* スクリーニングで選別された 50 種類の薬剤のうちから, 19 種類の薬剤を入手し, それらの HepG2.2.15.7 細胞における抗 HBV 効果を調べた. その際に, 抗 HBV 薬として臨床で使用されている lamivudine (3TC) を比較薬剤として用いた. 薬剤は最終濃度が何れも 1 および 10 μM になるように調整した. 結果を図 2 に示す. 19 種類の薬剤の大部分は, 細胞からのウイルス産生を全く抑制しないか, あるいは逆に増強させた. しかし, 一部の薬剤に関しては, 1 μM の濃度ではその効果が明確でないものの, 10 μM の濃度において, 明らかに培養上清中の HBV DNA の量を減少させることが分かった. そこで, これらの薬剤の中で, ドッキングスコアおよび 10 μM における抗 HBV 効果が最も優れていた薬剤 No. 289 を選んで, さらに詳しくその抗 HBV 効果について検討した.

Cmpd	Amino acid residues of HBV capsid													
	D 22	F 23	T 33	W 102	Y 118	W 125	R 133	P 135	A 137	P 138	I 139	L 140		
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														
19														
20														
21														
22														
23														
24														
25														
26														
27														
28														
29														
30														
31														
32														
33														
34														
35														
36														
37														
38														
39														
40														
41														
42														
43														
44														
45														
46														
47														
48														
49														
50														



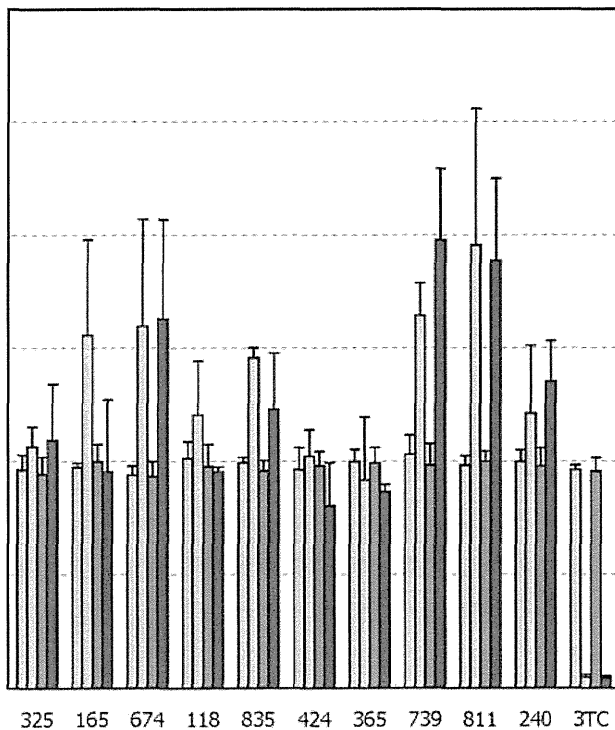
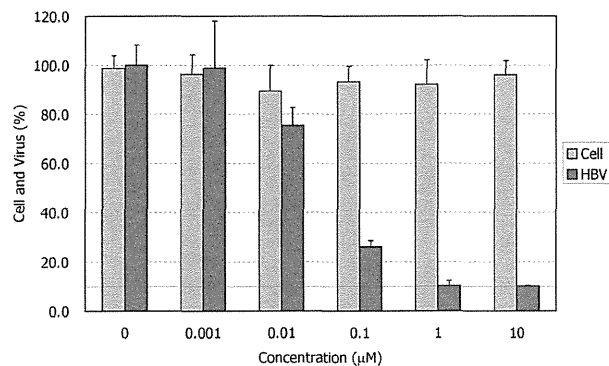


図 2. *In silico* スクリーニングにより選択された 19 薬剤の HepG2.2.15.7 細胞における抗 HBV 効果. 各濃度 (1 および 10 μM) の薬剤存在下における, 上清中の HBV DNA 量と生細胞数について, 薬剤なし (0 μM) の時のそれらを 100% として表した. 4 本の棒グラフはそれぞれの薬剤に関し, 左より生細胞数 (1 μM), HBV DNA 量 (1 μM), 生細胞数 (10 μM), HBV DNA 量 (10 μM) を示す.

まず, 3TC の抗 HBV 効果について検討したところ, 図 2 においても示されたように, 3TC は 1 μM の濃度で, ほぼ完全ウイルスの産生を抑制することが明らかとなった (図 3). この濃度において, 上清中には薬剤を添加しない時と比較して, 約 10% の HBV DNA が検出されるが, それ以上濃度を上げても, この DNA 量は減少しない. このことはウイルス遺伝子の新たな産生を完全に抑制しても, HBV が DNA ウィルスであるため, それまでに産生されたウイルスが引き続き培養上清中へ放出されるためであると思われる. また, 3TC は 0.1 μM の濃度でも約 75% のウイルス量を減少させることから, *in vitro* においては非常に強力な抗 HBV 薬であることが分かった.

3TC



289

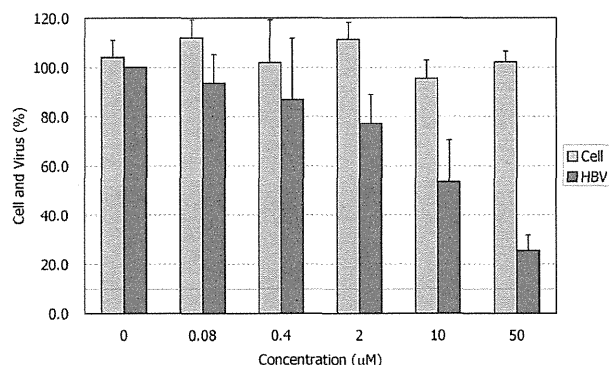


図 3. 3TC および薬剤 289 の HepG2.2.15.7 細胞における抗 HBV 効果. 細胞を種々の濃度の薬剤とともに培養し, 薬剤添加後 6 日後に生細胞数および上清中の HBV DNA を定量した.

薬剤 289 も濃度依存性に上清中の HBV DNA 量を減少させた. 本薬剤は 10 および 50 μM の濃度で, 上清中のウイルス量をそれぞれ約 45% および 75% 減少させた. 一方, この薬剤は 50 μM の濃度においても, 生細胞数に対してほとんど影響を与えなかった. 以上のことから, 薬剤 289 は弱いながらも選択的な抗 HBV 効果を有することが明らかとなった.

D. 考 察

HBV のコアは感染細胞の細胞質において, カプシド蛋白, ウィルスプレゲノム RNA, ウィルス DNA ポリメラーゼ, そしていくつかの宿主細胞由来の蛋白によってアセンブリーされる. コアはプレゲノム RNA からウィルス DNA の合成や細胞内輸送に必須であることから, コアを形成する際のカプシドーカ

プシド蛋白間の相互作用（インターフェイス）は、抗ウイルス薬の標的になる可能性がある。しかし、膨大な数の薬剤ライブラリーのランダムスクリーニングは、特に簡便な *in vitro* スクリーニング系が存在しない HBV では、費用やマンパワーの点で実施が難しい。そこで、本研究ではコンピューターを用いて、カプシド-カプシド蛋白間のインターフェイスを解析し、それに相互作用する薬剤を選び出す目的で、約 170,000 薬剤の *in silico* スクリーニングを実施した。これにより、実際に *in vitro* 抗 HBV アッセイを実施すべき薬剤を 50 種類に絞り込み、その中の 19 薬剤について、実際に抗 HBV 効果を調べた。

今回、同定された薬剤 289 は、*in silico* スクリーニングにおけるドッキングスコアが最も良い成績を示し、*in vitro* 抗 HBV 試験においても、濃度依存的にウイルス産生を抑制することが分かった。現時点において、この薬剤がコアの形成を阻害することで、抗 HBV 効果を発揮しているという証拠はない。また、抗ウイルス活性も 3TC と比較すると、十分とは言えない。臨床開発の可能性を明らかにし、薬剤の標的分子を同定するためには、より活性の高い誘導体を同定するとともに、構造活性相関の情報を得る必要がある。来年度はこの点を中心に、研究を進める予定である。

E. 結論

- ・HBV のカプシド蛋白を標的とする薬剤の *in silico* アッセイ系を確立し、それを用いて薬剤ライブラリーのスクリーニングを行った。
- ・その結果、ドッキングスコアの高い 50 種類の薬剤を選び出した。
- ・その中の 19 種類について、抗 HBV アッセイを行ったところ、濃度依存的にウイルスの産生を抑制する薬剤を同定することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ordonez P, Hamasaki T, Isono Y, Sakakibara N, Ikejiri M, Maruyama T, Baba M. Anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of novel

6-substituted

1-benzyl-3-(3,5-dimethylbenzyl)uracil derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**: 2582-2589 (2012).

2. Toyama M, Hamasaki T, Uto T, Aoyama H, Okamoto M, Hashimoto Y, Baba M. Synergistic inhibition of HTLV-1-infected cell proliferation by combination of cepharanthine and a tetramethylnaphthalene derivative. *Anticancer Res.* **32**: 2639-2646 (2012).
3. Sohl CD, Kasiviswanathan R, Kim J, Pradere U, Schinazi RF, Copeland WC, Mitsuya H, Baba M, Anderson KS. Balancing antiviral potency and host toxicity: identifying a nucleotide inhibitor with an optimal kinetic phenotype for HIV-1 reverse transcriptase. *Mol. Pharmacol.* **82**: 125-133 (2012).
4. Chande AG, Baba M, Mukhopadhyaya R. A single step assay for rapid evaluation of inhibitors targeting HIV type 1 Tat mediated long terminal repeat transactivation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **28**: 902-906 (2012).
5. Sakuma S, Suita M, Inoue S, Marui Y, Nishida K, Masaoka Y, Kataoka M, Yamashita S, Nakajima N, Shinkai N, Yamauchi H, Hiwatari K, Tachikawa R, Uto T, Baba M. Cell-penetrating peptide-linked polymers as carriers for mucosal vaccine delivery. *Mol. Pharm.* **9**: 2933-2941 (2012).
6. Kumamoto H, Kawahigashi S, Wakabayashi H, Nakano T, Miyaike T, Kitagawa Y, Abe H, Ito M, Haraguchi K, Balzarini J, Baba M, Tanaka H. Tuning efficiency of the 4-exo-trig cyclization by the electronic effect: ring closure of 3,3-difluoro-4-pentenyl carbon radicals and synthesis of a gem-difluorocyclobutane nucleoside. *Chem. Comm.* **48**: 10993-10995 (2012).
7. Thiyagarajan A, Salim MTA, Balaraju T, Bal C, Baba M, Sharon A. Structure based medicinal chemistry approach to develop 4-methyl-7-deazaadenine carbocyclic nucleosides

- as anti-HCV agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**: 7742-7747 (2012).
8. 馬場昌範. 抗ウイルス薬研究の歴史と進歩, 特集「抗ウイルス薬－最近の動向－」. 日本臨床. **70**: 553-557 (2012).
 9. 馬場昌範. 抗ウイルス薬の開発. 柳 雄介, 堤裕幸 (編集) 「新編 ウイルスの今日的意味」 pp117-126, 医薬ジャーナル社 (2012).
 10. Uto T, Toyama M, Nishi Y, Akagi T, Shima F, Akashi M, Baba M. Uptake of biodegradable poly(γ -glutamic acid) nanoparticles and antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Results Immunol.* **3**: 1-9 (2013).
 11. Nakamura M, Matsumoto Y, Toyama M, Baba M, Hashimoto Y. Organosilicon compounds as adult T-cell leukemia cell proliferation inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* **61**: 237-241 (2013).
 12. Hamasaki T, Okamoto M, Baba M. Identification of novel inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication by *in silico* screening targeting cyclin T1/Tat interaction. *Antimicrob. Agents Chemother.* in press.
 13. Haraguchi K, Takeda S, Kubota Y, Kumamoto H, Tanaka H, Hamasaki T, Baba M, Painsil E, Cheng Y-C. From the chemistry of epoxy-sugar nucleosides to the discovery of anti-HIV agent 4'-ethynylstavudine – Festinavir. *Curr. Pharm. Des.* in press.
 14. 馬場昌範. 抗ウイルス薬の歴史と分類、特集「抗ウイルス療法の現状と今後の展望」. 臨床と微生物**40**: 3-7 (2013).
 15. 濱崎隆之, 馬場昌範. 抗ウイルス薬. 医薬ジャーナル増刊号「新薬展望2013」 **49**: 102-108 (2013).
2. 学会発表
 1. 森園翔一郎, 岡本実佳, 濱崎隆之, 張 旭, 隅田泰生, 馬場昌範. コンドロイチン硫酸の抗 HIV-1 効果について. 第 49 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2012 年 8 月 24 日, 那覇.
 2. 馬場昌範, Mohammed TA Salim, 濱崎隆之, 岡本実佳, 渡士幸一, 浦田泰生, 青山 洋, 杉田和幸, 橋本祐一. 新規フェナンスリジノン誘導体の抗 HCV 効果について. 第 49 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2012 年 8 月 25 日, 那覇.
 3. Baba M, Uto T, Akagi T, Akashi M. Induction of potent cellular immunity by antigen-carrying biodegradable poly(γ - glutamic acid) nanoparticles: A potential candidate for an anticancer vaccine adjuvant. *17th World Congress on Advances in Oncology and 15th International Symposium on Moleculare Medicine*, October 12, 2012, Crete, Greece.
 4. 蝶野英人, 岡本実佳, 井上晃一, 百々克行, 津田大嗣, 川野泰広, 濱崎隆之, 馬場昌範, 峰野純一. RNA 分解酵素 MazF を用いた HIV-1 感染症遺伝子治療法の開発. 第 26 回日本エイズ学会学術集会, 2012 年 11 月 25 日, 横浜.
 5. 濱崎隆之, 岡本実佳, 馬場昌範. Tat 依存性の HIV-1 産生を抑制する新規低分子化合物の同定. 第 26 回日本エイズ学会学術集会, 2012 年 11 月 25 日, 横浜.
- G. 知的所得権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
分担研究報告書（平成 24 年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究分担者：Akbar Sheikhmohammadfazole

分担研究課題：**Mechanism underlying containment of HBV replication in chronic HBV-infection**

研究要旨：

Considerable numbers of patients with chronic hepatitis B virus (HBV) develop progressive liver-related complications, i.e. liver cirrhosis, hepatic decompensation, hepatic failure, and hepatocellular carcinoma. Several antiviral drugs are used in patients with chronic hepatitis B (CHB) to block complications. However, these drugs are endowed with limited therapeutic efficacy and considerable adverse effects. Circumstantial evidences have shown that antiviral drugs are neither able to eradicate all forms of HBV DNA including ccc DNA nor they are capable of inducing appropriate levels of immune modulation in CHB patients. On the other hand, HBV replication and liver damages remain controlled in many chronic HBV-infected subjects by host immunity. These facts initiated a new mode of therapeutic approach, immune therapy, for CHB patients. However, upregulation of host immunity did not show therapeutic effects in CHB patients. Available data indicates that there are considerable complexities about the role of host immunity in HBV infection. Host immunity acts as a double-edged sword in CHB patients. In one hand, it is responsible for HBV replication, progression of liver diseases and complications (pathogenic immunity). On the other hand, host immunity is also capable of blocking HBV replication and liver damages (protective immunity). However, the natures and properties of ‘pathogenic immunity’ and ‘protective immunity’ have not been properly addressed in chronic HBV infections. As a result, a viable regimen of immune therapeutic approach is yet to be surfaced for these patients.

A. 研究目的

The final target of this study is to develop new, novel and evidence-based therapeutic regimen for chronic HBV infection. To accomplish this, the primary aim of this study is to dissect the characteristics of ‘pathogenic immunity’ and ‘protective immunity’ in chronic HBV infection. The intermediate objective is to assess if an evidence-based and innovative therapy can be developed for chronic HBV-infected subjects with retrieved information. The final target is to provide a strategy and road map of immune therapy for CHB patients.

B. 研究方法

The study was conducted in both animal model of chronic HBV infection and also in patients with chronic

hepatitis B. HBV transgenic mice (HBV TM) expressing HBV DNA, hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B antigen (HBeAg) were used as animal model of chronic HBV infection. Also, patients with CHB with HBV replication and liver damages were enrolled in this study.

1. HBV TM were injected either with phosphate-buffered saline (PBS) (Control group) or with non-antigen-specific immune modulators [concanavalin A (Con A), lipopolysachcharides (LPS), polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C), interferon (IFN)-gamma, and interleukin (IL)-2] for variable durations. Also, another group of HBV TM with comparable levels of HBsAg in the sera were immunized with HBV-related antigens [HBsAg,

hepatitis B core antigen (HBcAg), and a combination of HBsAg and HBcAg (HBsAg/HBcAg)], intraperitoneally for variable durations.

2. Patients with CHB were immunized with vaccines containing HBsAg and HBsAg/HBcAg by nasal route and subcutaneous routes, once in 2 weeks for 10 times.
3. Kinetics of HBV DNA, HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe, and alanine aminotransferase (ALT) were evaluated in the sera of HBV TM and CHB patients. Liver histology was checked in control and immunized HBV TM.
4. In vitro cell culture experiments were accomplished with immunocytes of both HBV TM and CHB patients to assess; Con A-induced T cell proliferation, T cell proliferation in allogenic mixed leukocyte reaction (MLR), and HBsAg-, and HBcAg-specific T cell proliferation. Also, HBsAg- and HBcAg-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) were assessed in the liver of HBV TM.

(倫理面への配慮)

All mice used in this study received human care and permissions were obtained from institutional review board to conduct the study. Informed written consent was obtained from all patients with CHB before their enrollment in this study. Also, permission was obtained from ethical committee of the hospital before human study. In case of collaborative studies, all sorts of permission were taken by the Principal Investigators of the concerned institution.

C. 研究結果

Although immune modulation was recorded in HBV TM due to administration of both non-antigen-specific and antigen-specific immune modulators, the nature of immunity was different. Data of preliminary studies are shown below.

Role of different immune modulators in HBV TM

1. Administration of non-antigen-specific immune modulators in HBV TM caused liver damages evidenced by increased levels of ALT and histological features of liver damages; an inflammatory mucosal milieu prevailed in the liver of HBV TM
2. However, the levels of HBV DNA, HBsAg, and HBeAg were not down regulated in HBV TM, injected with non-antigen-specific immune modulators.
3. In vitro study showed insignificant induction of HBsAg- and HBcAg-specific T cells or antigen-specific CTLs in the spleen and liver of HBV TM due to administration of non-antigen-specific immune modulators.
4. On the contrary, administration of HBsAg and HBsAg/HBcAg-based vaccine caused reduction of HBV DNA, negativity of HBsAg, and induction of anti-HBs and anti-HBe in HBV TM without causing elevation of ALT or liver damages.
5. HBsAg and HBsAg/HBcAg-based vaccines also induced HBsAg-, and HBcAg-specific T cells and CTL in the spleen and the liver of HBV TM.

HBsAg and HBsAg/HBcAg-based vaccine in CHB patients

Administration of HBsAg and HBsAg/HBcAg-based vaccines caused both reduction of HBV DNA and normalization of ALT in more than 50% of CHB patients. HBsAg and HBcAg-specific T cells were detected in higher frequencies due to administration of HBsAg and HBsAg/HBcAg-based vaccine in CHB patients. However, flare of ALT or liver damages were not detected due to immunization with HBV antigen-specific immune modulators in CHB patients.

D. 考察

The limitation of present regimens of antiviral therapy in CHB patients has exposed a new field of treatment of these patients by manipulating host immunity, a concept

that has been described as ‘immune therapy’. Initially, it was assumed that upregulation of host immunity may have therapeutic utility in CHB patients, however, several studies during last 3 decades provided insights about a need of overhauling the entire concepts and designs of immune therapy in CHB patients.

As both natural and inducible immunity in CHB patients may have both pathogenic and protective properties, it was of utmost importance to characterize the properties of these two types of immunity in CHB.

Using an animal model of chronic HBV carrier state, this study has shown that non-antigen-specific immunity seems to induce ‘pathogenic immunity’, whereas, HBV antigen-specific immune modulation resulted in ‘protective immunity’ without causing liver damages and other adverse effects.

Based on this data, translation studies were accomplished in patients with CHB by administration of HBsAg-based vaccines (vaccine therapy). Subsequently, a group of patients with CHB were administered with a combination of vaccine of HBsAg and HBcAg to assess the therapeutic potential of HBsAg/HBcAg vaccine. The preliminary data indicate the safety as well as antiviral and liver protecting capacities of antigen-specific immune therapeutic approach in CHB patients. However, more studies about dose, duration of therapy, alteration of designs and other factors would have to be considered to develop a regimen of immune therapy by dissecting the nature of ‘pathogenic immunity’ and ‘protective immunity’ in CHB patients

E. 結論

Dissection of nature of ‘pathogenic immunity’ and ‘protective immunity’ in chronic HBV infection would allow development of new and novel innovative therapy for CHB patients. The concepts of these studies may also be applicable to develop alternative and evidence-based therapy for patients with chronic hepatitis C and hepatocellular carcinoma

F. 研究発表

1. 論文発表

Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Strong and multi-antigen specific immunity by hepatitis B core antigen (HBcAg)-based vaccines in a murine model of chronic hepatitis B: HBcAg is a candidate for a therapeutic vaccine against hepatitis B virus. *Antiviral Res.* 2012;96(1):59-64

Akbar SM, Hiasa Y, Al-Mahtab M, Onji M. Dendritic cell-based immune therapy in liver diseases. *Current Immunology Review* 2012; 8(1): 28-36

Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S, Kamal M, Khan MSI. Biochemical, virological, immunological and histopathological features of 702 incidentally detected chronic hepatitis B virus carriers in Bangladesh. *Digestion* 2012; 86 (1): 1-5

Hoshino H, Hino K, Miyakawa H, Takahashi K, Akbar SM, Mishiro S. Inter-genotypic recombinant hepatitis C virus strains in Japan noticed by discrepancies between immunoassay and sequencing. *J Med Virol* 2012; 84: 1018-1024

Miyashita K, Kang J-H, Saga A, Takahashi K, Shimamura T, Yasumoto A, Fukushima H, Sogabe S, Konishi K, Uchida K, Fujinaga A, Matsui T, Sakura Y, Tsuji T, Maguchi H, Taniguchi M, Abe N, Akbar SM, Arai M, Mishiro S. Three Cases of Acute or Fulminant Hepatitis E Caused by Ingestion of Pork Meat and Entrails in Hokkaido, Japan; Zoonotic Food-Borne Transmission of Hepatitis E Virus and Public Health Concerns. *Hepatol Res.* 2012; 42(9):870-878.

2. 学会発表

22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 16-19th February 2012, Taipei, Taiwan

Akbar SM, Chen S, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Myeloid-derived suppressor cells; a critical regulator of intrahepatic immunity in chronic HBV infection.

Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Hiasa Y, Onji M. Mechanism underlying insignificant therapeutic effects

of combination of antiviral and vaccine therapy in patients with chronic hepatitis B: need of maintenance of hepatitis B core antigen-specific immune responses.

6th Annual World Vaccine Congress Asia 2012, 11-14th June 2012, Singapore

Akbar SM and Al-Mahtab. Bridging clinical outcome with immunological events for preclinical and clinical trial

14th International Symposium on Viral Hepatitis and liver Disease (ISVHLD), Shanghai, China, June 22-25th 2012

Akbar SM, Al-Mahtab M, Aguilar J, Onji M, Mishiro S. Activation of Dendritic Cells and Induction of Antigen-Specific Immunocytes by a Therapeutic Vaccine Containing Both HBsAg and HBcAg Administered Through Nasal Route in Chronic Hepatitis B; A Patient-Friendly and Evidence-Based Therapeutic Approach

Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Hiasa Y, Onji M. HBsAg-specific immune responses by HBcAg-pulsed dendritic cells: Role of antigen and adjuvant in therapeutic vaccine against chronic hepatitis B.

9th Turkish Hepato Gastroenterology Congress.

September 26-30, 2012, Cyprus, Turkey

Akbar SM. Designing and Engineering Immune Therapy Against Chronic HBV infection

APASL 3rd Single Topic Conference on HBV. Dhaka, Bangladesh, October 6th -7th

Akbar SM. Immune pathogenesis of HBV-related liver damages

6th Annual Meeting of Pakistan Society for the Study of Liver Diseases. Karachi, Pakistan, December 14-16 2012.

Akbar SM. Immune responses and immune therapy in HCC.

Akbar SM. Treatment: What is new in pipeline-Therapeutic vaccine for hepatitis B.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（B型肝炎創薬実用化等研究事業）
 分担研究報告書（平成24年度）

B型肝炎ウイルスの感染複製機構の解明に関する研究

研究分担者：森川 賢一

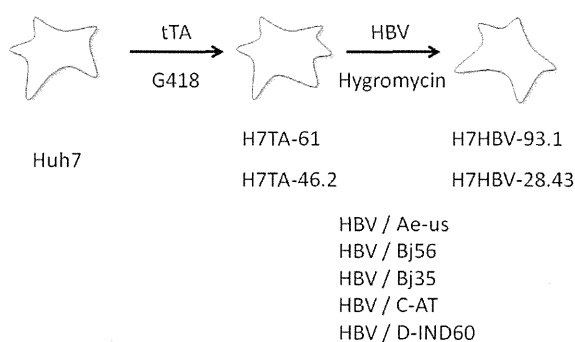
研究協力者：Manfredo Quadroni（ローザンヌ大学）

島崎 とも江（昭和大学）

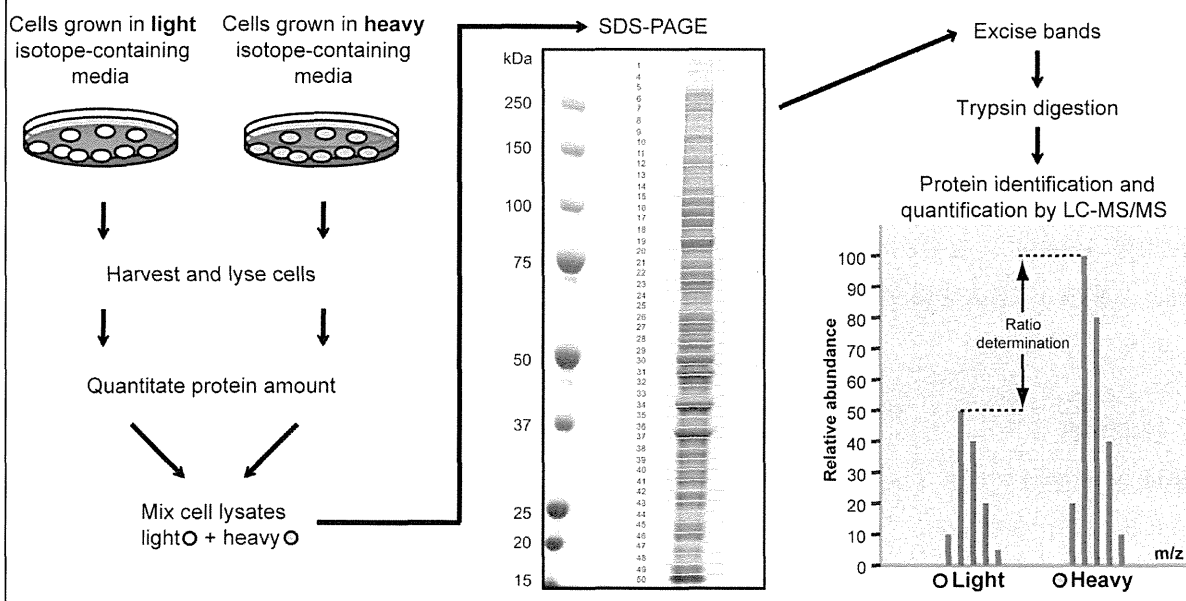
分担研究課題：B型肝炎ウイルス肝炎により誘導される宿主因子の網羅的プロテオーム解析

研究要旨：

I. HBV細胞株の樹立方法



II. SILAC法の概要



A. 研究目的

B型肝炎ウイルス（HBV）細胞モデルを用い、HBV蛋白発現下において誘導される宿主因子を網羅的にプロテオーム解析する。

B. 研究方法

HBV蛋白発現調整細胞株を樹立する。HBV蛋白非発現群と発現群をSILAC法にて標識しプロテオーム解析による比較検討し、HBVにより誘導される宿主因子を検討する。

(倫理面への配慮)

I. 本研究は病原微生物の取り扱いについて日本ウイルス学会の「ウイルス研究におけるバイオセーフティ指針」に基づきウイルス取り扱い者に対する安全対策と、ウイルスの実験施設外への漏出予防を十分に考慮し行う物とする。

II. 細胞株作成に用いた患者血清は、すべての解析についてインフォームドコンセントを得て採取されている。ヒトの遺伝子解析を行う予定はない。

III. 肝疾患患者からの試料提供を受ける場合には、試料提供者、その家族、および同様の肝疾患患者の人権、尊厳が保護されるよう十分に配慮する。厚生労働省等により定められた「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠し当該研究機関の医学研究倫理審査委員会に申請し、インフォームドコンセントに係わる手続きを実施し、提供試料、個人情報等を厳格に管理、保存する。動物実験に関しては「動物の保護および管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)および「実験動物の飼育及び保管に関する基準」(昭和55年総理府公示第6号)の法律および基準の他、「大学等における実験動物について」(文部科学省国際学術局長通知、文学情第141号)の通知を踏まえつつ、動物実験が有効かつ適切に行われるよう配慮する。当該研究機関の動物実験倫理委員会に申請し、承認を得た後に実施する。遺伝子組み換え実験においては「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」(平成15年法律第97号)を遵守して実施する。

C. 研究結果

平成24年度はプラスミドの構築を行い、細胞株を樹立に向け進行中である。

D. 考察

細胞株樹立の後、SILAC法にて比較プロテオーム解析を施行する予定である。

E. 結論

HBV細胞モデルを構築し、HBV蛋白発現下において

誘導される宿主因子を網羅的にプロテオーム解析することにより、宿主因子をターゲットとした創薬へと繋がる事が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T.

Novel cell culture-adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone.

J Virol. 2012 Oct;86(19):10805-20.

Inokuchi M, Ito T, Nozawa H, Miyashita M, Morikawa K, Uchikoshi M, Shimosuma Y, Arai J, Shimazaki T, Hiroishi K, Imawari M.

Lymphotropic hepatitis C virus has an interferon-resistant phenotype.

J Viral Hepat. 2012 Apr;19(4):254-62.

Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T.

Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone.

Microbiol Immunol. 2012 May;56(5):308-17.

Lange CM, Kutalik Z, Morikawa K, Bibert S, Cerny A, Dollenmaier G, Dufour JF, Gerlach TJ, Heim MH, Malinverni R, Müllhaupt B, Negro F, Moradpour D, Bochud PY; Swiss Hepatitis C Cohort Study Group.

Serum ferritin levels are associated with a distinct phenotype of chronic hepatitis C poorly responding to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy. Hepatology. 2012 Apr; 55(4):1038-47.

2. 学会発表

Kenichi Morikawa, Jérôme Gouttenoire, Huong T. L. Tran, François Penin, Markus H. Heim, Manfredo Quadroni and Darius Moradpour. Identification of

GPx8 as a Novel Cellular Substrate of the Hepatitis C Virus NS3-4A Protease. Annual meeting of AASLD. Boston, USA, 9-13 November 2012. Poster.

Kenichi Morikawa, Jérôme Gouttenoire, Huong T. L. Tran, François Penin, Markus H. Heim, Manfredo Quadroni and Darius Moradpour. Identification of GPx8 as a Novel Cellular Substrate of the Hepatitis C Virus NS3-4A Protease. 19th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Venice, Italia, 5-9 October 2012. Oral.

Kenichi Morikawa, Jérôme Gouttenoire, Huong T. L. Tran, Markus H. Heim, Manfredo Quadroni and Darius Moradpour. IDENTIFICATION OF GPX8 AS A NOVEL CELLULAR TARGET OF THE HEPATITIS C VIRUS NS3-4A PROTEASE. Annual Meeting of SGG. Interlaken, Switzerland, 20-21 September 2012. Oral.

森川賢一. 第48回日本肝臓学会総会ワークショップ18「C型肝炎ウイルスの制御を目指した基礎戦略」
C型肝炎ウイルス非構造蛋白3-4Aプロテアーゼにより切断される新規宿主蛋白の探索. 金沢、2012年6月7-8日.

G. 知的所得権の出願・登録状況

1. 特許取得; 特記事項なし
2. 実用新案登録; 特記事項なし
3. その他; 特記事項なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

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
飯島沙幸 田中靖人	ウイルス肝炎研究における GWAS の意義	小池和彦	化学療法の領域	医療ジャーナル社	大阪	2012	47-57
田中純子 小山富子 相崎英樹	C 型肝炎ウイルス (HCV) による感染	日本臨床ウイルス学会	臨床とウイルス	日本臨床ウイルス学会	東京	2012	28-35
相崎英樹	HCV 感染と代謝異常 (脂質・エネルギー)	医歯薬出版株式会社	医学の歩み	医歯薬出版株式会社	東京	2012	in press
相崎英樹	HCV 粒子形成に関与する脂肪滴周辺蛋白の同定と機能解析	株式会社メディカルトリビューン	Liver Forum in Kyoto 第 14 回 学術集会記録集	株式会社メディカルトリビューン	東京	2012	30-33
相崎英樹	C 型肝炎ウイルスの生活環	ニューサイエンス社	細胞	ニューサイエンス社	東京	2012	in press

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
Narita Y, Murata T, <u>Ryo A</u> , Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T.	Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication.	J Virol	87(4)	2120-27	2012
Miyakawa K, Sawasaki T, Matsunaga S, Tokarev A, Quinn G, Kimura H, Nomaguchi M, Adachi A, Yamamoto N, Guatelli J, <u>Ryo A</u> .	Interferon-induced SCYL2 limits release of HIV-1 by triggering PP2A-mediated dephosphorylation of the viral protein Vpu.	Sci Signal	245(5)	ra73	2012
Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, <u>Sato H</u> , Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, <u>Ryo A</u> .	Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis.	J. Proteomics	75(15)	4863-73	2012

C. J. Hipolito, <u>H. Suga</u>	Ribosomal production and in vitro selection of natural product-like peptidomimetics: The FIT and RaPID systems	Current Opinion in Chemical Biology	16	196-203	2012
Y. Hayashi, J. Morimoto, <u>H. Suga</u>	In vitro selection of anti-Akt2 thioether-macrocyclic peptides leading to isoform-selective inhibitors	ACS Chemical Biology	7	607-613	2012
K. Iwasaki, Y. Goto, T. Katoh, <u>H. Suga</u>	Selective thioether macrocyclization of peptides having the N-terminal 2-chloroacetyl group and competing two or three cysteine residues in translation	Organic & Biomolecular Chemistry	10	5783-5786	2012
Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, <u>Chiba T.</u>	Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing.	PLoS ONE	7	e35052	2012
Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Ogawa K, Yoshizawa A, Hata K, Fujimoto Y, Nishijima N, <u>Chiba T.</u> , Uemoto S.	Efficacy and safety of prophylaxis with entecavir and hepatitis B immunoglobulin in preventing hepatitis B recurrence after living donor liver transplantation.	Hepatology Res.	43	67-71	2012
<u>Chiba T.</u> , Marusawa H, Ushijima T.	Inflammation-associated cancer development in digestive organs: Mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation.	Gastroenterology	143	550-563	2012
Okuyama S, Marusawa H, Matsumoto T, Ueda Y, Matsumoto Y, Endo Y, Takai A, <u>Chiba T.</u>	Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis.	Int J Cancer.	130	1294-1301	2012

Ueda Y, Marusawa H, Kaido T, Ogura Y, Oike F, Mori A, Ogawa K, Yoshizawa A, Hatano E, Miyagawa-Hayashino A, Haga H, Egawa H, Takada Y, Uemoto S, <u>Chiba T</u> .	Effect of maintenance therapy with low-dose peginterferon for recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation.	J Viral Hepat.	19	32-38	2012
Osaki Y, Ueda Y, Marusawa H, Nakajima J, Kimura T, Kita R, Nishikawa H, Saito S, Henmi S, Sakamoto A, Eso Y, <u>Chiba T</u> .	Decrease in alpha-fetoprotein levels predicts reduced incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus infection receiving interferon therapy.	J Gastroenterol.	47	444-451	2012
Takahashi K, Marusawa H, <u>Chiba T</u>	Large-scale identification of effector genes that mediate the type I interferon antiviral response.	Gastroenterology	142	178-180	2012
Shimizu T, Marusawa H, Endo Y, <u>Chiba T</u>	Inflammation-mediated genomic instability: roles of AID in carcinogenesis.	Cancer sci	103	1201-1206	2012
Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Nasronudin, Amin M, Juniastuti, Soetjipto, <u>Hotta H</u> , Hayashi Y.	Detection of highly prevalent hepatitis B virus co-infection with HIV in Indonesia.	Hepatol Res	In press		
El-Shamy A, Shindo M, Shoji I, Deng L, Okuno T, <u>Hotta H</u> .	Polymorphisms of the core, NS3 and NS5A proteins of hepatitis C virus genotype 1b associate with development of hepatocellular carcinoma.	Hepatology	In press		
Matsui C, Shoji I, Kaneda S, Sianipar IR, Deng L, <u>Hotta H</u>	Hepatitis C virus infection suppresses GLUT2 gene expression via down-regulation of hepatocyte nuclear factor 1 α .	J Virol	86(23)	12903-11.	2012
El-Shamy A, Shoji I, El-Akel W, Bilasy SE, Deng L, El-Raziky M, Jiang DP, Esmat G, <u>Hotta H</u> .	NS5A sequence heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4a predicts clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy in Egyptian patients.	J Clin Microbiol	50(12)	3886-92.	2012