

をMS/MS分析し、166Nあるいは170Nの糖鎖は170Nに結合していることを確認した。Asp-N消化物でも11断片をMS/MSし、アミノ酸配列の73%をカバーする断片を得た。nLC-MS分析では、トリプシンでは75%の配列をカバーするMS/MSが、Asp-Nでは90%をカバーするMS/MSが得られた。nLC-MS/MSでは、165NのHexNAc化が見られており、合計で6か所の糖鎖部位を確認した。（図1参照）

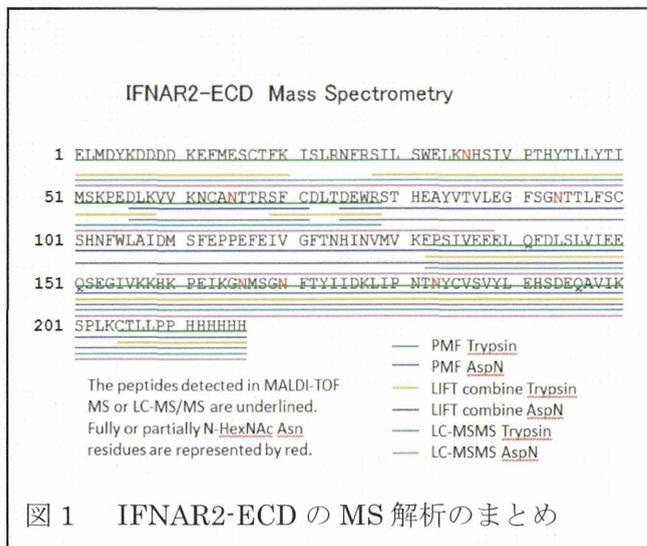


図1 IFNAR2-ECDのMS解析のまとめ

また、本年度はフォトアフィニティーラベルを導入したCDE化合物を合成したが、IFNAR2-ECDとの結合がみられなかったため、MS解析には進まなかった。

非共有結合的な結合を解析するためにCDE化合物とIFNAR2-ECDを共存化で混合してトリプシン消化を試みたが、再現的な差を検出することはできなかった。

また、網羅的修飾解析では、候補の探索を進め、標的候補タンパク質の抗体を作成した。

慢性HBV肝線維化予防・治療候補薬開発においては、TGF-β LAPの切断部位を解析した。

D. 考察

IFNAR2-ECDの構造を確認した。消化方法やイオン化法の異なる装置を用いることで、タンパク質のすべての部分のペプチドを検出できた。ま

た、特にLIFTモードやnLC-MSによるMS/MS分析においても、すべての範囲を含むペプチドを検出できたため、フォトアフィニティーラベルなどの共有結合性の残基を導入したCDE化合物の残基レベルでの結合部位の解明が期待できる。

また、IFNAR2-ECDではNXS/T/CのN型糖鎖結合予想部位が6か所あったがすべての部位で、糖鎖の付加を確認した。しかし、65N(NTT)以外の糖鎖付加部位では、糖鎖の付加していないペプチドも検出され、糖鎖付加が部分的であることを示している。このことは、これらの糖鎖が必須ではないことを示すと思われるため、65N以外のN->Qの置換などを行うことで糖鎖によるヘテロジニティーを低減して結晶化を容易にすると予想される。これらの知見は、最適化のためのin silico探索に向けての重要な基礎データとなる。

フォトアフィニティーラベルを導入したCDE化合物の解析準備を行ってきたが、結合が確認できなかった。次の化合物に向けて準備を行う。また、共有結合が導入できなかった場合についても結合部位解析ができないか検討した。化合物の結合によって結合部位のプロテアーゼ耐性が生じる可能性があるため、非変性条件でCDE化合物とIFNAR2-ECDを共存させ消化を試みたが、残念ながら、再現的な差は見られなかった。低分子の結合の場合、マスクされる部分が小さいため、プロテアーゼ耐性が見えるほどの変化がなかったものと思われる。来年度は、重水素置換法を用いて非共有結合でも解析できるよう準備を進める。

E. 結論

CDE化合物の標的タンパク質であるIFNα2の細胞外ドメインの構造を質量分析で構造を解析し、糖鎖結合部位6箇所を含むアミノ酸配列の100%を確認した。これにより、CDE化合物結合部位について本年度は決定できなかったが、結合部位解析にむけての基礎データとなった。In silico探索でのCDE化合物の最適化に向けて貢献した。

F.健康危険情報

該当なし

G.研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1.論文発表

(1) Hara, M., Kirita, A., Kondo, W., Matsuura, T.,
Nagatsuma, K. Dohmae N., Ogawa, S.,
Imajoh- Ohmi, S., Friedman, S.L., Rifkin, D.B. and
Kojima, S. "LAP degradation product reflects plasma
kallikrein-dependent TGF- β activation in patients with
hepatic fibrosis." **Springerplus**, 3:221(2014)

(2) 堂前直 益田晶子 “極微量タンパク質
解析のための超高感度アミノ酸分析ータンパ
ク質の加水分解、アミノ酸の誘導体化の留意
点 ” 製品中に含まれる (超)微量成分・不純物
の同定・定量ノウハウー 試料前処理からデータ
解釈まで -技術情報協会 p p 182-189
(2014)

2.学会発表

(1) Naoshi Dohmae, “A Challenge to the
Non-target Quantitative Modificome in
Human Cell” The First meeting on RIKEN
EPIGENETICS in Yokohama Feb 17th,2014.
(2) 堂前直、アフィニティー精製によらないモ
ディフィコーム(網羅的翻訳後修飾)解析第87回
日本生化学会大会、京都、2014/10/17

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

①特許取得

該当なし

②実用新案登録

該当なし

③その他

該当なし

“京” コンピュータを用いた計算科学
— 分子ドッキングによる IFNAR2 機能制御薬剤候補化合物の探索 —

研究分担者 平野 秀典

所属先 理化学研究所 計算分子設計研究グループ 職名 研究員

研究要旨

IFNAR2 機能制御薬剤候補化合物の探索を行うために、IFN 様低分子化合物の結合部位および結合様式の子測を行った。また、研究グループ内で合成展開された IFN 様物質の活性測定データから構造活性相関による評価を行った。これらの結果を用いて分子シミュレーションによるスクリーニングを実行し、薬剤候補分子の絞込みや提案を試みた。

A. 研究目的

インターフェロン(IFN)は、生体内でのウイルスや病原体、腫瘍細胞といった異物の侵入に応答して産生される非特異的な防御活性をもつサイトカインである。IFN により調節される細胞内シグナル伝達経路の代表的なものとしては JAK-STAT 経路が知られている。各タイプの IFN は異なるタイプの受容体を利用し、I 型 IFN は IFNAR1 と IFNAR2 のヘテロ受容体に結合し、それぞれの受容体に会合している JAK1 と Tyk2 のリン酸化を引き起こすことで、ウイルス増殖を抑制すると考えられている。その際、情報伝達機能を担っているのは IFNAR2 であるとされている。

IFN 以外にも、IFN の作用と同様の作用を有する低分子 IFN 様物質が知られている。それらの物質は IFN レセプターに作用する、もしくは IFN のシグナル伝達経路に作用することで IFN 様の作用を発揮していると推測されるが、必ずしも IFN の多彩な生物活性を全て再現している訳ではない。また、いずれの物質も臨床において有効性を示すには至っておらず、現時点では臨床的に有用な低分子 IFN 様物質は見出されていないに等しい。

Konishi らは IFNAR2 に作用すると考えられる低分子 IFN 様物質を報告した(*Scientific reports*

(2012) 2: 259 DOI: 10.1038/srep00259)。しかしながら、IFN 様物質の IFNAR2 に対する結合部位は特定には至っていない。そこで、本研究では、IFNAR2 を創薬標的タンパク質とし、低分子 IFN 様物質の結合部位の推定を行い、分子シミュレーションにより「有用な」低分子 IFN 様物質のスクリーニングを実行することで、IFNAR2 機能制御薬剤候補化合物の探索および絞込みを試みた。

また、本分子シミュレーションを通じて、研究グループ内で実行されている実験のデータとの整合性を取ることも目的の一つである。

B. 研究方法

分子ドッキングを行う際には、ターゲットタンパク質の立体構造情報が必要である。本研究で創薬標的タンパク質とした IFNAR2 の立体構造は、Protein Data Bank に登録されている X 線結晶解析構造(PDB entry: 3S9D, 3SE3)を用いた。これらの構造は、タンパク質単独のもので、リガンドの結合情報は含まれていない。そこで、Konishi らにより報告された IFN 様作用物質の結合部位を推定し、分子ドッキングによる化合物のスクリーニングを行った。分子ドッキングには GOLD および glide を用いた。さらに、本研究グループで合成展開された IFN 様物質群 (CDE 化合物群) の活性測定データに基づいて構造活性相関を評価した。これらの結果を加味して、分子シミュレ

ーションによる化合物スクリーニングの最適化を試みている。

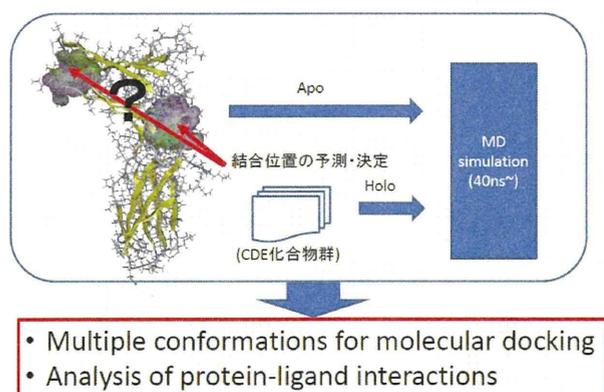
(倫理面への配慮)

なし

C.研究結果

IFNAR2 の構造と生化学実験により見付けられた IFN 様物質について分子ドッキングを行い、複合体構造を予測した。その結果を基に、大規模化合物ライブラリを利用した分子スクリーニングを実行し、化合物の絞り込みを行った。

さらに、本研究グループで合成展開された IFN 様物質(CDE 化合物群)の活性測定データを用いて構造活性相関を評価し、次期の合成展開の際に付加する官能基の位置や種類の提案を行った。



図：IFNAR2 に結合する化合物の分子スクリーニングのイメージ

D.考察

今年度はタンパク質の構造を X 線結晶解析構造とした分子ドッキングを行い、候補化合物の絞り込みを試みた。現在は、動的構造を考慮した分子ドッキングを行うために、分子動力学計算を実行中である。今後は、分子動力学計算により得られた複数の構造を用いて分子ドッキングを行う予定である。また、今後得られる IFNAR2-リガンド複合体の結晶解析構造や生化学実験から、結合部位や、構造活性相関などの情報も取り入れ、複数の構造と他の大規模な化合物データベース等も考慮に入れた分子ドッキングを行うことで、新規薬候補化合物選定へとつなげたい。

E.結論

本研究では、IFNAR2 機能制御薬候補化合物の探索を行うために、IFNAR2 の結晶構造を用いて分子スクリーニングを行った。その際、化合物の結合部位および結合様式の予測を行い、分子ドッキングによる化合物スクリーニングを実行し、薬候補分子の絞り込みを試みた。

また、本研究グループによって合成および活性値測定された化合物について構造活性相関を行い、次期の合成展開の際に付加する官能基の位置や種類を提案した。

今後は今までに本研究グループ内外で行われてきた実験や分子シミュレーションより得られたデータを次の分子シミュレーション実行時にフィードバックし、薬候補化合物探索に生かしていく。また、複数の探索方法を階層的に組み合わせた薬候補化合物群の絞り込み手法を確立し、IFNAR2 タンパク質に対する本手法の効率化および高精度化を目指す。さらに、他の薬標的タンパク質についても同様な計算を行い、実験結果との整合性や相関を考慮することで、計算化学的手法を用いた B 型肝炎創薬探索手法の効率化および高精度化を目指す。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

H.知的所有権の取得状況 (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

B型肝炎制圧のための創薬研究に向けた臨床検体収集とトランスクリプトーム解析

研究分担者 名越澄子 埼玉医科大学総合医療センター 消化器・肝臓内科 教授
研究協力者 滝川康裕 岩手医科大学 内科学講座 消化器内科肝臓分野 教授
寺井崇二 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 消化器内科学分野 教授
清水雅仁 岐阜大学大学院 医学系研究科 消化器病態学分野 教授
日高 勲 山口大学医学部附属病院・肝疾患センター 助教

研究要旨

核酸アナログ製剤の治療効果予測および新薬における治療反応性の向上に繋げることを目的として、genotype C、HBeAg陽性の男性症例におけるエンテカビル治療効果をHBV-DNA量の推移により3群に分類し、各群におけるウイルス因子と宿主因子の相違をトランスクリプトーム解析等により解析中である。

A.研究目的

エンテカビルはB型肝炎ウイルス（HBV）に対して、ラミブジンやアデホビルよりも高い抗ウイルス効果があり、耐性株の出現率も低いことから、2006年に保険適用となって以来、核酸アナログ製剤の初回投与時の第1選択薬であった。日本における初回投与例では、1年目のHBV-DNA陰性化率は77～88%と報告されている。

次いで2014年に保険認可されたテノホビルは、核酸アナログ製剤未治療例の抗ウイルス効果はエンテカビルと同等であるが、エンテカビルより耐性ウイルスが出現しにくいとされる。一方、テノホビルは従来の核酸アナログ製剤治療に対する反応不良例に有効とされている。日本肝臓学会のB型肝炎治療ガイドラインでは、エンテカビル単剤投与開始から6～12か月経過した時点で、HBV-DNAが4.0 Log copies/mL以上の場合には治療効果不良例と判断され、ラミブジン・テノホビル、あるいはエンテカビル・テノホビル併用へ変更することが推奨されている。また、エンテカビル単剤投与開始から12か月以上経過した時点で、HBV-DNAが4.0 Log copies/mL未満に低下しているがHBV-DNAが陽性の場合には、ラミブジン・

テノホビル、あるいはエンテカビル・テノホビル併用へ変更することも可能とされている。しかし、アドヒアランスが保たれている症例にもかかわらず、エンテカビルの治療効果が不良となる原因については明らかとなっていない。

本研究は、これらの治療効果不良例に寄与する宿主因子を明らかにすることで、核酸アナログ製剤の治療効果予測および新薬における治療反応性の向上に繋げることを目的としている。

また、臼井健悟研究協力者の簡易HBV-DNA定量測定法の開発に用いる血液検体を提供するなど、班内の研究に用いる血液検体を選定している。

B.研究方法

（1）参加施設

埼玉医科大学総合医療センター（名越）、東京慈恵会医科大学（本院：松浦、柏病院：坪田）、岩手医科大学（滝川）、山口大学（寺井、日高）、岐阜大学（清水）、東京大学（池田）

（2）症例の選択基準

核酸アナログ製剤およびインターフェロンの治療歴がないB型慢性肝疾患症例に対してエンテカビル単剤が投与された後、HBV-DNA量の推

移が半年以上観察されている症例。なお、平成 24 年度以降、本分担研究で登録された 127 例のうち、この選択基準に合致する症例を含む。

（3）症例登録・検体採取・保存

症例登録後、血液検体を各施設で採取し、①患者抽出 DNA、② トランスクリプトーム解析用 EDTA-2Na RNAlator 添加血液、③血漿、④血清、

⑤LAP-D 測定用クエン酸ナトリウム添加血液を埼玉医科大学総合医療センター研究室にて保存する。

（4）測定項目・臨床データ

1) HBV 関連検査

HBs 抗原量、HBcr 抗原量、HBV-DNA 量、HBe 抗原・抗体、HBc 抗体、genotype

2) 一般血液検査

AST、ALT、TBil、プロトロンビン時間

3) トランスクリプトーム解析

4) HBV-DNA シークエンス解析

5) 臨床データ

調査票により各施設から収集し、データベース作成・管理は埼玉医科大学総合医療センター消化器・肝臓内科で行う

（倫理面への配慮）

血液検体の採取にあたっては、登録患者に対して不利益、危険性およびその対処について十分に説明し、インフォームドコンセントを書面で得て行う。血液検体は各施設で連結可能匿名化し、対応表は各施設の個人情報管理者が管理する。

C.研究結果

（1）適応基準該当症例

適応基準に該当した症例は、41 例（男性 30 例、女性 11 例）。genotype は、Bj：3 例、C：30 例、判定不能：8 例、HBe 抗原は、陽性：21 例、陰性：17 例、不明：3 例であった。

（2）genotype C、HBeAg 陽性の男性症例におけるエンテカビル治療効果

トランスクリプトーム解析にあたり、性別、genotype、HBeAg をそろえる必要があることから、genotype C の男性 25 例について HBeAg の有無を検討したところ、陽性：15 例、陰性：8 例、

未測定：2 例であった。HBeAg 陰性例は、エンテカビル治療効果不良例が少ないため、HBeAg 陽性例を対象に解析を行うこととした。

治療反応性は、以下の 3 群に分類した。①治療抵抗群：エンテカビル投与開始 6 か月目に HBV-DNA が 4.0 Log copies/mL 以上の症例、②効果不十分群：投与開始 6 か月目に HBV-DNA が 4.0 Log copies/mL 未満に低下したが、12 か月目に 2.1 Log copies/mL 以上の症例、③効果良好群：投与開始 6 か月目に HBV-DNA が 2.1 Log copies/mL 未満に低下した症例。治療抵抗群は 5 例、効果不十分群は 5 例、効果良好群は 4 例で、観察期間内に break through を起こした症例が 1 例であった。3 群の臨床データを表に示す（表）。

Genotype C、HBeAg 陽性の B 型慢性肝疾患症例におけるエンテカビルの有効性

	年齢 (歳)	HBcrAg (Log U/mL)	HBV-DNA量 (Log copies/mL)		
			ETV投与前	投与6か月目	投与12か月目
治療抵抗群	44	5.2	9.0以上	5.8	4.4
	44	6.8以上	9.0以上	5.1	3.8
	45	6.8以上	9.0以上	5.1	3.8
	52	6.8以上	9.0以上	4.3	テノビル追加
	74	6.8以上	7.7	4.1	3.4
効果不十分群	46	6.8以上	7.0	2.7	2.5
	49	5.3	9.0以上	2.7	2.2
	50	5.5	7.8	3.1	2.2
	65	6.8以上	8.0	3.6	3.5
	74	5.2	7.7	3.0	2.3
効果良好群	40	6.8以上	9.0以上	2.4	2.1未満
	55	5.2	6.8	2.1未満	2.1未満
	58	6.8以上	7.4	未検出	未検出
	69	6.8以上	7.8	2.1未満	2.1未満

D.考察

トランスクリプトーム解析で、核酸アナログ製剤に対する反応性に寄与する宿主因子を探索するためには、条件をでき得る限り統一する必要がある。そのため、最も数の多い genotype C の HBV に感染した男性症例に限り、過去に抗ウイルス療法を受けたことがなく、エンテカビル単剤の投与開始後、HBV-DNA 量の推移が半年以上観察されている症例を選択した。さらに、HBeAg 陰性例では効果良好な症例が多く見られたことから、

HBeAg 陽性例に限ることとなった。しかし、治療抵抗群 5 例、効果不十分群 5 例、効果良好群 4 例ではトランスクリプトーム解析を行うには症例数が不足しており、今後さらに症例数を増やして、トランスクリプトーム解析を行う予定である。平均年齢は、治療抵抗群 51.8 歳、効果不十分群 56.8 歳、効果良好群 55.6 歳と治療抵抗群でやや若い傾向があり、治療開始前の HBV-DNA 量も治療抵抗群では 5 例中 4 例が 9.0 Log copy/mL 以上と多い傾向にあった。一方、いずれの症例においても HBV-DNA 量が 6.8 Log copies/mL 以上と増殖が盛んであり、HBcrAg 量が 5.2 LogU/mL 以上と肝組織中の cccDNA 量も多いことから、反応性の違いにはウイルス側の要因だけでなく宿主因子が寄与している可能性が想定される。

E. 結論

genotype C の HBV に感染した HBeAg 陽性の男性症例におけるエンテカビルの治療効果は、HBV-DNA 量の変化により治療抵抗群、効果不十分群、効果良好群に分けられ、宿主因子が寄与している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsunami H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T, Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, Mizokami M; Japanese AHB Study Group. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology* 2014; 59: 89-97.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況（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

B型肝炎創薬へ向けてのトランスクリプトーム解析による 病態解明と標的同定に関する研究

研究分担者 鈴木治和 独立行政法人理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター
機能性ゲノム解析部門 グループディレクター

研究協力者 グォン テ ジュン 独立行政法人理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター
機能性ゲノム解析部門 訪問研究員

研究協力者 橋本 浩介 独立行政法人理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター
機能性ゲノム解析部門 研究員

研究要旨

大規模トランスクリプトーム解析により、病態解明と標的同定を試みた。HBVの感染・増殖に関わる宿主遺伝子の探索では、細胞クローンを用いた解析を行ったが現在のところ同定には至っていない。臨床サンプルを用いたバイオマーカー探索では、HBs/HBV DNA比に注目して deepCAGE データを解析した結果、表現型が異なるグループが主成分分析でうまく分離しないことが分かった。HBV 転写物の解析ではラミブジン処置により HBV 遺伝子 C が発現上昇する傾向が観察された。

A.研究目的

本研究では、近年、発展を遂げてきた次世代シーケンサーを駆使した大規模トランスクリプトーム解析を代表とする高度なトランスクリプトーム解析手法を用いて、多様な HBV 病態の分子レベルでの解明、疾患治療のための新たな標的候補の同定、疾患状況を把握するためのバイオマーカーの探索を目的とする。HBV の肝臓細胞特異的感染を規定していると考えられる感染レセプターについては、近年 NTCP とよばれるトランスポーターが知られているが、HBV 感染に関わるその他の宿主側因子についてはほとんど分かっていない。また、HBV の細胞内増殖に関わる宿主側因子についても同様に未知の部分が多い。そこで HBV の感染性や増殖性が異なる細胞を用い、大規模トランスクリプトーム解析により、その差異を明らかにすることにより、関連宿主因子を探索し、B型肝炎治療のための新奇標的分子として可能性を評価する。また、B型肝炎を発症する患者では末梢血中に検出される HBV DNA 量と HBs 抗原量との間には必ずしも比例関係があるわけではない。これは患者間の体質の相違が関係していると考えられ、

治療戦略にも関わってくることが想定されることから、相違をトランスクリプトーム解析する。

B.研究方法

B-1. HBV の感染・増殖に関わる宿主因子の探索

NTCP を強制発現させた HepG2 細胞で HBV の感染性が高いサブクローンおよび低いサブクローン、分化することによって感染性が出現する HepaRG 細胞の未分化および分化サンプルからトータル RNA を精製した。マイクロアレイにより宿主遺伝子の発現プロファイルを作成し、インフォマティクスにより発現差の有意な遺伝子を抽出した。次に上位遺伝子について、siRNA によりノックダウンし、HBV 感染性への影響を調べた。増殖に関わる宿主因子探索は、HBV を強制導入した Hep38 細胞で HBV の複製能に差があるサブクローン間のトータル RNA を用いて、上記と同じ方法で調べた。（共同研究者：国立感染症研究所 渡士幸一博士、九十田千子氏）

B-2. 臨床サンプルのトランスクリプトーム解析

HBs 抗原量と HBV-DNA 量の間に関係がある群（4 患者）と無い群（4 患者）について末梢血からト

ータル RNA を抽出し、deepCAGE によって網羅的トランスクリプトーム解析を行った。(共同研究者：埼玉医科大学の名越 澄子博士ら)

B-3. HBV 転写物の解析

Hep2.2.15 細胞に対して核酸アナログ体であるラミブジン、アデフォビル、テノフォビル処置してウイルス逆転写酵素を抑えたサンプルを用いて deepCAGE によって得られたデータにおいて、HBV 転写物の動態をインフォマティクスにより解析した。

(倫理面への配慮)

培養細胞モデルを用いた研究は、倫理面での配慮は必要としない。HBV 患者血液を用いる研究は、試料採取機関 (埼玉医科大学、慈恵医科大学) および解析機関である理化学研究所にて倫理委員会の承認済みである。

C. 研究結果

C-1. HBV 感染・増殖に関する宿主因子の探索

まず、HBV の感染レセプターである NTCP の発現について、我々が持っている国際科学コンソーシアム FANTOM のデータを調べてみた。その結果、NTCP は肝臓細胞 (hepatocyte) に極めて特異的に発現していることが分かった。胎児肝臓では発現が検出されず、また、hepatocyte のドナー間での発現が大きく異なること、hepatocyte 由来セルラインでは発現していないことから、NTCP は機能成熟した肝臓の hepatocyte にのみ特異的に発現するものと考えられる。

NTCP を強制発現させた HepG2 細胞クローンについてマイクロアレイにより宿主遺伝子の発現プロファイルを構築した。これを主成分解析したところ、NTCP のタンパク質レベル発現が不十分な C1, C5 クローンと発現が良好な C2, C4, C8 クローンにグループ化できた (図 1)。C1, C5, C2 は HBV 感染性が無く、C8 は弱い感染性を、C4 は 20-30% の最も強い感染性を示す。NTCP タンパク質の発現が無いクローンでは感染が成立しないことから、NTCP が感染レセプターとして重

要であることと一致している。さらに重要なこととして、NTCP タンパク質が十分に発現している

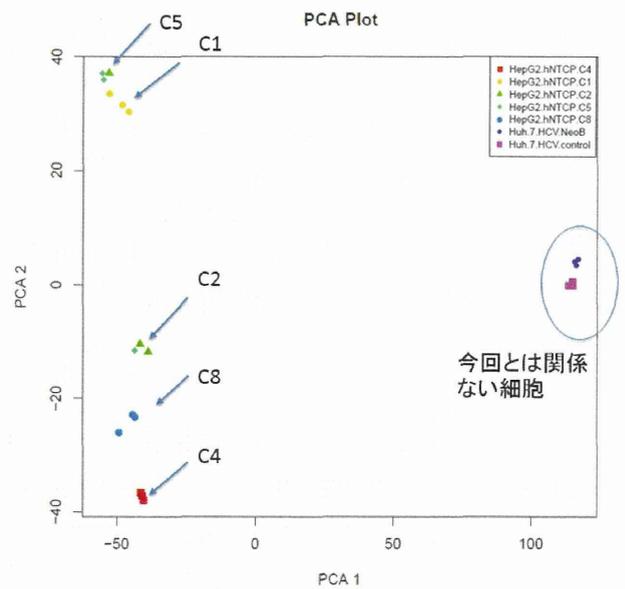


図 1. NTCP 強制発現 HepG2 細胞サブクローンの主成分解析 NTCP がタンパク質として発現が確認された C2, C4, C8 について、感染性の強弱により主成分 2 方向に分離された。

クローンについて、HBV 感染性の強弱に応じてクローンが主成分 2 で分離することができた。これは NTCP に加えて何らかの宿主遺伝子が HBV に対する感染性に影響を与えていることを示唆している。そこで、C2, C4, C8 間で発現量に差がある遺伝子 (2 倍以上の発現差があり、かつ統計上有意である遺伝子) のリストを作成し、C4>C8, C4>C2, C4>C8 かつ C4>C2 となる遺伝子を各 158, 164, 59 個、同定した。

次に、HBV の増殖に関わる宿主遺伝子の探索を行った。HBV を強制導入した Hep38 細胞のサブクローン間で HBV の複製能に差がある Hep38.2, 38.3, 38.7 および親株である HepAD38 についてマイクロアレイによって宿主遺伝子の発現プロファイルを構築した。これを主成分解析したところ、HBV を導入していない親株と、導入した細胞で主成分 1 に沿ってグループ化された (図 2)。これは HBV 感染により宿主遺伝子の発現が大きく影響を受けることを示している。

HBVを強制導入したクローンでは、各クローンが主成分2の方向に分離された。しかしながら、

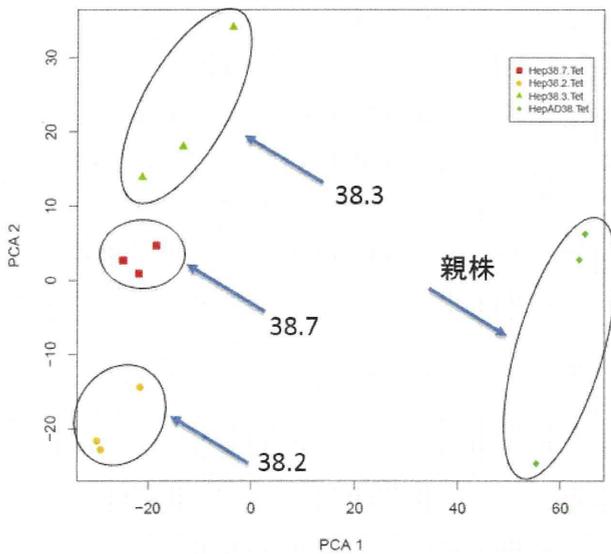


図2. HBV複製能に差があるHep38細胞サブクローンの主成分分析 HBV導入の有無によりサブクローンが主成分1で分離された。

複製能が高い38.7が複製能の低い38.2, 38.3に挟まれるように分離されたことから、必ずしも主成分2に対応する宿主遺伝子発現が複製能の高低を反映しているという結果には至らなかった。こちらについても発現量が2倍以上有意に異なる遺伝子で38.7>38.2, 38.3および38.7<38.2, 38.3となる遺伝子の抽出を試み、各13, 29個の候補遺伝子を得た。

これら候補遺伝子が実際にHBVの感染・増殖に関わっているかどうかを検証するため、siRNAを用いた発現攪乱実験を行った。感染性への影響はHepG2-NTCP C4細胞に候補遺伝子のsiRNAをトランスフェクトし、72時間後にHBV感染実験を行い、12日後に培地中のHBs抗原、HBV DNA量を定量することによりモニターした（図3）。コントロールとして導入したNTCPに対するsiRNAを用いたところ、特にHBs抗原量の低下が、4 siRNA中3 siRNAについて良好に観察された。候補遺伝子のノックダウンには3 siRNAを混合して使用したため、効果があるならばHBs抗原、HBV DNA量の変化として観察されることを期待した。

しかしながら、候補上位遺伝子についての結果は、感染性減弱を示す宿主遺伝子は見つからなかった。

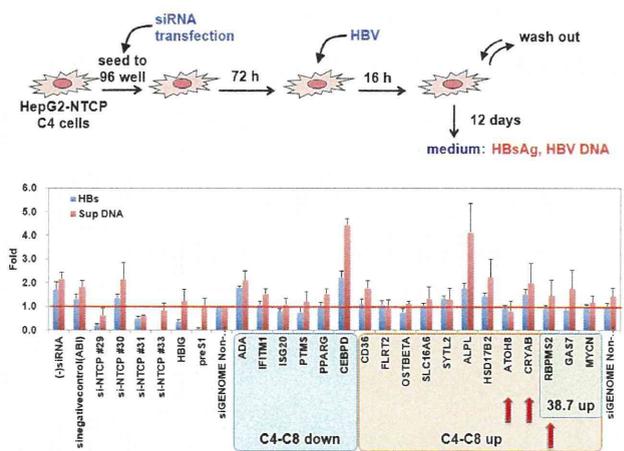


図3. siRNAを用いたノックダウン実験

HepG2 C4細胞にsiRNAを処置して標的遺伝子をノックダウンし、HBV感染効率をHBs抗原量、HBV DNA量で評価した。赤矢印は特に注目した遺伝子。

同様の攪乱実験はHBV増殖に関与する遺伝子候補についても行った。HepAD38.7細胞に候補遺伝子のsiRNAをトランスフェクトし、12時間後に培地交換し、それから3日後に培地中のHBs抗原量および細胞中のHBV DNA量を測定した。この実験ではHBVトランスクリプトに対するsiRNAやHBV polymerase阻害剤を、ポジティブコントロールとして用い、細胞内のHBV DNA量において、より顕著な減少が観察された。しかしながら、調べた候補上位遺伝子についての結果は、HBV DNA量の変動は見られなかった。

C-2. 臨床サンプルのトランスクリプトーム解析

B型肝炎を発症して来院する患者において、薬剤治療前の末梢血サンプルでのHBs抗原量とHBV DNA量には、ラフには比例関係が認められるが、一部の患者ではHBV DNA量は高いのにHBs抗原量がそれに比して低く抑えられている例がある。同じタイプのHBVに感染した男性患者で年齢分布も似通った2つのグループ（HBs, HBV DNAが共に高いグループ、HBV DNAは高いがHBs抗原は中程度のグループ）各4例、計8例について末梢血から抽出したトータルRNAを

用いて転写物発現の差異を、我々が持つ独自の解析技術である deepCAGE 法を用いて調べてみた。得られたデータを主成分解析した結果、各グループ間での分離は観察することはできなかった

(図 4)。

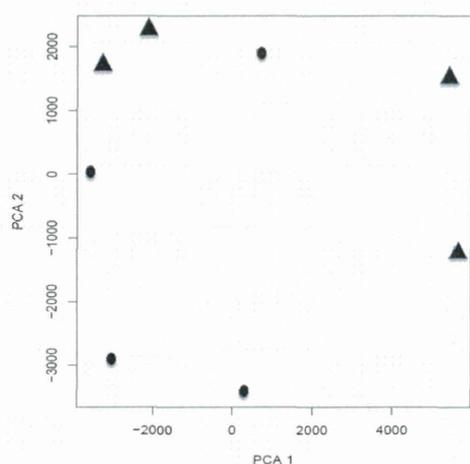


図 4. HBV 患者末梢血由来 RNA 発現データの主成分解析 黒丸および黒三角はそれぞれ HBs 抗原が高いグループ、中程度のグループの患者をあらわす。

C-3. HBV 転写物の解析

ラミブジン、アデフォビル、テノフォビル処置した Hep2.2.15 細胞における HBV 転写物の発現解析を行った。HBV の D タイプゲノムに CAGE で得られたタグをマップしたところ、総計 10 箇所の転写開始点を同定することができた(図 5)。そのうちの半数の 5 箇所は S1/S2 タンパク質発現のための転写開始点である

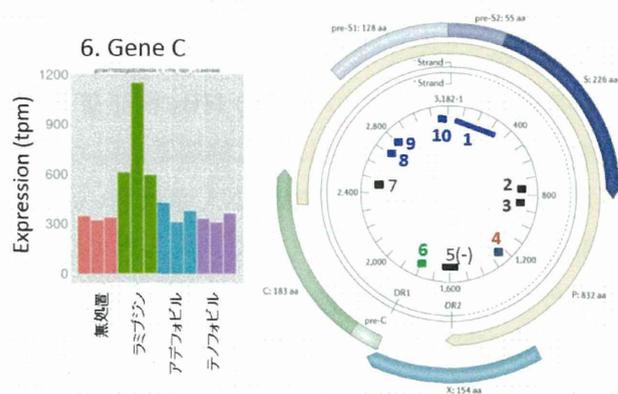


図 5. HBV 転写物の薬剤処置による影響 10 箇所の転写開始点が同定できた。遺伝子 C に対応する転写

のみがラミブジン処置で増加傾向を示した。HBV 遺伝子はマイナス鎖に全てコードされており、転写開始点も 10 箇所中 9 箇所はマイナス鎖 RNA の方向に存在していたが、1 箇所だけプラス鎖 RNA を出す転写開始点が存在した。核酸アナログ処置による HBV 転写物の変化については、アデフォビル、テノフォビル処置では変化はほとんど見られなかったが、興味深いことにラミブジン処置では遺伝子 C に対する転写物において発現が上昇する傾向が見られた。

D. 考察

細胞クローンの表現型の相違を指標として、HBV の感染や増殖に関与する宿主遺伝子を同定する戦略は、分子生物学で一般に用いられる手法であり、狙いは悪くないと思われるが、特定の宿主遺伝子同定には至っていない。評価系では 3 つの siRNA のミックスを用いて実験を行っている。経験的には設計した 3 siRNA のうち少なくとも一つは強いノックダウン効果を表すことが期待されるため、標的遺伝子は期待通りノックダウンされているものと思われる。が、評価系がちゃんと機能しているかを確認する必要がある。また、表現型が異なる細胞クローンの総数が多くないため、候補遺伝子が十分に絞りきれていない可能性も考えられる。この点については、注目している表現型でタイプ分けできる他の細胞株での発現情報を加えることで更なる絞込みが可能となると考えている。臨床サンプルを用いたトランスクリプトーム解析では、今回注目した表現型の相違では、解析に十分量のサンプル数を集めることが困難なため、これ以上の解析は難しく戦略の練り直しが必要であると思われる。最後に HBV 転写物の解析では、ラミブジン処置によって遺伝子 C の転写が亢進する傾向がある。見つかった現象の解釈が難しいが、ラミブジン自体が HBV 治療で使われなくなってきているため、どのように展開するか熟慮する必要がある。

E.結論

- ・細胞株クローンをを用いた HBV の感染と増殖に関わる宿主遺伝子の探索は、評価系の検証を進めると共に、他細胞株の発現情報を加えて再度の候補抽出を試みる。
- ・HBV 患者の臨床サンプルを用いたトランスクリプトーム解析では、標的とする表現型について戦略を練り直す。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1.論文発表

該当なし

2.学会発表

該当なし

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- ①特許取得 該当なし
- ②実用新案登録 該当なし
- ③その他 該当なし

PET分子イメージングによる薬効評価・薬物動態研究

研究分担者 渡辺 恭良

理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター センター長

共同研究者

金山 洋介（同・健康・病態科学研究チーム）、

Hume William Ewan、張 周恩、丹羽 節、落合 秀紀、隅田 有人（同・分子標的化学研究チーム）

崔翼龍、佐古健生（同・分子動態イメージング研究ユニット）

研究要旨

本事業において見出された B 型肝炎治療薬候補物質について、小動物・大型動物における PET 分子イメージング技術を用いた薬物動態解析により有効性と安全性を評価し、研究全体へフィードバックすることで、薬候補化合物の最適化と絞り込みに寄与することが全研究期間を通じた研究目標である。我々は薬候補化合物が選出されるまでに、効果的な *in vivo* 薬効評価法を構築することを目指し、PET イメージングによる非侵襲的な肝組織残存 B 型肝炎ウイルス(HBV)検出・定量法の開発を提案し進めてきた。本年度は引き続き HBV 治療薬として現在使用される逆転写酵素(RT)阻害核酸アナログ製剤 entecavir の ^{18}F 標識化の検討を進めるとともに、高価なヒト肝細胞キメラマウスよりイメージング試験に適した HBV モデルを探索するため HBV トランスジェニックマウスの利用を試み、 ^{11}C 標識化 telbivudine を使用した PET 試験を行った。今年度班会議上にて薬候補化合物が多数報告されたため、次年度以降はそれらの標識化と薬物動態解析を中心に開発を進める予定である。

A.研究目的

本研究班にて開発される HBV 新規治療薬候補物質の *in vivo* での薬効評価のためには、血液中に存在する抗原タンパク質量や HBV-DNA 量だけではなく、肝組織中に存在する HBV の量を経時的に評価することが重要である。そこで我々は現在 HBV 治療に使用されている逆転写酵素(RT)阻害薬に着目し、最も抗 HBV 活性の高い核酸アナログ製剤である entecavir について ^{18}F 標識による PET プローブ化を検討してきた。 ^{18}F は物理学的半減期が 110 分とポジトロン核種の中でも比較的長いこと、投与後長時間の追跡が可能であることから、非特異的集積のクリアランスのためにより長い時間おくことができ、肝臓中で低濃度に存在する HBV を検出するために必要なコントラストが得られ易いと考えられる。

本年度はこの ^{18}F 標識 fluoroentecavir 合成について昨年度に引き続き検討を行うとともに、将来

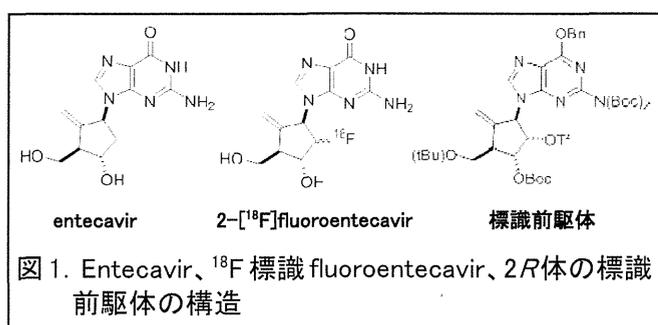
的に様々な化合物の有効性評価に利用するため、高価なヒト肝細胞キメラマウスから作成する HBV モデルと代替可能なイメージングに適した動物モデルを探索するため、HBV トランスジェニック (HBV-Tg) マウスの利用を試み、昨年度同様に ^{11}C 標識化 telbivudine (L-thymidine, LdT) を使用した PET 試験を行った。

B.研究方法

1. ^{18}F 標識 Fluoroentecavir の合成

Entecavir はプロドラッグであり細胞内でリン酸化することで薬効を示す。これを妨げずに標識化するには entecavir の 2 位の炭素への ^{18}F 導入の他にないが、(2*R*)-fluoroentecavir、(2*S*)-fluoroentecavir の二つの構造異性体が存在し得る。活性評価、分析標品に使用するため非標識(2*R*)-fluoroentecavir をまず合成した。手法として、cyclopentene 部へ安定同位体 ^{19}F を導入後にグアニン部

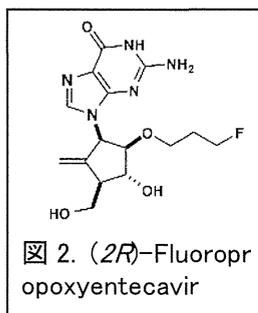
を結合することで合成を行った。作成した(2*R*)-*fl*uoroentecavir は PXB 細胞（ヒト肝細胞キメラマウスから採取されたヒト肝細胞）を用いた抗 HBV 活性評価を行った（小嶋グループ古谷先生に依頼）。しかし放射性 ¹⁸F 標識化には迅速・高収率の合成が必要となるため、標識部位への脱離基導入および非標識部位の OH 基、NH₂ 基などへの保護基導入による標識前駆体の合成が必要となる。様々な保護基導入法の検討により標識前駆体（図 1 右）を得た。これに ¹⁸F と同様の反応系を用い



て安定 ¹⁹F 導入を行い、反応収率、保護基安定性についての NMR 測定による検討を行った。

2. Fluoropropoxyentecavir の合成

さらに、(2*R*)-fluoroentecavir の代替案として、entecavir の 2 位の炭素へ側鎖 (fluoropropoxy 基) を導入した(2*R*)-*fl*uoropropoxyentecavir の合成を行った。構造を図 2 に示す。¹⁹F を導入した安定同位体を合成し、抗 HBV 活性評価を行った。



3. HBV-Tg マウスを用いた PET 試験

HBV-Tg マウス (HBV-Tg CAT3) 及び対照群としての negative control (HBV-/-) マウスは東京都医学総合研究所小原道法先生よりご提供頂いた。このマウスは C57BL6 マウスに HBV 全長遺伝子が導入されたもので、感染性を有する HBV を産生する。昨年度同様に PET 撮像用アイソレーションボックスを用いて [¹¹C]LdT を投与後 9

0 分間の撮像を行った。また更に、LdT 以外に HBV 病態に対する有用なプローブを探索するため、理研に既に合成法の確立された PET プローブの中で逆転写酵素阻害薬の一つである [¹¹C]azidothymidine、また炎症部位の検出のため末梢性ベンゾジアゼピン受容体に結合する [¹¹C]PK11195、Cyclooxygenase-2 (COX-2) 阻害剤の [¹¹C]ketoprofen methyl ester, [¹¹C]indomethacin methyl ester (IND-Me) の 4 種について n=1 の予備的 PET 動態評価を行った。その結果、[¹¹C]IND-Me において HBV-Tg マウスと Negative Control マウスの肝集積差が最も大きかった。COX-2 は慢性肝炎での高発現が肝がん発症リスクファクタと考えられている酵素であり (He *et al.*, *Can J Gastroenterol* 2010;24(7):435-440, Cheng *et al.*, *Modern Pathology* 2004;17:1169-1179)、この発現量の検出が肝炎病態の診断に有用な可能性がある。そこで、[¹¹C]IND-Me を用いてさらに PET 試験を行うこととした。また COX-2 発現量を確認するため、COX-2 特異的な蛍光プローブ (XenoLight Rediject COX-2) を用いマウスに腹腔内投与 12 時間後に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、肝臓を摘出、切片を作成して蛍光像の観察を行った。得られた PET 画像に各臓器への関心領域を設定し時間放射能曲線を作成した。

(倫理面への配慮)

本研究に関わる動物実験は関係法規及び理化学研究所動物実験実施規定、遺伝子組換え実験実施安全管理規定、微生物等取扱規定に基づき実験審査委員会の承認を得て執り行った。また、感染性 HBV ウイルス取扱い上の安全性確保のため実験担当者及び希望者へのワクチン接種を実施した。

C. 研究結果

1. (2*R*)-Fluoroentecavir 合成の検討

(2*R*)-fluoroentecavir の抗 HBV 活性は IC₅₀ 値として entecavir 0.017nM に対し 0.056nM と非常に高い活性を維持していた。このことから PE

Tプローブとして大きく期待された。ところが、entecavirの逆転写酵素への結合に重要な guanine 部と、cyclopentene 部の2つの OH 基へ各種保護基を導入し2位の炭素に脱離基 OTf を結合した標識前駆体に対し、 ^{18}F 標識時に汎用する TBAF 使用して安定同位体 ^{19}F の導入を試みた結果、NMR による分析で目的物(2*R*)-fluoroentecavir が確認できず、反応が進まないことが分かった。

(2*R*)-Fluoropropoxyentecavir 合成の検討

代替案として、新たに2位へ側鎖を導入することにより立体障害を回避する手法を考案した。この為様々な手法を検討した結果、allyl 基が収率よく導入できたため、allyl 基から fluoropropyl 基に変換することとした。脱離基 OTf を結合した標識前駆体を合成し、これに KF/K₂₂₂ による F 導入を検討したところ、5.4%の低収率ながら(2*R*)-fluoropropoxyentecavir の合成に成功した。この手法においては標識前駆体から安定同位体 F を反応させているため、全く同じ条件下で ^{18}F KF/K₂₂₂ と反応することで問題なく ^{18}F 標識が可能である。そこで、この(2*R*)-fluoropropoxyentecavir の抗 HBV 活性について PXB 細胞の系で検討を行った(小嶋グループ古谷先生に依頼)。その結果、(2*R*)-fluoropropoxyentecavir においては濃度依存的な HBV 増殖抑制効果が得られず、IC₅₀ 値が算出できなかった。

3. HBV-Tg マウスを用いた PET 試験結果

^{11}C LdT の PET 画像から得られた HBV-Tg 群 (n=5) と negative control (n=3) 群での時間放射能曲線の結果は肝臓、心臓、胆嚢、膀胱においてほぼ一致しており、ほとんど差は見られなかった(図3)。

また図4に示す様に ^{11}C IND-Me の PET イメージング結果でも ^{11}C LdT と同様に HBV-Tg 群と Negative control 群 (各 n=3) の各臓器の時間放射能曲線にほとんど差は見られなかったが、非常にわずかながら HBV-Tg 群の方が高い傾向があると思われる。

また一方で、COX-2 蛍光イメージングの結果

(図5)においては、肝組織中の COX-2 発現は HBV-Tg 群の方が高い様子が見られた。

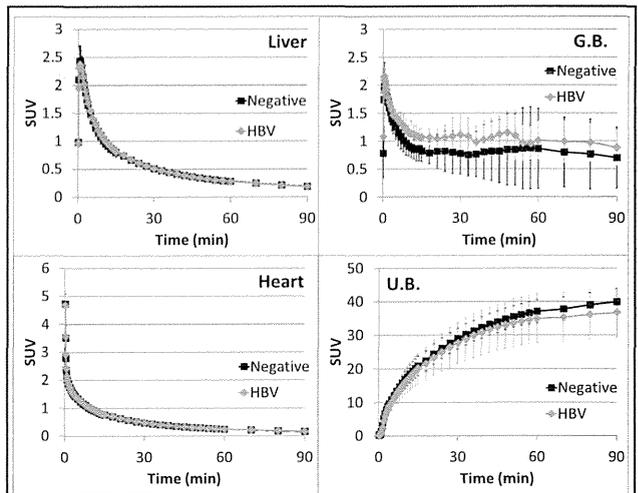


図3. ^{11}C LdT の各臓器における時間放射能曲線

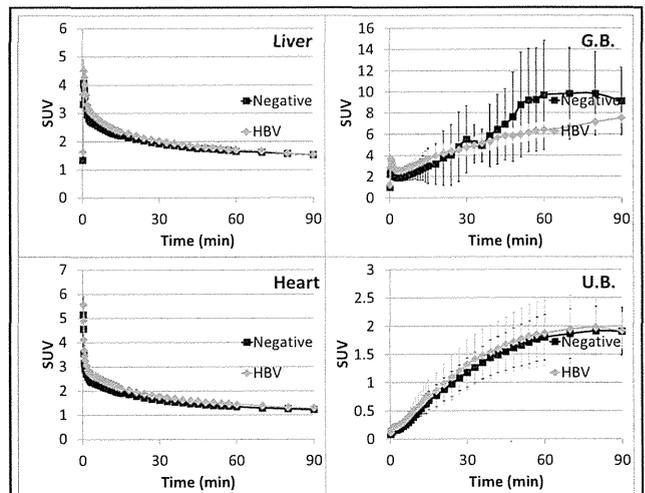


図4. ^{11}C IND-Me の各臓器の時間放射能曲線

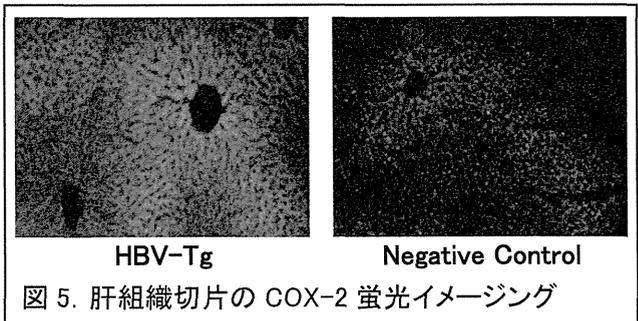


図5. 肝組織切片の COX-2 蛍光イメージング

D. 考察

標識前駆体からの(2*R*)-fluoroentecavir 合成反応が進まなかった原因として、かさ高い guanine 部が立体的障害となり F の2位炭素電子軌道への

導入を妨げていることが考えられる。この問題の解決策として、 ^{18}F 標識をグアニン部結合の前に行う手法についてさらに検討した。合成中間体を用いて様々な条件下での F 導入について検討を行ったが、いずれの条件でも脱離基 OTf の分解が生じ目的物が得られなかった。結論として現在の技術では 2 位の炭素への直接の F 導入については断念する他ないと言える。

また、この代替案としての (2*R*)-fluoropropoxyentecavir の合成は成功したが HBV 増殖抑制能のアッセイから少なくとも (2*R*)-fluoropropoxyentecavir は entecavir と比較して大幅に活性が低下していると推察でき、非常に残念ながら PET プローブとしての有用性は低いと言える。原因として、fluoropropoxy 基が立体障害となる、細胞透過性が低下している、化合物の不安定性などが考えられるが、詳細な検討は出来ていない。

PET イメージングにおいては、残念ながら HBV の検出を示唆する結果は得られなかった。今回使用した HBV-Tg マウスは肝臓中の HBV-DNA 濃度が 2×10^8 copies/g との予測のため、LdT の affinity の低さと HBV 濃度の低さ両方の理由から十分な集積が得られなかったと考えられる。一方で IND-Me の結果については、ほぼ誤差範囲の僅かな差ではあるが、HBV 群の集積が高い傾向があり、このことは蛍光イメージングでの HBV-Tg 群により強い COX-2 発現が見られた結果と一致している。ただ、今回の試験では n 数が少なく、また IND-Me の COX-2 への affinity も低いため、HBV による COX-2 発現が可視化可能かどうかについてはより高活性のプローブで評価することが求められる。

E. 結論

これまで非侵襲的 HBV 検出 PET イメージング技術開発のため様々な検討を行ってきたが、本年度の結果から entecavir の ^{18}F 標識プローブ化の別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

検討については一旦終了することが妥当と考える。本年度の班会議上にて薬剤候補化合物が多数報告されたため、次年度以降はこれらの有効性・安全性評価、薬物動態解析のための PET プローブ開発を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

該当なし。

2. 学会発表

金山洋介、佐古健生、張周恩、蔵地理代、William Ewan Hume、林中恵美、和田康弘、崔翼龍、小嶋聡一、渡辺恭良、 ^{11}C 標識 Telbivudine による B 型肝炎モデルマウスの PET イメージング、第 9 回日本分子イメージング学会学術集会、2014 年 5 月 22-23 日大阪。

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

該当なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

別紙 4

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	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
堂前 直 益田晶子	“極微量タンパク質解析のための超高感度アミノ酸分析	田崎裕人	製品中に含まれる(超)微量成分・不純物の同定・定量ノウハウー試料前処理からデータ解釈までー	技術情報協会	日本	2014	182-189
Hara, M. et al.	TGF- β LAP degradation products, a novel biomarker and promising therapeutic target for liver fibrogenesis.	Nakao, K., Minato, N., and Umoto, S. eds	Innovative Medicine : Basic Research and Development	Springer	Tokyo	2015	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
Hara, M., Kirita, A., Kondo, W., Matsuura, T., Nagatsuma, K., Dohmae, N., Ogawa, S., Imajoh-Ohmi, S., Friedman, S. L., Rifkin, D. B., and Kojima, S.	LAP degradation product reflects plasma kallikrein-dependent TGF- β activation in patients with hepatic fibrosis	SpringerPlus	3:221	Doi: 10.1186/2193-1801-3-221 eCollection 2014.	2014
秦咸陽、 小嶋聡一	非環式レチノイドによる肝細胞癌の制御：基礎的検討	医学のあゆみ	249(11)	1153-1158	2014
Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Okada M, Sugiyama M, Kojima S, Tanaka Y, Mizokami M, Li J, Tong S, Wakita T.	Dysregulation of retinoic acid receptor diminishes hepatocyte permissiveness to hepatitis B virus infection through modulation of NTCP expression.	J Biol Chem.	M114	602540	2015

Nagatsuma K, Hano H, Murakami K, Shindo D, Matsumoto Y, Mitobe J, Matsuura T, et al.	Hepatic stellate cells that co-express LRAT and CRBP-1 partially contribute to portal fibrogenesis in patients with human viral hepatitis.	Liver Int	34	243-52	2014
Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Tateishi R, Yoshida H, Seiko, Kyoji S, Ohtomo M, Nishikawa T, Inoue Y, Tomiya T, Kojima S, Matsuura T, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H.	High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly-malignant potential.	Int J Cancer	134	2189-98	2014
Sato M, Hikita H, Hagiwara S, Sato M, Soroida Y, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Kojima S, Matsuura T, Yotsuyanagi H, Koike K, Yatomi Y, Ikeda H.	Potential associations between perihepatic lymph node enlargement and liver fibrosis, hepatocellular injury or hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B virus infection.	Hepatol Res.		doi: 10.1111/hepr.12361. [Epub ahead of print]	2014
Matsumoto M, Matsuura T, Aoki K, Maehashi H, Iwamoto T, Ohkawa K, Yoshida K, Yanaga K, Takada K.	An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line.	Hepatol Res		Doi: 10.1111/hepr.12353 [Epub ahead of print].	2014
Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T	Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter NTCP.	Hepatology	59(5)	1726-1737	2014
Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M.	Targeting cellular squalene synthase, an enzyme essential for cholesterol biosynthesis, is a potential antiviral strategy against	J Virol.	89(4)	2220-32	2014

	hepatitis C virus.				
Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T.	Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon.	J Gen Virol.	95	60-65	2014
Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T.	Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus.	J Gen Virol.	95	2658-67	2014
Kim S, Date T, Yokokawa H, Kono T, Aizaki H, Maurel P, Gondeau C, Wakita T.	Development of Hepatitis C Virus Genotype 3a Cell Culture System.	Hepatology.	60(6)	1838-50	2014
Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, Kushida T, Furihata T, Tanaka H, Matsuura T.	Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in poor virologic response to interferon-based combination therapy for chronic hepatitis C.	PLoS One.	12:9(5)	e97078	2014
Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly1 HH, Fukasawa M, Suzuki R, Aizaki H, Ito T, Koiwai O, Kusuhara H, Wakita T,	Evaluation and Identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP	Biochem Biophys Res Commun.	443	808-13	2014
Gilmore1 JL, Aizaki H, Yoshida1 A, Deguchi K, Kumeta M, Junghof J, Wakita T, Takeyasu K	Nanoimaging of ssRNA: Genome Architecture of the Hepatitis C Virus Revealed by Atomic Force Microscopy.	J Nanomed Nanotechol.		doi:10.4172/2157-7439.S5-010	2014
Tsunematsu, Y., Nishimura, S., Hattori, A., Oishi, S., Fujii, N., Kakeya, H.	Isolation, structure elucidation and total synthesis of tryptopeptins A and B, new TGF- β signaling modulators from <i>Streptomyces</i> sp.	Org. Lett.	17	258-261	2015