

厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業（肝炎分野） 分担研究報告書

ペグインターフェロン(PEG-IFN)とリバビリン(RBV)併用療法におけるHCVコアとNS5A領域遺伝子変異と治療効果の関連

分担研究者 泉 並木 武蔵野赤十字病院消化器科部長

研究要旨：C型慢性肝炎のうちゲノタイプ1b型・高HCVRNA量の例は難治であるがPEG-IFNとRBV併用療法によってウイルス排除率が高まった。この治療効果とHCV遺伝子変異の関連を検討した。コア領域遺伝子変異はaa70とaa91が両者変異型だと有意に治療開始12週目までのウイルス陰性化が少なかった。またウイルス学的著効(SVR)は、コア70と91両者が野生型であることが多変量解析で有意因子であった。一方NS5A領域のISDR変異は、全体ではSVRに關与する独立因子ではなかったが、コア変異型で難治例の場合には、治療中のウイルス陰性化が得られればISDRが変異型の場合には再燃が少なかった。コアとNS5A遺伝子変異解析が治療効果予測に有用である。

共同研究者

朝比奈靖弘 武蔵野赤十字病院消化器科 副部長
黒崎雅之 武蔵野赤十字病院消化器科副部長

A. 研究目的

わが国のC型慢性肝炎の7割がゲノタイプ1b型・高HCVRNA量の難治例であるが、PEG-IFNとRBV併用治療を行った場合に、48週間の治療で40～50%にウイルス排除が得られる。治療効果が高い症例の特徴を把握し確かな抗ウイルス効果を発揮させることが重要である。併用療法によってウイルス排除(sustained virological response; SVR)が得られるか否かを治療前に予測することが重要である。さらに難治例に対する対策を立てることが必要になっている。HCVのコア領域とNS5A領域の変異と治療効果の関連を検討し、難治例の特徴をウイルス学的に明らかとし、その対策が可能か否かについて検討した。

B. 研究方法

(1) ゲノタイプ1b型・高HCVRNA量症例に対するPEG-IFN・RBV併用治療前のコアaa70とaa91およびNS5A領域のinterferon sensitivity determinig region(ISDR)変異と治療効果の関連

PEG-IFN α 2b (1.5 μ g/kg)とRBV内服併用療法を行った難治性C型慢性肝炎患者129例について、12週間までのHCVRNA陰性化と変異の関連を検討した。

(2) 48週間治療例において、SVRとHCVコアおよびISDR変異とウイルス学的効果の関連を検討した。

(3) 難治例において、治療終了時にHCVRNA陰性化(end of treatment response; ETR)達成例での再燃率について、治療前のウイルス遺伝子変異との関連を解析した。

(4) 治療前のコアaa70と91変異およびISDR遺伝子変異から治療戦略に役立つ情報が得られるか否かを解析した。また、年齢や性、BMI、血小板数、LDLコレステロール値、血糖値、肝線維化などの宿主因子と併用療法の治療効果の関連を、ウイルス遺伝子変異とあわせて解析した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、治療の副作用、患者に関する個人情報、守秘義務、患者の権利保護等について十分な説明を行い、患者が熟考するに十分な時間と理解の後に書面による同意を得たうえで臨床試験を遂行した(新GCPに遵守)。既に医療保険が認められている治療法においても上記に準じて書面の同意書を得ている。

C. 研究結果

(1) ゲノタイプ1b型かつ高HCVRNA量例に対するペグインターフェロンとリバビリン併用療法による12週間までにウイルス陰性化が得られない症例の特徴を解析したところ、肝線維化が高度であること、血糖値が高いこととHCVコア領域のaa70とaa91が両者変異型であることが独立で有意な因子であった。したがって、コア double mutantであればウイルス消失が得にくいと考えられる。

(2) ゲノタイプ1b型かつ高HCVRNA量症例129例のペグインターフェロンとリバビリン併用療法によるウイルス排除(SVR)とHCV遺伝子変異の関連を検討すると、単変量ではコア変異が double wild であることが有意であったが、多変量では有意ではなくなった。宿主因子で年齢が高齢であること、女性、LDLコレステロールが低値であること、血糖値が高いこと、肝線維化が高度であることが独立で有意因子であった。NS5A領域のISDR変異との関連を検討したが、今回の検討では mutant型が少なかったため有意因子とはならなかった。

(3) コア変異とウイルス減少率の関係を解析すると、double wild型では第1相、第2相ともに減少率が高かった。一方、double mutantの例では、それ以外と比較して第1相には差がなかったが、第2相は有意に double mutantが低いことが観察された。

(4) コアR70Q変異は治療早期において強い治療抵抗性を示すが、治療中HCV陰性化が達成されれば、再燃率はコア野生型と同等であった。これに対して、治療終了時にウイルス陰性化が達成された ETR 症例に

においては、ISDR wild 型は、治療中 HCV 陰性化が達成されても ISDR 変異型に比較して再燃率が高くウイルス学的著効(SVR)が得にくかった。

D. 考察

(1) HCV コア変異を解析することによって治療開始早期に治療抵抗性を示す例を同定できると考えられた。しかし、これらの例では最終的に SVR には関与していないため、治療法の工夫によってウイルス学的効果を改善できる可能性があると考えられた。

(2) 最終的にウイルス学的効果に関与するのは、年齢や性、血小板数、肝線維化、LDL コレステロール値などの宿主因子も関与するため、治療効果改善のためには宿主因子への介入も必要と考えられた。

(3) 治療終了時にウイルス陰性化が得られる ETR 例においては、ISDR が wild 型では再燃が多く、mutant 型では少ないことから、ISDR の mutant 型の症例ではウイルス陰性化にもっていくことが重要と考えられる。

(4) HCV コアと ISDR の変異は、抗ウイルス効果に関与する時相が異なると考えられ、両者を測定することによって治療効果を改善させるための対策が可能になると考えられた。

E. 結論

ゲノタイプ 1b 型・高 HCVRNA 量の C 型慢性肝炎においてペグインターフェロンとリバビリン併用療法の抗ウイルス効果には、HCV コアと NS5A の ISDR 遺伝子変異が強く関連していた。これらを測定することによって、治療効果を予測し、効果を改善するための対策をたてることが可能と考えられる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Asahina Y, Izumi N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Doi F, Tsuchiya K, Nakanishi H, Matsunaga K, Kitamura T, Kurosaki M, Uchihara M, Higaki M, Miyake S. Pharmacokinetics and enhanced PKR response in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin/ J Viral Hepat 2007;14,396-403. 2) Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J,

Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase level are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. J Hepatol in press..3) Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. Gastroenterology in press.

2. 学会発表

1) 黒崎雅之他.第 11 回日本肝臓学会大会パネルディスカッション B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤の治療成績 2007. 2) 朝比奈靖浩他.第 11 回日本肝臓学会大会シンポジウム C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法における治療成績と問題点およびその対策 2007.3) 朝比奈靖浩他.第 43 回日本肝臓学会総会シンポジウム C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/Ribavirin 併用療法における難治要因の検討とその対策 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（分担）研究報告書

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究

分担研究者 今村 道雄 広島大学病院消化器内科助教

研究要旨：マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたヒト肝細胞キメラマウスを用いて新規抗 HCV 薬として期待される Protease inhibitor、telaprevir の抗 HCV 効果を検討した。Genotype 1 b 型の HCV 感染マウスに 200～300 mg/kg の telaprevir を 1 日 2 回、連日経口投与したところ、マウス血中 HCV RNA は急速に低下した。しかし投与中止後、血中 HCV RNA は再上昇した。また投与中、血中 HCV RNA の再上昇を認めるマウスも存在し、今後、これらのアミノ酸解析を行うとともにインターフェロンとの併用効果などの検討が必要と思われた。

A. 研究目的

Protease inhibitor は、著明な抗 HCV 効果を示し、C 型慢性肝炎患者に対する新しい抗ウイルス剤として期待されている。一方、Protease inhibitor の投与により、早期に耐性株が出現し、Breakthrough が生じる症例も報告されており、今後の課題と考えられている。本研究においてわれわれは、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて Telaprevir の抗 HCV 効果を検討した。

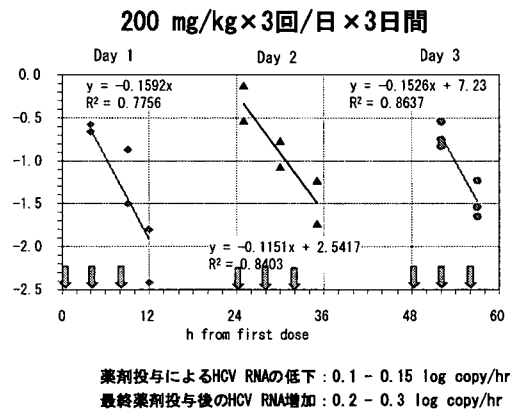
B. 研究方法

Genotype 1b 患者血清を用いて作製した HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスに MP-424 (Telaprevir), 10～300 mg/kg を連日経口投与した。投与後、2 週おきにマウス血液を採取し、real-time PCR 法にて血中 HCV RNA 量を測定し、Telaprevir の効果を検討した。

C. 結果

1 日 2 回の投与では、10 mg/kg と 100 mg/kg で HCV RNA の低下に有意差はありませんでしたが、1 日 3 回の投与では、100 mg/kg は 10 mg/kg に比べ、より HCV RNA を低下させた。また 1 日 3 回の投与では、1 日 2 回の投与に比べ、より HCV RNA は低下しており、1 日 3 回の投与で有効血中濃度が保たれると思われた。200 mg/kg の投

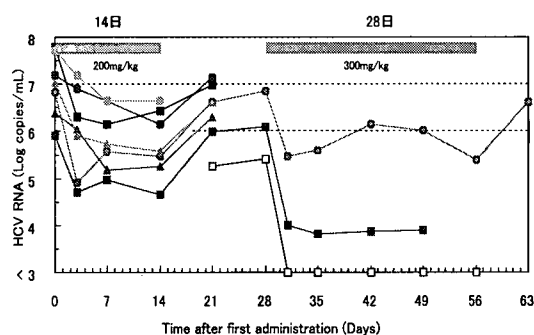
与により急速に HCV RNA は低下するが、最終投薬から翌日の投薬の約 10 時間の間に HCV RNA はほぼ前値にもどっていた。Telaprevir 投与によって HCV RNA は 1 時間あたり約 0.1 - 0.15 log copy 低下し、最終投与後、HCV RNA は 1 時間あたり約 0.2 - 0.3 log copy 増加していた（下図）。



7 匹のマウスに 200 mg/kg を 2 週間連日投与したところ、投与 3 日後、全例で血中 HCV RNA は低下したが、投与終了後、全例で HCV RNA は再上昇した（下図）。HCV RNA が前値に回復後、300 mg/kg を 4 週間連日投与した。1 匹のマウス（オレンジ線）は投与中、HCV RNA が再上昇し、休薬後、さらに上昇し、300 mg/kg 投与にて 200 mg/kg と同程度に低下し、休薬後、再上昇した。

1匹のマウスは200 mg/kgで低下がプラトーになり、休薬後、再上昇したが、300 mg/kg投与にて200 mg/kg以上にHCV RNAは低下した。1匹のみ別の患者血清を用いて感染させたマウス（紫）では、投与後早期にHCV RNAはPCRで感度以下に低下し、投与中の4週間は感度以下が継続した。このようにTeraplevirが非常に効果的なケースもあり、このマウスに用いた患者では単独療法でもSVRが得られる可能性がある。

200 mg/kg×2回/日 + 300 mg/kg×2回/日



D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスを用いてTelaprevirの抗HCV効果の検討が可能であった。Telaprevirは、genotype 1b HCV感染マウスの血中HCV RNAを著明に低下させた。Telaprevir投与後、急速に抗ウイルス効果が認められたが、2~4週間の投与では、投与終了後、HCV RNAは再上昇した。

E. 結論

Telaprevirは著明な抗HCV効果を示したが、投与中止後、HCVの再上昇が認められる。また投与中、HCVの再上昇を認めるマウスも存在し、今後、これらのアミン酸解析を行うと共にインターフェロン併用療法などの検討が必要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, Hatakeyama T, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol.* 2007;79:1811-7.
- Chen H, Takahashi S, Imamura M, Okutani E, Zhang ZG, Chayama K, Chen BA. Earthworm fibrinolytic enzyme: anti-tumor activity on human hepatoma cells in vitro and in vivo. *Chin Med J.* 2007;120:898-904.
- Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Okanoue T, Yatsunami H, Nagaoka S, Suzuki F, Kobayashi M, Chayama K, Imamura M, Yotsuyanagi H, Nakaoka S, Maki M, Kawata S, Kumada H, Iino S, Kiyosawa K. Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy. *Hepatol Res.* 2007;37:661-6.
- Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett.* 2007;581:1983-7.
- Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Kawakami Y, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Kawakami H, Yatsuji H, Aisaka Y, Kohno H, Aimitsu S, Chayama K. Serum HBV RNA is a predictor of early emergence of the YMDD mutant in patients treated with lamivudine. *Hepatology* 2007;45:1179-86.

- Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Yatsuji H, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Chayama K. Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. J Gen Virol. 2007;88:432-40.
 - 今村道雄, 平賀伸彦、茶山一彰. キメラマウスを用いた研究. 内科 Vol. 100;706-709:2007.
 - 今村道雄, 茶山一彰. B型肝炎の動物モデル、Annual Review 消化器 2008、87-91:2007
 - 今村道雄, 平賀伸彦、茶山一彰. HCV 感染キメラマウスモデル細胞：特集「キメラマウスの医学・薬学利用」細胞 1；9-12:2007
2. 学会発表
- Infection of human hepatocyte

chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon- α . 17th APASL. Kyoto

- 培養細胞および動物モデルを用いた肝炎ウイルスのインターフェロン感受性の検討. 第43回日本肝臓学会総会. 東京
- C型肝炎ウイルスのインターフェロン抵抗性の解明の研究-ヒト肝細胞キメラマウスを用いて-. 第72回日本IFN・サイトカイン学会学術集会. 京都
- B型慢性肝疾患に対する核酸アナログの治療成績と問題点および今後の展望. 第11回日本肝臓学会大会. 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（分担）研究報告書

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究
＜マウスモデルによるB型慢性肝炎の病態解析＞

（分担）研究者 中本 安成 金沢大学医学部附属病院講師

研究要旨

薬剤耐性の慢性ウイルス肝炎において発がんを抑止する新規の標的治療を開発する目的で、トランスジェニックマウスモデルを用いて慢性炎症が誘導する発がん関連因子を同定する。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

（分担研究報告書の場合は、省略）

A. 研究目的

肝炎ウイルス感染における慢性炎症が誘導する分子病態の変化について、発がんに関連する因子をB型肝炎ウイルス（HBV）トランスジェニックマウスモデルを用いて同定する。

B. 研究方法

HBVトランスジェニックマウスに細胞免疫学的手法を用いて慢性肝炎を誘導するとともに、FasL中和抗体を投与した。その後12カ月以上経過した時点（発がん率；FasL抗体群9%、対照群100%）の肝組織非腫瘍部の遺伝子発現に関してDNAマイクロアレイを用いて比較検討した。

C. 研究結果

慢性肝炎の進展に伴い発現レベルが2倍以上変化した遺伝子が10.4%存在した。さらに、FasL抗体の投与によって発がん率が低下した肝組織において352遺伝子（1.7%）の発現が有意に変動していた（ $P < 0.05$ ）。このうち、各遺伝子群において変動した遺伝子の割合を比較すると、アポトーシス・増殖因子が4.7%と最も高率であった。

D. 考察

これらの結果は、免疫組織学的検討においてFasL抗体群の肝細胞アポトーシスと再生増殖が約1/4に低下していた成績と合

致していた。これより、アポトーシス・細胞増殖に関する分子病態が発がん過程に機能的に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

肝炎ウイルスに対する免疫反応が誘導する慢性炎症は、肝組織の遺伝子発現プロファイルの変動を伴って発がんポテンシャルを亢進することが示唆された。さらに、FasLの制御による発がん抑制効果には、多くの遺伝子群が関わっており、なかでも肝細胞の壊死・再生に関する遺伝子群が強く関与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表： 一覧表に記載。

2. 学会発表

1. 中本安成, 金子周一：S1-2；B型慢性肝炎を構築する獲得免疫と病態進展の分子機構；第43回日本肝臓学会総会；シンポ；口演；平成19年5月31日；肝臓 48巻 Suppl. 1 PageA6 (2007.04)

2. 中本安成, 金子周一：S-1；B型肝炎と獲得免疫；第44回日本消化器免疫学会総会；シンポ；口演；平成19年7月8日

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明とその対策に関する研究
HCV のインターフェロン耐性及びリバビリン耐性の分子機構、
とくに NS5A 機能と耐性機構の研究

分担研究者：堀田 博 神戸大学大学院医学系研究科微生物学分野

研究要旨

C型肝炎ウイルス（HCV）による慢性肝炎の治療にインターフェロン（IFN）とリバビリンの併用療法が用いられているが、ウイルスを完全に排除できない症例も少なからず存在する。我々はこれまでに、HCV 非構造タンパク質 NS5A の IRRDR と名付けた領域（aa 362～407）のアミノ酸配列の多様性が臨床的に IFN 感受性と関連する可能性を報告してきた。本研究では、HCV の IFN 抵抗性に NS5A が直接関与するか否かを実験室レベルで検証し、さらに、NS5A と宿主タンパク質の相互作用を解析して NS5A の機能及び IFN 抵抗性の分子機序を明らかにすることを目的とした。

HCV サブゲノム RNA レプリコン（Con1 株；IRRDR 変異は 6 ヶ所）の NS5A の IRRDR を IFN 抵抗性株（HCV-J 株）と同一になるよう置換した Con1-Res 株、及び Con1 株にさらに 2 ヶ所のアミノ酸変異を導入した Con1-Sen 株を作製して、それぞれの IFN 感受性を比較検討したが、3 者の間で有意な差は認められなかった。しかしながら、HCV サブゲノム RNA レプリコンは非構造タンパク質領域しか有しておらず、IFN 抵抗性に関与する可能性が報告されているコアタンパク質やエンベロープタンパク質との相互作用の可能性が検討できないため、今後は HCV 全長ゲノム RNA レプリコンや最近開発された HCV 感染系を用いて、IFN 抵抗性に関する IRRDR 変異の意義を検証する必要性が示唆された。

一方、NS5A と結合する宿主タンパク質の検索を、免疫共沈法、試験管内 GST プルダウン法及び yeast two-hybrid 法を用いて行った。NS5A 結合タンパク質の候補として、IFN 誘導性 p200 等、複数の候補タンパク質が得られた。現在、それらの宿主タンパク質の同定のためのアミノ酸解析、抗体作製、発現プラスミドの作製を行っており、今後、それらを用いて NS5A との相互作用や IFN 抵抗性への関与の有無について検討する予定である。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）による慢性肝炎の治療にインターフェロン（IFN）が用いられており、現在の標準療法であるペグ IFN とリバビリン（RBV）の併用療法により多くの症例でウイルスの完全排除が得られるようになってきた。しかし、高ウイルス血症の HCV-1b 遺伝子型の症例では、

上記併用療法でもなお半数近い症例でウイルスの完全排除が望めない状況である。治療抵抗性を規定する因子は患者側とウイルス側の双方にあると考えられるが、その具体的な指標は未だ明確ではない。

我々は、ペグ IFN/RBV 併用療法によるウイルス排除と関連する因子として、HCV 非構造タ

ンパク質 NS5A の特定領域 (IRRDR; IFN/RBV resistance-determining region; aa 362~407) のアミノ酸配列の多様性が関与することを報告してきた¹⁾。同様に、NS5A の中央部領域に ISDR (IFN sensitivity-determining region; aa 237~276) とよばれる IFN 感受性と相関するアミノ酸配列が存在することがよく知られている²⁾。

本研究では、NS5A のアミノ酸変異が HCV の IFN 抵抗性 (または感受性) に直接影響を及ぼすか否かについて実験室レベルで検証するとともに、IFN 抵抗性の分子機序を解明する基盤として、NS5A と相互作用する宿主タンパク質を探索・同定することを目的とした。

B. 研究方法

1) 点変異導入 HCV サブゲノム RNA レプリコンの作製と IFN 感受性の比較検討:

HCV サブゲノム RNA レプリコン (Con1 株; HCV-1b genotype) をコードするプラスミド (pFK5B/2884Gly; Bartenschlager 博士より分与)³⁾ の NS5A 領域に、定法により、点変異を導入した。試験管内転写反応により HCV サブゲノム RNA を作製し、エレクトロポレーションにより Huh-7 細胞及び Huh-7.5 細胞に導入した。G418 含有選択培地で培養し、HCV RNA レプリコン複製細胞を作製した。

上記で得た各種の HCV RNA レプリコン複製細胞を低濃度の IFN (1~5 IU/ml) で処理し、24~48 時間後の HCV RNA 複製量を Real-Time RT-PCR で定量した。

2) 免疫共沈法による NS5A 結合タンパク質の探索:

pEF1/Myc-His A (Invitrogen) 発現ベクターを用いて Myc-His 融合 NS5A を Huh-7 細胞に発現させた。その細胞抽出液から、C-Myc tagged protein mild purification kit (MBL) を用いて Myc-His 融合 NS5A を回収した。さらに、Ni-NTA-agarose (QIAGEN) を用いて Myc-His 融合 NS5A を精製回収した。このようにして得た精製画分をポリアクリルアミドゲル電気泳動に供

し、NS5A と共沈した宿主タンパク質の有無について解析した。

3) 試験管内 GST プルダウン法による NS5A 結合タンパク質の探索:

IFN 処理または未処理の HeLa 細胞から得た抽出液を大腸菌で発現させた GST 融合 NS5A と混合した後、グルタチオンビーズで GST 融合 NS5A を回収し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で、NS5A とともにプルダウンされた細胞由来タンパク質の有無を解析した。

4) Yeast two-hybrid 法による NS5A 結合タンパク質の探索:

NS5A のドメイン III のみ (aa 356~447) あるはドメイン II+III (aa 250~447) を bait にして、ProQuest Two-Hybrid System (Invitrogen) を用いて定法により行った。ライブラリーとして ProQuest Two-Hybrid cDNA Library Human Liver (Invitrogen) を用いた。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え HCV RNA レプリコンの作製及び使用は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。すべての実験はバイオセーフティー指針に準拠して行った。

C. 研究結果

1) 点変異導入 HCV サブゲノム RNA レプリコンの作製と IFN 感受性の比較検討:

HCV サブゲノム RNA レプリコン (Con1 株; HCV-1b) は、IFN 抵抗性と考えられる HCV-J 株のアミノ酸配列と比較すると、IRRDR に 6ヶ所の変異があり、IFN 感受性グループに属する。そこで、この 6ヶ所の変異をすべて HCV-J 株と同一のアミノ酸残基に置換した株 (Con1-Res 株) を作製した。さらに、Con1 株に IFN 感受性に寄与すると考えられる 2ヶ所のアミノ酸変異 (V388A、K406T)¹⁾ を導入し、計 8ヶ所の IRRDR 変異を持つ株 (Con1-Sen 株) も作製した。

これら 3種類の HCV サブゲノム RNA レプリコンを Huh-7.5 細胞に導入し、G418 選択によりそれぞれの HCV RNA レプリコン複製細胞を得

た。それらの細胞を低濃度の IFN (1~5 IU/ml) で処理し、24~48 時間後の HCV RNA 複製量を比較検討したが、3 種類の細胞の間で有意な差は認められなかった。Huh-7.5 細胞は RIG-I の変異のため IFN- β 誘導能が欠損しているため、この影響を除外するため、RIG-I 変異のない Huh-7 細胞を用いて同様の実験を行ったが、やはり上記 3 種類の HCV RNA レプリコン複製細胞の間で、IFN 感受性に有意の差は認められなかった。

2) NS5A 結合タンパク質の探索 :

a) 免疫共沈法による NS5A 結合タンパク質の探索 : NS5A と特異的に共沈する宿主タンパク質候補のバンドがポリアクリルアミドゲル上で 10 種類以上確認された。現在それらのバンドを切り出して MALDI-TOF-MS/MS 解析を行っている。

b) 試験管内 GST プルダウン法による NS5A 結合タンパク質の探索 : IFN 処理 HeLa 細胞抽出液中に、GST 融合 NS5A と特異的に結合する分子量約 200 kDa のタンパク質 (IFN-induced p200) が存在することを見出した。現在、このタンパク質のアミノ酸解析、抗体作製及び発現プラスミドの作製を進めている。

c) Yeast two-hybrid 法による NS5A 結合タンパク質の探索 : NS5A のドメイン III (aa 356~447) を bait に用いたスクリーニングでは、結合タンパク質の候補は得られなかった。次いで、ドメイン II+III (aa 250~447) を用いたスクリーニングを行い、2 種類の候補タンパク質を得た。現在、このタンパク質の発現プラスミドを作製し、さらなる解析を進めている。

D. 考察

本研究では、HCV サブゲノム RNA レプリコン親株 (Con1 ; IRRDR 変異は 6 ヶ所)、IRRDR が HCV-J と同一の IFN 抵抗性と推測される株 (Con1-Res)、IRRDR 変異を 8 ヶ所有する IFN 感受性と推測される株 (Con1-Sen) を作製して、それぞれの IFN 感受性を比較検討したが、3 者間で有意な差は認められなかった。しかしながら、今回実験に用いた HCV サブゲノム RNA レプリ

コンは非構造タンパク質領域しか有しておらず、IFN 抵抗性に関与する可能性が報告されているコアタンパク質やエンベロープタンパク質との相互作用を検討することはできなかった。NS5A とコアタンパク質あるいはエンベロープタンパク質との相互作用が IFN 抵抗性に関与している可能性を検討するため、今後は、HCV 全長ゲノム RNA レプリコンや最近開発された HCV 感染系を用いて、IRRDR 変異の意義についてさらに解析する予定である。

免疫共沈法、試験管内 GST プルダウン法及び yeast two-hybrid 法により、IFN 誘導性 p200 等、複数の NS5A 結合タンパク質の候補が得られた。現在、それらの宿主タンパク質の同定のためのアミノ酸解析、抗体作製、発現プラスミドの作製を行っており、今後、それらを用いて NS5A との相互作用や IFN 抵抗性への関与の有無について検討する予定である。

E. 結論

1) HCV サブゲノム RNA レプリコンを用いた実験系において、IRRDR 変異の多いことが IFN 感受性を規定しているという仮説を支持する結果は得られなかった。今後、HCV 全長ゲノム RNA レプリコンや HCV 感染系を用いて、IFN 抵抗性に関する IRRDR 変異の意義について、さらに検討する必要がある。

2) 免疫共沈法、試験管内 GST プルダウン法及び yeast two-hybrid 法により、IFN 誘導性 p200 等、複数の NS5A 結合タンパク質の候補が得られた。今後、それらの宿主タンパク質と NS5A との相互作用や IFN 抵抗性への関与について検討する必要がある。

[参考文献]

- 1) El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Prediction of efficient virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of Hepatitis C virus and anti-NS5A

antibodies in pre-treatment sera. *Microbiol Immunol* 51:471-482, 2007.

- 2) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334:77-81, 1996.
- 3) Lohmann V, Korner F, Dobierzewska A, Bartenschlager R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 75:1437-1449, 2001.

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Prediction of efficient virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of Hepatitis C virus and anti-NS5A antibodies in pre-treatment sera. *Microbiol Immunol* 51:471-482, 2007.
2. Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, Kohara M, Sada K, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol* (in press).

2. 学会発表

1. Sequence variation of interferon/ribavirin resistance-determining region (IRRDR) of HCV NS5A is a predictive marker for

sustained virological response upon combination therapy with pegylated interferon and ribavirin. Hotta H, El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Imoto S, Sasase N, Kim S-R. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. November 2-6, 2007. Boston, Massachusetts, USA.

2. Ahmed El-Shamy、笹山美紀子、長野基子、金守良、堀田博. C型肝炎ウイルスNS5A V3領域近傍のアミノ酸配列多様性: ペグインターフェロン・リバビリン併用療法におけるSVR予測因子の検討. 第55回日本ウイルス学会学術集会, 札幌, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

培養細胞系による肝炎ウイルス耐性機構の基盤研究

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部室長

研究要旨 C型肝炎ウイルス（HCV）の薬剤耐性化の分子機構を明らかにするため、HCV genotype 2a 株のサブジェノミック RNA 持続複製（レプリコン）細胞をC型肝炎治療薬リバビリン（RBV）存在下で長期間培養した。200 μ M RBV 存在下で20週間培養することでレプリコン細胞がRBVに対して耐性化することを見出した。耐性細胞のHCV RNAには、アミノ酸変化を伴う特徴的な変異がNS3、NS4B、NS5A、NS5B領域に各1カ所（T1134S、P1969S、V2405A、Y2471H）存在し、そのうちY2471Hが耐性獲得に重要であることが示唆された。

A. 研究目的

抗ウイルス薬に対する耐性ウイルスの出現は、多くのウイルス感染症の治療において問題となっている。C型肝炎治療においても抗C型肝炎ウイルス（HCV）薬の長期間投与に伴う耐性ウイルスの出現が懸念されているものの、各治療薬に対する耐性HCVの特徴は十分には明らかにされていない。本研究では、現行の治療薬、開発中のウイルス酵素阻害剤、また今後、創薬化の可能性がある化合物に対する耐性HCVをHCV複製細胞系または感染増殖系を用いて同定し、薬剤耐性獲得の分子機構を解析する。本年度はリバビリン（RBV）に対して耐性の遺伝子型2a HCVを同定とその耐性獲得に必要な遺伝子変異を明らかにした。

B. 研究方法

HCV 遺伝子型 2a JFH-1 株のサブジェノミックレプリコンプラスミド（pSGR-JFH1）を XbaI 切断により直鎖化し精製後、これを鋳型として試験管内にて RNA 合成を行った。得られたレプリコン RNA をエレクトロポレーション法により Huh7 細胞へ導入した。G418 存在下で 4 週間培養し、HCV RNA 自立複製細胞株（以下レプリコン細胞）

を取得した。このレプリコン細胞に RBV を種々の濃度で添加し 3 日、8 週間、または 20 週間培養後、細胞内の HCV RNA レベルをリアルタイム RT-PCR 法により定量的に測定した。

一過性の HCV RNA 複製実験には、ファイアフライルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとする pSGR-JFH1/Luc を用いた。前述の通り合成 HCV RNA を細胞へ導入し、細胞ライセート中のルシフェラーゼ活性を測定することにより HCV RNA 複製をモニターした。変異レプリコン（pSGR-JFH1-m3, -m4B, -m5A, -m5B）は PCR を利用した部位特異的変異導入法によって作製した。

C. 研究結果

HCV JFH-1 株のレプリコン細胞に 100 μ M RBV を 8 週間処理した場合、リバビリン耐性細胞の出現は観察されなかったが、200 μ M RBV 存在下で 20 週間培養することでレプリコン細胞が RBV 耐性化することを見出した。すなわち、RBV 非処理細胞では、HCV RNA レベルを 50% 阻害する RBV 濃度（IC₅₀）は 59 μ M であるのに対して、RBV 長期処理細胞では同等の阻害効果を示すために約 9 倍（531 μ M）の RBV を要した（Fig.

1)。

この薬剤耐性が、細胞の変化（薬物取り込み能の低下など）によるものかどうかを明らかにするため、RBV 耐性及びコントロールレプリコン細胞からインターフェロン (IFN) 処理によって HCV RNA を除去した上で RBV の感受性を調べたところ、両細胞とも同等の RBV 感受性を示すことがわかった。すなわち、レプリコン細胞の RBV 耐性獲得は細胞側の変化によるものではないことが示唆された。

一方、RBV 耐性がウイルス側の変化によるものであるかを調べるため、RBV 耐性及びコントロールレプリコン細胞からそれぞれ total RNA を抽出し、naïve Huh7 細胞へ導入し新たに HCV RNA 複製細胞を作製した。得られた 2 種類の細胞について RBV の抗 HCV 作用を比較したところ、RBV 耐性レプリコン細胞由来 RNA を導入した細胞の方が明らかに RBV に対して非感受性であることが示された。

このように、HCV 遺伝子の変化によって RBV 耐性が獲得された可能性が示唆されたため、RBV 耐性レプリコン細胞中の HCV 遺伝子 (NS3~NS5B 領域：約 6 kb) の塩基配列を決定した。その結果、耐性細胞の HCV 遺伝子には、アミノ酸変化を伴う特徴的な変異が NS3、NS4B、NS5A、NS5B 領域に各 1 カ所 (T1134S、P1969S、V2405A、Y2471H) 存在することを見出した。

これらの HCV 変異が RBV 耐性獲得に重要であるかどうかを明らかにするため、各変異をそれぞれ導入したルシフェラーゼレプリコンプラスミド (pSGR-JFH1-m3, -m4B, -m5A, -m5B) を構築した。各変異体 RNA を細胞へ導入し 4 時間後に RBV 500 μ M を添加、さらに 20 および 44 時間培養後の HCV 複製レベルを測定した。その結果、JFH1-m3, -m4B, -m5A は RBV 添加により野生型と同程度まで HCV 複製レベルが阻害されたのに対し、JFH1-m5B の場合、同レベルはこれらに比べ約 4.5 倍であった。この結果、NS5B 領域の点変異 (Y2471H) が JFH1 クローンの RBV に対する耐性獲得に関与する可能性が示された。

様々な genotype の HCV クローン 567 種についてアミノ酸配列を比較解析したところ、アミノ

酸 2471 番目のチロシンは genotype 2a に特徴的であることが示された (Table1)。大部分の genotype 1 株では同ポジションはヒスチジン、genotype 2b ではフェニルアラニンであった。

D. 考察

一般的に、ウイルス感染症の化学療法において完全にウイルスが除去されない場合、残存するウイルスに遺伝子変異が観察されるケースが多い。実際、C 型肝炎の IFN・RBV 療法の場合も、投与終了後に肝炎が再燃するケースでは HCV 遺伝子変異を伴うことが報告されている。RBV に対する耐性 HCV の出現は、これまで genotype 1 について報告されているが、その他の genotype では研究が進んでいない。また、薬剤耐性化の分子機構についてはほとんど解明されていない。

本研究で、RBV に対して耐性を示す genotype 2a の HCV が初めて見出された。さらに、この耐性獲得には NS5B 領域の点変異が重要であることが示された。NS5B 蛋白は RNA ポリメラーゼであり、Y2471H の変異が、RBV による HCV RNA 複製阻害作用からのエスケープに働いているのかもしれない。本研究成果は、C 型慢性肝炎患者への抗ウイルス療法における薬剤耐性ウイルスの出現予測とその対策に役立つとともに、核酸代謝拮抗剤の抗 HCV 薬としての開発研究にとって有用な知見となるものと期待される。

E. 結論

RBV に対する耐性 HCV genotype 2a HCV をはじめて見出した。この耐性獲得には NS5B 領域の点変異が重要であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8

- interaction impairs viral replication. *J. Virol.* (in press).
2. Taguwa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* (in press).
 3. Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *J. Virol. Methods.* (in press).
 4. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 1200-1212 (2007).
 5. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* 42: 411-23 (2007).
 6. Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81:1174-1185 (2007).
 7. Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1727-1735 (2007).
 8. Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 1661-1666 (2007).
 9. Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee YJ, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Mori K, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes Infect.* 9: 515-21 (2007).
 10. Mizutani T, Endoh D, Shirato K, Shimizu H, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Kwang L, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H. Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 322-324 (2007).
 11. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J. Virol.* 81: 8030-8040 (2007).
 12. Inoue Y, Murakami K, Hmwe SS, Aizaki H, Suzuki T. Transcriptomic comparison of human hepatoma Huh-7 cell clones with different hepatitis C virus replication efficiencies. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 173-178 (2007).
- G. 知的所有権の出願・登録状況
なし

Fig. 1 Anti-HCV effect of RBV in the replicon cells after passaging in the presence of 200 μ M RBV for 20 weeks

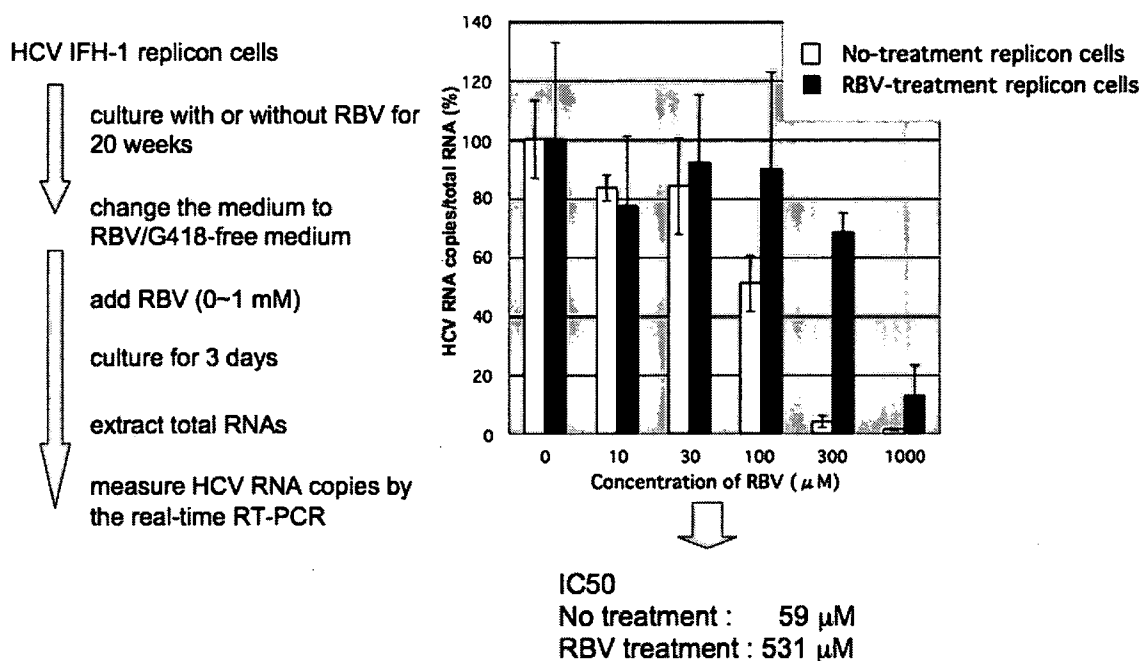


Table 1 Comparison of amino acid residues at 2471 among various HCV genotypes

Genotype	Numbers of HCV clones					Total
	H (Histidine)	Y (Tyrosine)	F (Phenylalanine)	N (Asparagine)	R (Arginine)	
1a	110 (96%)	2 (2%)	0	2 (2%)	0	114
1b	354 (97%)	6 (2%)	0	5 (1%)	1(0%)	366
2a	0	24 (100%)	0	0	0	24
2b	0	0	25 (100%)	0	0	25
3a	18 (100%)	0	0	0	0	18
3b	2 (100%)	0	0	0	0	2
6a	18 (100%)	0	0	0	0	18

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業
薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究
分担研究報告書

薬剤耐性及び治療効果に関係する HBV,HCV 遺伝子の解析

分担研究者 鈴木文孝 国家公務員共済組合連合会虎の門病院 肝臓センター 医長

研究要旨;B型慢性肝疾患に使用されている核酸アナログ製剤の長期投与では、耐性ウイルスの出現が問題となっている。この耐性ウイルスを測定する新たな測定系(Invader assay)を作成し、その有用性を調べた。また C 型慢性肝炎症例(genotype 1b、高ウイルス量)に対する治療の基本である Pegylated Interferon (PEG-IFN)と Ribavirin (RBV)併用療法48週間投与の治療効果予測因子を検討した。特に ISDR(IFN sensitive determinant region)と HCV core 領域のアミノ酸(70 番目と91番目)置換が治療効果に関係するかどうか調べた。対象は、ラミブジン耐性ウイルスによる肝炎に対してエンテカビル治療を行なったB型慢性肝炎19症例と PEG-IFN と RBV の48週間の併用療法を施行した Genotype 1 型、高ウイルス量の C 型肝炎371例である。B 型慢性肝疾患症例におけるエンテカビル使用例10例に耐性ウイルスの検出が認められた。Invader assay にて10例全例が検出され、従来の測定法である PCR-direct sequence 法よりも早期に検出可能であり有用な検査法であった。また C 型慢性肝炎症例に対する PEG-IFN と RBV 併用療法の治療効果予測因子(SVR に寄与する因子)を多変量解析にて検討すると、AFP、ISDR、Core 領域のアミノ酸置換、性別、治療期間、血小板数であった。さらに50歳以上の男性で SVR に寄与する因子は、AFP と ISDR であった。一方50歳以上の女性では ISDR と Core 領域アミノ酸置換であった。このように HCV のウイルス遺伝子測定は、治療効果予測に重要な因子であった。

A. 研究目的

B型慢性肝疾患の治療は、インターフェロン(IFN)と核酸アナログ製剤が中心である。IFN 療法は35歳以上の症例には効果が少ないため、35歳以上の症例では、核酸アナログ製剤の使用が主体となっている。さらに核酸アナログ製剤は、抗ウイルス効果が高く、副作用も少ないため多くの症例で使用されている。しかし核酸アナログ製剤の長期使用においては薬剤耐性ウイルスの出現が認められる。現在までに本邦で使用されている核酸アナログ製剤にはラミブジン、アデフォビル、エンテカビルの3種類があるが、このうちエンテカビルは最も薬剤耐性ウイルスの出現が少ないと報告されている。しかし、エンテカビルにてもラミブジン耐性ウイルス出現例では耐性ウイルス出現の可能性もある。また遺伝子学的にエンテカビ

ル耐性ウイルスのパターンには3種類ありこの測定系は確立されていない。そこでエンテカビル耐性ウイルスの遺伝子学的パターンを調べ新たな測定系を作成した。

C 型慢性肝炎の治療の主体は、Pegylated Interferon (PEG-IFN)と Ribavirin (RBV)の併用療法である。しかし本邦で多い genotype 1b 型、高ウイルス量症例に対する PEG-IFN と RBV 併用48週間投与の完全著効(SVR)率は、40-50%であり、まだ十分な治療効果を得ていない。そこで SVR に関係するウイルス学的因子を同定し、治療効果予測に使用することは医療経済学的にも重要なことである。

このような目的にて薬剤耐性に関係する B 型肝炎ウイルスの遺伝子学的検討と測定方法の確立、C 型肝炎の PEG-IFN と RBV 併用療法の治療効果に関係するウイルス学的検討を行った。

B. 研究方法

虎の門病院にてラミブジン耐性ウイルスによる肝炎に対してエンテカビル治療を行なったB型慢性肝炎19症例を対象とした。症例の内訳は男：女=17:2、年齢30-65歳(中央値38歳)、投与期間2-4.7年(中央値4.4年)、Genotype A:C=1:18、HBe抗原陽性:陰性=13:6、治療開始時のALT 52-347 IU/L (中央値119)、HBV DNA 6.6-7.6< Log copies/mL (中央値7.6<)であった。これらの症例でのエンテカビル耐性ウイルスについて遺伝子学的に検討した。さらにInvader assayによる測定を施行し、従来の測定系であるPCR-direct sequence法と比較した。

またPEG-IFNとRBVの48週間の併用療法を施行したGenotype 1型、高ウイルス量のC型肝炎371例を対象とした。その内訳は、男：女=223:148、年齢18-72歳(中央値55歳)、治療開始時のALT 13-504 IU/L(中央値68)、Albumin 3.0-5.0 g/dL(中央値4.0)、Hb 9.4-18.5(中央値14.4)、血小板5.4-33.1(中央値16.5) $\times 10^4/\mu\text{L}$ であった。これらの症例でSVRに寄与する因子についてウイルス学的因子を含め検討した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、副作用、患者に関する個人情報の守秘義務、患者の権利保護等について説明し同意を文章または口頭にて取得し研究を行った。

C. 研究結果

(1) エンテカビル耐性ウイルスに関する遺伝子変異と検出系の開発

エンテカビル耐性ウイルスはHBVポリメラーゼ領域内のreverse transcriptase(rt)領域のrt184, rt202, rt250に認められる。これらの変異を検出するためにInvader assayによる測定系を作成した。Invader assayの測定原理はrt領域内でPCRを施行し、その後wild type及びmutant type用に作成したInvader oligoとprimary probeを反応させ、適合したprimary probeの5' flapが遊離したものをFRET cassetteにて捕捉するものである。

測定感度は 10^7 copiesのwild typeのplasmid存在下で1%のmutantを検出可能であった。

この測定系を使用してエンテカビル耐性ウイルスの出現を確認している10例の血清で検討した。耐性ウイルスのタイプはrtS202Gが5例、rtT184A/L/Fが5例であった。Invader assayにて全症例で耐性ウイルスが検出され、PCR-direct sequenceでの測定時期よりも平均6.4ヶ月早期に検出された。

(2) PEG-IFNとRBVの併用療法(48週間投与)の治療効果に関する遺伝子置換

371例のSVR率は42.3%(ITT解析)であった。全体でのSVRに寄与する因子を多変量解析すると、AFP (<11; $P<0.001$)、ISDR(≥ 2 ; $P<0.001$)、Core領域アミノ酸置換(double-wild type; $P=0.001$)、性別(男性; $P=0.001$)、治療期間(44週以上; $P=0.009$)、血小板数(15万以上; $P=0.018$)であった。SVR率には性別が関係するが、年齢も重要な因子である。そこで50歳以上の症例で同様に検討した。50歳以上の男性では、SVRに寄与する因子は、AFP (<11; $P=0.001$)とISDR(≥ 2 ; $P=0.010$)であった。一方50歳以上の女性ではISDR(≥ 2 ; $P=0.005$)とCore領域アミノ酸置換(double-wild type; $P=0.015$)であった。

D. 考察

B型慢性肝疾患の治療は、核酸アナログ製剤の投与が主体となっている。核酸アナログ製剤は、副作用も少なく多くの症例で肝機能の正常化が得られている。しかし核酸アナログ製剤の長期投与は耐性ウイルスの出現をもたらす。そこで現在は耐性ウイルスの出現率の少ないエンテカビルの使用例が多くなっている。しかし本邦においてはエンテカビル耐性ウイルスを簡便に検出する測定系は確立されていない。またエンテカビル耐性ウイルスの変異パターンにはrtT184L/M/F/A/C/G、rtS202I/G、rtM250V/Lが報告されている。従ってこれらを網羅した測定系を作成する必要がある。今回我々はInvader assayを用いた測定系を作成しエンテカビル耐性

ウイルスの検出を実際の血清を用いて施行した。この結果、従来の PCR-direct sequence 法よりも高感度に測定できることが示された。今後はさらに症例数を増やし検討する予定である。

一方現在治療の基本である C 型慢性肝炎 (genotype 1b、高ウイルス量) に対する PEG-IFN と RBV 併用療法48週間投与の治療効果予測には、生体側因子 (性別、年齢など) とウイルス側因子 (ウイルス量や遺伝子型、遺伝子変異など)、投与方法 (投与量、投与期間など) が関係している。このうちウイルス側因子は、SVR を予測する重要な因子の1つである。ISDR は IFN monotherapy 時に genotype 1b 型の治療効果に関係することが報告されている。また HCV core 領域の70番目と91番目のアミノ酸置換は IFN と RBV の SVR に関係する因子であることも報告されている。そこでこれらの因子が genotype 1b、高ウイルス量症例に対する PEG-IFN と RBV 併用療法48週間投与の治療効果予測に関係するかどうかを検討した。その結果 ISDR と Core 領域のアミノ酸置換は、SVR に関係し、特に50歳以上の症例では、重要な因子となっている。さらに50歳以上の女性では、治療効果が悪いいためこれらのウイルス学的因子を事前に検討することは重要なことである。ウイルス学的因子を含め、総合的に治療効果を予測し、無駄のない医療を行なう必要がある。

E. 結論

B型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤による耐性ウイルスの新たな測定系 (Invader assay) の検討をおこなった。今回はエンテカビル耐性遺伝子の検討を行なったが、ラミブジンやアデフォビルによる耐性ウイルス検出にも応用可能である。また C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN と RBV 併用療法48週間投与の治療効果予測には ISDR と Core 領域のアミノ酸置換が関係することを報告した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

鈴木 文孝、鈴木 義之、熊田 博光。
シンポジウム: B 型肝炎、治療。第 43 回日本肝臓学会総会、東京、2007.5.31.

鈴木 文孝、熊田 博光。
シンポジウム 1: C 型肝炎に対する PEG-IFN と Ribavirin 併用療法の治療成績、第 11 回日本肝臓学会大会、DDW、神戸、2007.10.18.

H. 知的財産権の出願・登録状況

今回の研究内容については特になし。

厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）
分担研究報告書

細胞内インターフェロン発現応答を抑制するHCV蛋白の探索と機能解析に関する研究

分担研究者 坂本 直哉 東京医科歯科大学・分子肝炎制御学講座・准教授

研究要旨：

C型肝炎ウイルスとインターフェロン関連たんぱくの相互作用を解析するため、病原体認識によるIFN発現応答を抑制するHCV蛋白およびその機能の解析を遂行し以下の結果を得た。(1)HCV培養系においてIFN誘導遺伝子であるGBP-1, IFI27, IFI6-16がHCV増殖を特異的に抑制することを新たに見出した。(2)NS4BがCardif及びその下流のRIG-I依存性インターフェロン β 発現応答を抑制することを確認し、その作用エピトープがNS4BのNおよびC末端のドメインであることを確認した。今後、GBP1とNS5Bの相互作用による両蛋白の酵素活性・機能への影響を解析する。また、NS4BとRIG-I経路関連たんぱく（Cardif, TBK1, IKKeなど）の分子間相互作用を解析し、作用する宿主蛋白とその結合エピトープをさらに狭めていく。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスとインターフェロン関連たんぱくの相互作用を解析し、抗ウイルス療法のあらたな標的宿主蛋白を同定する。

B. 研究方法

(1) IFN誘導遺伝子であるGBP-1, P27, IFI1-16に相互作用する宿主及びウイルス蛋白を免疫沈降法・two-hybrid法・蛍光抗体染色にて検索・同定する。

(2) HCV増殖細胞におけるIFN発現応答の抑制に関与することが見出されたNS4B蛋白、およびNS3/4A蛋白についてその標的蛋白・作用エピトープを特定する。これらの分子間相互作用を蛍光免疫顕微鏡、およびFRET法などにより視覚化し詳細な解析を行う。

C. 研究結果

・HCV培養系においてIFN誘導遺伝子であるGBP-1, IFI27, IFI6-16がHCV増殖を特異的に抑制することを新たに見出した。

・免疫沈降法、two-hybrid法により、GBP1とNS5B蛋白が特異的に結合することを見出し、その結合エピトープを含むドメインを特定した。

・NS4BがCardif及びその下流のRIG-I依存性インターフェロン β 発現応答を抑制することを確認し、その作用エピトープがNS4BのN、およびC末端のドメインであることを確認した。

D. 考察

近年、病原体感染によるIFN発現応答系に関わる基幹分子(RIG-I, MDA5, IPS-1, TLRs等)が国内外にて次々に同定されている。本研究の結果はHCVに限らず、広汎なウイルスに対する防御機構に対する理解を深め、抗ウイルス蛋白に拮抗するウイルス側の蛋白・エピトープを特定することにより、インターフェロン抵抗性を解除する新たな抗ウイルス分子標的療法創出へ応用可能である。

E. 結論

1. HCV蛋白発現細胞においてはRIG-IをトリガーとするIFN産生・応答系が著明に抑制された。
2. IFN発現応答を抑制する蛋白としてNS34A以外にNS4Bが同定され、N末端の関与が示唆された。
3. NS4Bを治療標的とする事がIFN治療抵抗例における新たな治療手段となる可能性が考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tasaka M, Sakamoto N, Itakura Y, Nakagawa M, Itusi Y, Sekine-Osajima Y, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Yoneyama M, Fujita T, Wakita T, Maekawa S, Enomoto N, Watanabe M: HCV nonstructural proteins responsible for suppression of RIG-I/Cardif-induced interferon response. J Gen Virol 2007; 88:3323-3333.

2. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N (equal contribution), Nakagawa M, Itusi Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Kanai T, Tsuchiya K,

Wakita T, Enomoto N and Watanabe M:
Development of plaque assays for hepatitis C
virus and isolation of mutants with enhanced
cytopathogenicity and replication capacity.
Virology 2008;371:71-85.

3. Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y,
Kanayama A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura
J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M,
Yamauchi K, Okada S, Sakamoto N, Enomoto
N: Targeting lipid metabolism in the treatment
of hepatitis C. *J Infect Dis*, in press.

4. Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P,
He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N,
Enomoto N, Ito M: Griseofulvin, an oral
antifungal agent, suppresses HCV
replication in vitro. *Hepatology Res*, in
press.

5. 田坂めぐみ、坂本直哉: C型肝炎ウイルス
感染におけるインターフェロン応答抑制
機構. *分子消化器病* 2007;4(2):124-129.

6. 坂本直哉: C型慢性肝炎の進展と治療
抵抗性: ウイルス変異の観点から. *日本内
科学会雑誌* 2007; 97(1):64-68.

7. 中川美奈、坂本直哉: C型肝炎ウイルス
の構造と病態. *治療学* 2007 in press.

2. 学会発表

1. Megumi Tasaka, Naoya Sakamoto, Yoshie
Itakura, Mina Nakagawa, Yasuhiro Itsui,
Yuko Sekine-Osajima, Yuki
Nishimura-Sakurai, Chen-Hsin Chen,
Mamoru Watanabe: HCV nonstructural
proteins responsible for impairing
RIG-I/Cardif -induced interferon responses.
APASL May-27-2007, Kyoto, Japan.

2. Sakamoto N, Nakagawa M, Watanabe M, for
the Ochanomizu Liver Conference: Clinical and
virological factors that predict outcomes of
interferon plus ribavirin combination therapy
for HCV infection (APDW2007 Symposium,
Oct-18-2007, Kobe, Japan).

3. 田坂めぐみ、坂本直哉、中川美奈、井津
井康浩、箆島裕子、櫻井 幸、陳正新、榎
本信幸、渡辺守: HCV-NS4B 蛋白による
interferon 発現応答抑制機構の解析. 第 43 回
日本肝臓学会総会, 2007.5.31, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

核酸アナログ耐性 HBV の高感度検出法の開発
および治療抵抗性 HCV の SNP 解析

分担研究者 加藤 直也 東京大学医学部附属病院消化器内科助教

研究要旨

1. Taqman Minor Groove Binder (MGB) プロープを用いて、B 型肝炎ウイルス多剤耐性変異 M204I/V の高感度検出法を開発した。
2. C 型肝炎の病態，特に炎症と線維化を規定するインターフェロン関連分子 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase (OAS)-1 と Toll-like receptor (TLR) 3 の多型を同定した。

A. 研究目的

1. 慢性 B 型肝炎の治療に用いられるラミブジンは高率に耐性株を誘導することが知られており，高感度で迅速な耐性株検出方法の開発が急務である。本研究では Taqman MGB Probe を応用し，ラミブジン耐性株を迅速に検出する方法を確立することを目的とした。
2. 慢性 C 型肝炎治療にペグインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われているが，その効果を規定する宿主側因子を同定する目的で，インターフェロン関連分子の single nucleotide polymorphisms (SNPs) につき解析を行う。

各アミノ酸（野生型は M，変異型は V/I）を有するプラスミド DNA を鋳型として用い，検出感度の検定を行った。条件設定を行った後に，実際の患者血清を用いて，M204V/I 変異の高感度検出を行い，ダイレクトシーケンス法と比較検討した。

2. C 型肝炎患者 437 例の白血球 DNA を用いて，TLR3 遺伝子の 5 か所の SNPs につき，Taqman 法を用いて遺伝子型を決定し，臨床情報との関連につき検討した。また，同様に，C 型肝炎患者 409 例の白血球 DNA を用いて，OAS-1 遺伝子の 6 か所の SNPs につき，Taqman 法を用いて遺伝子型を決定し，臨床情報との関連につき検討した。

B. 研究方法

1. B 型肝炎ウイルスの DNA ポリメラーゼの逆転写酵素部位の C ドメインの M204V/I 変異を高感度に検出するために Taqman MGB プロープを 3 種 (204M, 204I, 204V) 準備した。予備実験として

C. 研究結果

1. Taqman MGB プロープを用いた B 型肝炎ウイルス多剤耐性変異 M204I/V の高感度検出法を樹立した。M204V の検出感度は 10 コピー，10% であった。また，