

Fig. 4 Changes in serum ribavirin levels during PEG-IFN alpha-2b and ribavirin combination therapy. Serum ribavirin levels reached a peak by the eighth week and then plateaued. Bold lines indicate mean values and the error bars indicate the standard error. Fine solid lines indicate a sustained virological responder and broken lines a nonresponder. The diamond-shaped symbols indicate a time point and ribavirin concentration at which either dose reduction (closed diamonds) or discontinuation (open diamonds) occurred.

Association between PKR mRNA expression and virological response

The absolute expression levels of PKR mRNA at baseline prior to treatment were slightly higher in NRs than in SVR patients (1.8×10^{-2} vs 1.3×10^{-2} copies/one copy of G3PDH), although this difference was not statistically significant. Interestingly, in the PEG-IFN alpha-2b group, sequential PKR mRNA expression in response to PEG-IFN administration was significantly higher in patients who achieved an SVR compared with patients classified as NRs ($P < 0.05$) (Fig. 5).

The serum HCV dynamics during PEG-IFN alpha-2b and ribavirin combination therapy showed a biphasic pattern consisting of a rapid decrease within 24 h of initiation of the treatment (first phase), followed by a subsequent slow decrease. The mean viral decay during the first phase was $3.0 \log_{10}/\text{day}$ (95% CI: 2.4–3.5) and that calculated from day 2 onwards (the second phase of the response) was 0.075 (95% CI: 0.028–0.12) \log_{10}/day . Significant correlation was found between PKR expression at day 1 and viral decline rate calculated from the first phase of HCV dynamics ($r = 0.67$, $P = 0.0006$) (Fig. 6a). Moreover, significant correlation was also found between PKR expression at day 84 and second phase viral decline rate ($r = 0.67$, $P = 0.001$) (Fig. 6b). No significant associations were found between PEG-IFN or ribavirin concentration and kinetics of PKR expression.

DISCUSSION

The data of this study suggests that the higher expression levels of PKR transcripts seen with PEG-IFN alpha-2b from the second day of administration onwards were related, at least in part, to the improved efficacy of PEG-IFN alpha-2b

compared with conventional IFN alpha-2b. Our pharmacokinetic study suggests that pegylation may be responsible for the dramatic effect on induction of PKR associated with the PEG-IFN regimen, possibly as a consequence of maintaining blood levels of IFN within the therapeutic range. This concept is supported by our previous work [8], in which we demonstrated that intracellular expression of PKR during the second phase was maintained at a significantly higher level when IFN-beta was administered twice daily.

The expression of PKR transcripts was induced very rapidly following the first administration, and PKR expression at day 1 was significantly correlated with the first phase viral decline rate of HCV dynamics. It is likely this increase in PKR transcripts was associated with the rapid decline of HCV seen in the first phase of serum HCV dynamics, and this change is believed to be a result of the direct effect of IFN on virion production and release from infected target cells [12]. Although we found that there was no significant difference in peak PKR mRNA expression between the PEG-IFN alpha-2b and IFN alpha-2b groups, the expression of PKR transcripts from 24 h onwards was significantly higher with PEG-IFN alpha-2b than conventional IFN alpha-2b administration. The decline in viral numbers and activity seen after the second day (second phase viral decline of HCV dynamics) is believed to reflect the presumed elimination of viral-infected cells in addition to the direct antiviral properties of IFN [12]. It has been suggested recently that apoptosis of HCV-infected cells induced by IFN-stimulated PKR may be an important mechanism for the elimination of viruses [13]. In the present study, expression of PKR transcripts in response to PEG-IFN administration was higher in patients who achieved SVR compared with NR patients, and expression of PKR at day 84 was significantly associated with the viral decline rate calculated from the second phase of HCV dynamics. Therefore, the increased expression of PKR transcripts we observed

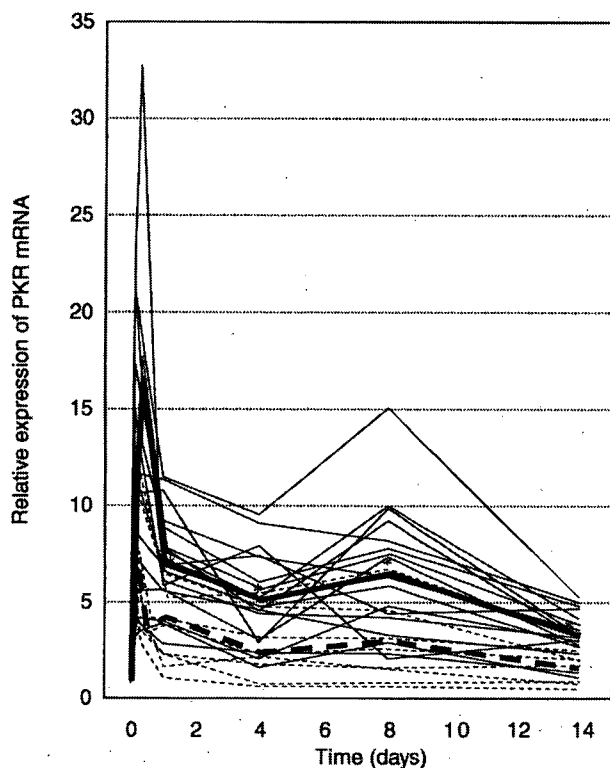


Fig. 5 Sequential expression of PKR mRNA in PBMCs in sustained viral responders (solid line, $n = 18$) and nonresponders (dotted line, $n = 8$). The bold line indicates the mean value for each group. Expression of mRNA is shown as the expression level relative to baseline expression. An asterisk indicates a statistically significant difference in relative expression value between the two different virological responses ($P < 0.05$).

after the second day may be associated with the enhanced efficacy of PEG-IFN alpha-2b. Again, this increased expression may have been due to an improvement in the pharmacokinetics of IFN following pegylation that results in prolonged clearance of IFN from serum.

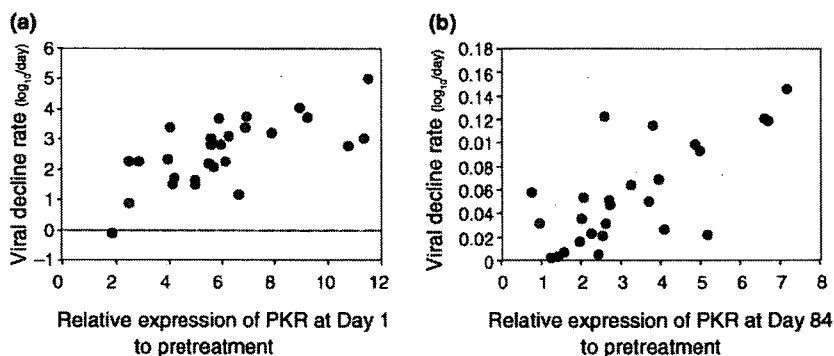


Fig. 6 (a) Significant correlation between expression of PKR mRNA at day 1 and viral decline rate calculated from the first phase of HCV dynamics ($r = 0.67$, $P = 0.0006$). (b) Significant correlation between expression of PKR mRNA at day 84 and viral decline rate calculated from the second phase of HCV dynamics ($r = 0.67$, $P = 0.001$).

Gerotto et al. [14] reported previously that higher baseline PKR expression was observed in NR patients compared with patients who achieved an SVR, although no significant difference was found in 'absolute' expression of PKR during treatment between these patients. We observed a similar trend in baseline expression in our study, although the relatively small number of cases meant that this difference did not achieve statistical significance. However, in our study, increased expression of PKR in response to PEG-IFN treatment was found in patients with an SVR. We analysed the changes in PKR expression during treatment relative to baseline expression levels. Because the absolute expression of PKR in response to IFN varies between patients (data not shown), we believe that calculating the level of expression during IFN treatment relative to the level of baseline expression is suitable in comparing PKR responses between patients. While this issue still remains controversial, our results imply that no or low responsiveness of PKR (i.e. less than a twofold increase from baseline) is associated negatively with an SVR, although high responsiveness of PKR during PEG-IFN administration does not always assure an SVR.

Although PBMCs were used as a model to quantify the serial gene expression of PKR, expression of PKR should be studied with hepatocytes, the target cell of HCV. Using liver tissue for sequential analysis is more ideal but ethically impossible. To address this point, we previously demonstrated a significant correlation between basal expression of PKR in liver tissue and the corresponding PBMC [8].

One of the limitation of the present study is that our results specifically concern PKR. Therefore, our present findings cannot be extrapolated to other ISGs such as MxA and 2',5'-oligoadenylate synthetase. Although expression and response of ISGs to therapy may differ among different ISGs, we previously found significant correlation between sequential expression levels for PKR and MxA during IFN treatment [8].

In the present study, PEG-IFN alpha-2b was detectable in all but one patient at 168 h after initial administration in

contrast to a study reported by Bruno et al. [15]. However, as in that study, no significant accumulation of PEG-IFN alpha-2b was found during therapy, which is marked contrast to the data from PEG-IFN alpha-2a (40 kD) plus ribavirin therapy [15]. In our study, the viral response was not associated with serum PEG-IFN concentration, but it was associated with cellular responses to IFN such as PKR expression. Although both PEG-IFNs appear to show different profiles in absorption, distribution and clearance, it remains unknown how these differences relate to differences in cellular responses *in vivo* such as PKR and the primary clinical endpoint, SVR.

The serum level of ribavirin has been reported previously to be associated with the observed clinical effects [6]. With ribavirin combination therapy, the antiviral effect was more potent after 3 weeks, at which time serum ribavirin levels were shown to have increased [7]. Therefore, accumulation of ribavirin from the third week of administration onwards, during which viral suppression is important for SVR, may be associated with the viral response seen with combination therapy. However, in our study, we found no significant difference in serum ribavirin levels between patients who achieved an SVR and NR patients. There was also no significant difference in serum IFN levels between the SVR and NR patients. As there are only a small number of studies that have reported serum ribavirin levels and associated virological effects in detail, further more comprehensive investigations are therefore required.

In conclusion, the pharmacokinetic improvement provided by pegylation of IFN leads to dramatic changes in PKR transcript expression patterns. In contrast, serum ribavirin concentrations appear not to be associated with the viral response and PKR expression. Our data suggest that the higher intracellular expression of PKR transcripts from the second day onwards is associated with the enhanced virological efficacy of PEG-IFN alpha-2b and ribavirin combination therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Japanese Ministry of Welfare and Labor. We, the authors who have taken part in this study, have no relationship with the manufacturers of the drugs now or in the past, and have not received any funding from them.

REFERENCES

- 1 Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC *et al*. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001; 358: 958–965.
- 2 McHutchison JG, Fried MW. Current therapy for hepatitis C: pegylated interferon and ribavirin. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 149–161.
- 3 Sen GC, Ransohoff RM. Interferon-induced antiviral actions and their regulation. *Adv Virus Res* 1993; 42: 57–102.
- 4 Kaufman RJ. Double-stranded RNA-activated protein kinase PKR. In: Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, eds. *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000: 503–528.
- 5 Tan SL, Katze MG. The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: a new face of death? *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 543–554.
- 6 Jen JF, Glue P, Gupta S, Zambas D, Hajian G. Population pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 555–565.
- 7 Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M *et al*. A comparison of the exponential decay slope between PEG-IFN alfa-2b/ribavirin and IFN alfa-2b/ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C genotype 1b infection and high viral load. *Intervirology* 2004; 47: 102–107.
- 8 Asahina Y, Izumi N, Uchihara M *et al*. Interferon-stimulated gene expression and hepatitis C viral dynamics during different interferon regimens. *J Hepatol* 2003; 39: 421–427.
- 9 Tsubota A, Hirose Y, Izumi N, Kumada H. Pharmacokinetics of ribavirin in combined interferon-alpha 2b and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus infection. *Br J Pharmacol* 2003; 55: 360–367.
- 10 Asahina Y, Izumi N, Uchihara M *et al*. A potent antiviral effect on hepatitis C viral dynamics in serum and peripheral blood mononuclear cells during combination therapy with high-dose daily interferon alfa plus ribavirin and intravenous twice-daily treatment with interferon beta. *Hepatology* 2001; 34: 377–384.
- 11 Takeuchi T, Katsume A, Tanaka T *et al*. Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome. *Gastroenterology* 1999; 116: 763–764.
- 12 Neumann AU, Lam NP, Dahari H *et al*. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998; 282: 103–107.
- 13 Gale M Jr, Kwieciszewski B, Dossett M, Nakao H, Katze MG. Antiapoptotic and oncogenic potentials of hepatitis C virus are linked to interferon resistance by viral repression of the PKR protein kinase. *J Virol* 1999; 73: 6506–6516.
- 14 Gerotto M, Dal Pero F, Bortoletto G *et al*. PKR gene expression and response to pegylated interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2004; 9: 763–770.
- 15 Bruno R, Sacchi P, Ciappina V *et al*. Viral dynamics and pharmacokinetics of peginterferon alpha-2a and peginterferon alpha-2b in naive patients with chronic hepatitis C: a randomized, controlled study. *Antivir Ther* 2004; 4: 491–497.

〈トピックス〉

キメラマウスを用いた研究

今村道雄 平賀伸彦 茶山一彰

特集 B型肝炎の新たな治療展開

臨床雑誌「内科」第100巻 第4号〔2007年10月号〕別刷

南江堂

《トピックス》 キメラマウスを用いた研究

今村道雄 平賀伸彦 茶山一彰*

要旨

- 肝炎ウイルスの研究のためには、小動物を用いた感染モデルが必要である。
- 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、B型、およびC型肝炎ウイルス感染マウスを作製した。
- 作製した肝炎ウイルス感染マウスは、抗ウイルス薬の効果判定に有用であった。
- 肝炎ウイルス感染マウスは、今後、新規候補となる抗ウイルス薬の生体内における効果判定や、肝炎ウイルスの感染・増殖のメカニズムの解明に有用であると思われる。

はじめに

肝炎ウイルスの生物学的研究やウイルス性肝炎に対する薬剤の開発のためには、小動物を用いた実践的な感染モデルの確立が必須である。しかし、B型肝炎ウイルス(HBV)やC型肝炎ウイルス(HCV)は、ともにヒトとチンパンジーにしか感染しない。チンパンジーは優れた肝炎ウイルス感染モデルになりうるが、倫理的、経済的に大きな問題を抱えている。

近年、マウス肝細胞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が作製され、筆者らはこのマウスを用いてHBV、HCVの感染モデルマウスを開発した。本稿では、このマウスを用いた筆者らのHBV研究、および今後の展望について述べる。

ヒト肝細胞キメラマウスの作製

ヒト肝細胞キメラマウスは、肝臓がヒトの肝細胞で置換されたマウスであり、マウスにヒト肝細胞を移植して作製する。このマウスは、移植した

ヒト肝細胞が免疫反応によって拒絶されずに肝臓中で増殖可能である必要があり、またマウス自身の肝細胞は徐々に死滅する必要がある。そこで、免疫不全の severe combined immune deficient (SCID)マウスと、肝不全を有する urokinase-type plasminogen activator (uPA)トランスジェニックマウスとを掛け合わせて、uPA/SCIDマウスが作製された。

この uPA/SCIDマウスの脾臓にヒト肝細胞を注入することで、ヒト肝細胞キメラマウスを作製した(Fig. 1)。キメラマウスの肝臓のヒト肝細胞への置換率は、ヒト肝細胞に特異的な抗体であるヒトアルブミン抗体による免疫染色、およびマウス血中ヒトアルブミン濃度により算出した。その結果、90%以上がヒトの肝細胞で置換されたキメラマウスの作製に成功した¹⁾。

ヒト血清を用いたB型肝炎ウイルス感染マウス

筆者らは、作製したヒト肝細胞キメラマウスにB型²⁾、およびC型肝炎患者³⁾の血清を投与し、肝炎ウイルス感染マウスを作製した(Fig. 2)。

B型肝炎患者の血清 50 μ l をマウスに静脈内投

* M. Imamura, N. Hiraga, K. Chayama (教授) : 広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病態制御内科学。

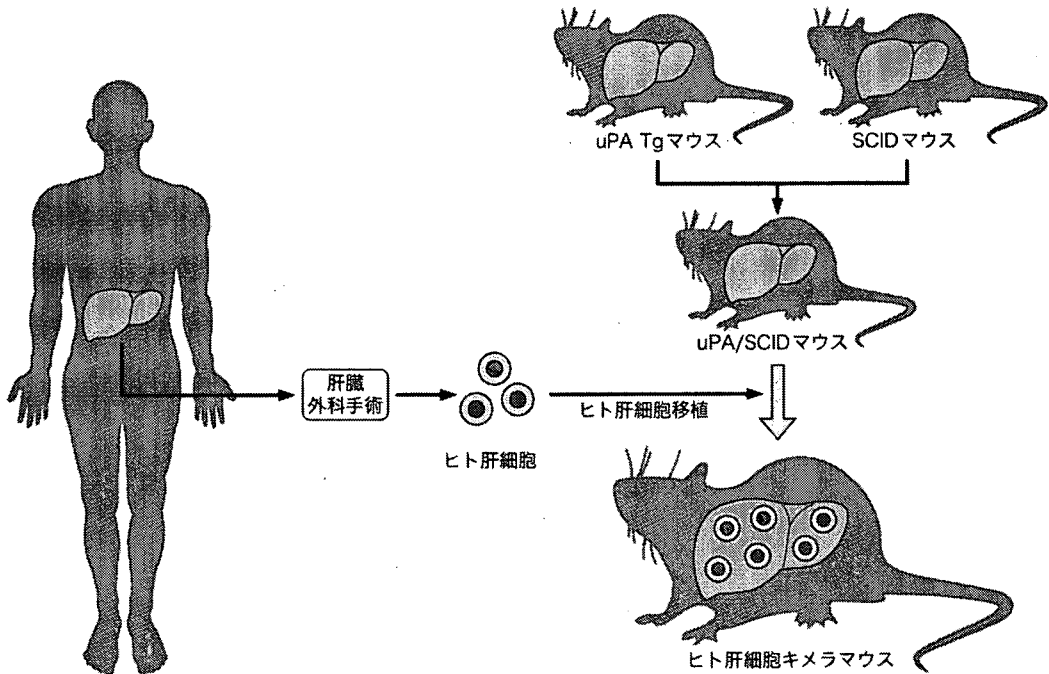


Fig. 1. uPA/SCID マウスおよびヒト肝細胞によるキメラマウスの作製法
(Hepatoday, 2005 年, 第 10 号, 株式会社マックヤン・ヘルスケア, p.3, 図 1 より引用)

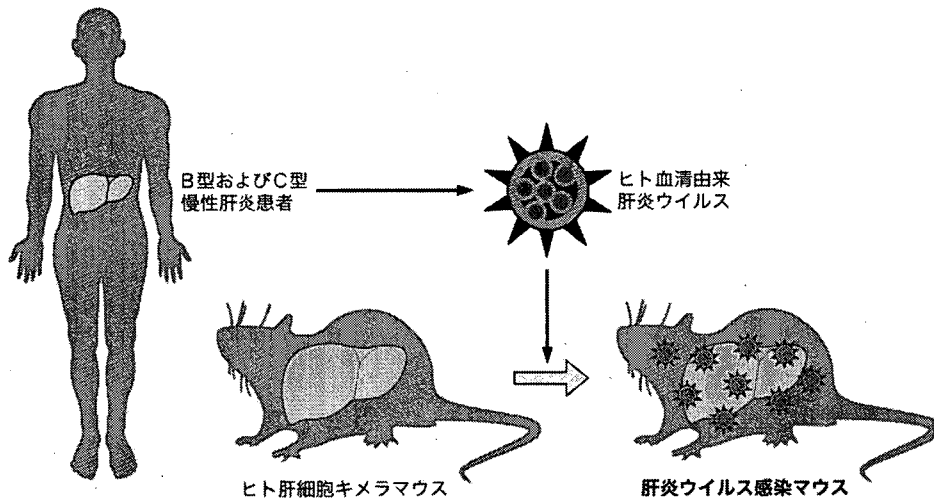


Fig. 2. 肝炎ウイルス感染マウスの作製法
(Hepatoday, 2005 年, 第 10 号, 株式会社マックヤン・ヘルスケア, p.4, 図 2 より引用)

与したところ、投与 2 週後よりマウス血中 HBV DNA は陽性となった。その後、血中 HBV DNA は次第に上昇し、 $10^8 \sim 10^{10}$ copy/ml のウイルス血症が長期間にわたり認められた (Fig. 3)。ウイルス血

症は最長で 35 週、平均で約 12 週間観察された。HBV 感染マウスの肝組織を検討したところ、ヒトアルブミン陽性のヒト肝細胞は、HBc-Ag 陽性であった。一方、マウス肝細胞は HBc-Ag 陰性で

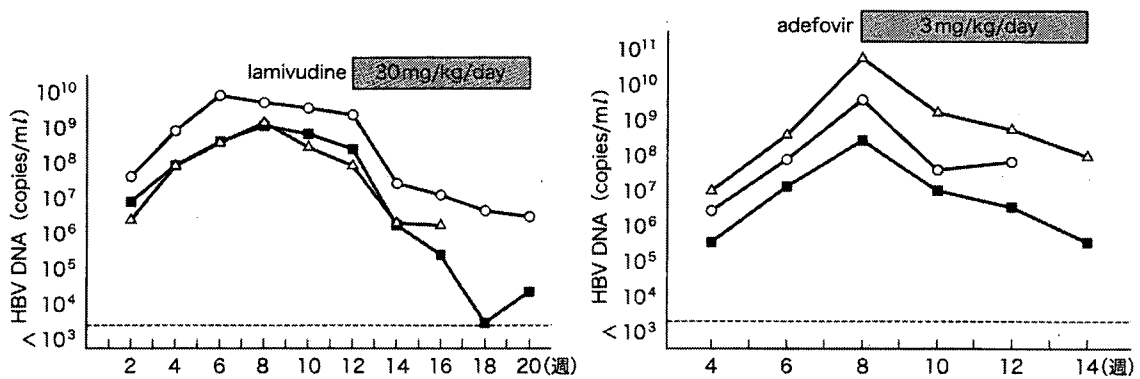


Fig. 3. 血清を用いたマウスへの HBV 感染

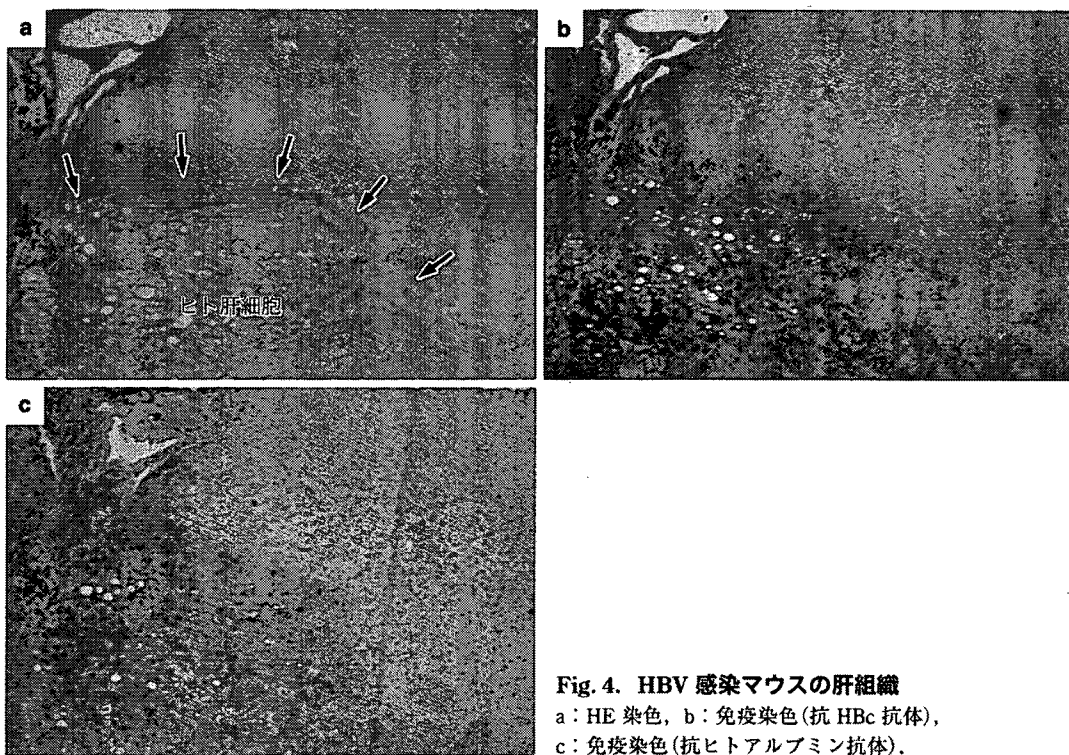


Fig. 4. HBV 感染マウスの肝組織
a: HE 染色, b: 免疫染色 (抗 HBc 抗体),
c: 免疫染色 (抗ヒトアルブミン抗体).

あり、置換されたヒト肝細胞に特異的に HBV が感染していることが確認された (Fig. 4)。

これら HBV 感染マウスに、抗 HBV 薬である lamivudine 30 mg/kg/day や、adefovir 3 mg/kg/day を経口投与したところ、血中 HBV DNA は著明に低下した (Fig. 3)。

感染性クローンを用いた B 型肝炎ウイルス感染マウス

B 型肝炎患者では核酸アナログ投与中、変異株の出現による薬剤耐性獲得が問題となっている。しかし、薬剤耐性獲得のメカニズムは解明されて

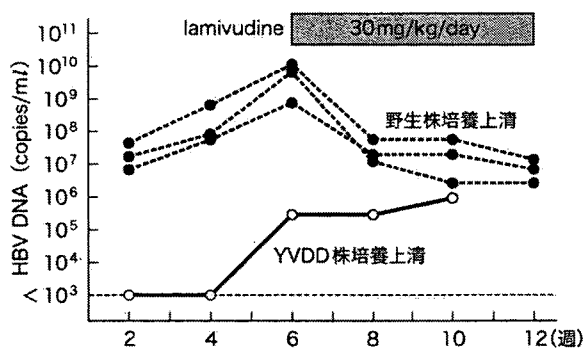


Fig. 5. 培養上清を用いたマウスへの HBV 感染

ならず、変異ウイルスに対する対策は十分には解決されていない。これらの問題の解決のためには、人工的に種々の変異を組み込んだウイルスを感染させたマウスの開発が必要である。

このため筆者らは、HBV を発現するコンストラクトを作製し、これを用いた HBV 感染マウスの作製を試みた。まず、1.4 倍長の HBV ゲノムを組み込んだ plasmid を作製し、HepG2 細胞に stable transfection し、上清中に約 10⁶ copy/ml の HBV を恒常的に産出する細胞を作製した。野生型の YMDD 株と同時に、lamivudine 耐性である YVDD 株を産出する細胞も作製した。これらの細胞の培養上清をキメラマウスへ投与したところ、野生株および YVDD 株とも HBV 感染が確認された (Fig. 5)。

興味深いことに、野生株を感染させたマウスでは、YVDD 株を感染させたマウスに比べ、血中 HBV DNA は高値であった。これらの結果から、生体内において、野生株は YVDD 株に比べ、ウイルス増殖が高度であることが示唆され、今後、他のクローンでも同様の現象が起こるか否かの検討が必要と思われる。

これら HBV 感染マウスに 30 mg/kg/day の lamivudine を経口投与したところ、野生株感染マウスでは血中 HBV DNA は低下したが、YVDD 株感染マウスでは低下しなかった (Fig. 5)。これらの結果から、この HBV 感染マウスが薬剤の効果判

定に有用であることが示された。

おわりに●

近年、細胞を用いた肝炎ウイルス研究は飛躍的に進歩している。一方、肝炎ウイルス感染の小動物モデルはいまだ確立しておらず、生体内におけるその研究は困難である。ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス感染モデルは、ヒト肝細胞へのウイルス感染であり、より生理的なモデルと思われる。

同様のマウスを用いて HBV および HCV 感染マウスは報告されているが^{4,5)}、筆者らはさらに、変異を組み込んだ HBV を血中に有するマウスを開発した。これらの手法を用いて、lamivudine 投与中に、B 型肝炎患者の血中に出現した新規耐性株の評価も可能であった⁶⁾。これらのウイルス感染マウスは、今後、新規候補となる抗ウイルス薬の生体内における効果判定や、肝炎ウイルスの感染・増殖のメカニズムの解明に有用であると思われる。

文 献●

- 1) Tateno C et al : Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165 : 901, 2004
- 2) Tsuge M et al : Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology* 42 : 1046, 2005
- 3) Hiraga N et al : Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Letts* 581 : 1983, 2007
- 4) Mercer DF et al : Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 7 : 927, 2001
- 5) Brown JJ et al : A long-term hepatitis B viremia model generated by transplanting nontumorigenic immortalized human hepatocytes in Rag-2-deficient mice. *Hepatology* 31 : 173, 2000
- 6) Yatsuji H et al : Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother* 50 : 3867, 2006

Annual Review 消化器 2008

2008年1月30日発行

中外医学社

2. B型肝炎の動物モデル

広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病態制御内科学 今村道雄
同 教授 茶山一彰

key words hepatitis B virus, animal model, urokinase-type plasminogen activator, human hepatocyte chimeric mouse, lamivudine, YMDD mutation

動 向

肝炎ウイルスの生物学的研究やウイルス性肝炎に対する薬剤の開発のためには、小動物を用いた実践的な感染モデルの確立が必須である。しかし、B型肝炎ウイルス (HBV) やC型肝炎ウイルス (HCV) はともにヒトとチンパンジーにしか感染しない。チンパンジーにHBV発現plasmidを導入した細胞培養上清を投与することによりHBV感染が生じることは以前より報告されている¹⁾。このように、チンパンジーは優れた肝炎ウイルス感染モデルになりうるが、倫理的、経済的に大きな問題を抱えている。齧歯類を用いたHBV感染モデルの作製は以前より試みられており、HBV発現plasmidをカチオニックリポソームを用いてラット肝臓内に注入する方法²⁾やhydrodynamic法により肝臓内に導入する方法^{3,4)}が報告されており、これらの手法により、肝臓内においてHBVが複製するラットやマウスが作製される。

近年、マウス肝細胞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が作製され、我々はこのマウスを用いてHBV⁵⁾ およびHCV⁶⁾ の感染モデルマウスを開発した。このモデルでは、HBVはマウス肝細胞ではなく、マウス肝臓内に移植したヒト肝細胞へ感染することにより、既報

のモデルに比べ、肝炎ウイルスの病態解明、ウイルス性肝炎患者への新規治療法の開発などに、より有用なモデルであると思われる。

A. ヒト肝細胞キメラマウスの作製

ヒト肝細胞キメラマウスは、肝臓がヒトの肝細胞で置換されたマウスであり、マウスにヒト肝細胞を移植して作製する。このマウスは、移植したヒト肝細胞が免疫反応によって拒絶されずに肝臓中で増殖可能である必要があり、またマウス自身の肝細胞は徐々に死滅する必要がある。そこで、免疫不全のsevere combined immune deficient (SCID) マウスと、肝不全を有するurokinase-type plasminogen activator (uPA) トランスジェニックマウスを掛け合わせてuPA/SCIDマウスが作製された⁷⁾。

このuPA/SCIDマウスの脾臓にヒト肝細胞を注入することでヒト肝細胞キメラマウスが作製された (図1)。キメラマウスの肝臓のヒト肝細胞への置換率は、ヒト肝細胞に特異的な抗体であるヒトアルブミン抗体による免疫染色、およびマウス血中ヒトアルブミン濃度により算出した。その結果、90%以上がヒトの肝細胞で置換されたキメ

ラマウスが作製され^{8,9)}, このマウスは HBV^{5,10,11)} および HCV^{6,12)} の有効な感染モデルとなることが報告された。

B. ヒト血清を用いたB型肝炎ウイルス感染マウス

ヒト肝細胞キメラマウスにHBV陽性ヒト血清

を用いてHBV感染マウスを作製した(図2)。HBV陽性ヒト血清50 μ lをマウスに静脈内投与したところ、投与2週後よりマウス血中HBV DNAは陽性となった。その後、血中HBV DNAは次第に上昇し、 $10^8 \sim 10^{10}$ copy/mlのウイルス血症が長期間にわたり認められた(図3)。HBV感染マウスの肝組織を免疫染色にて検討したところ、ヒトアルブミン陽性のヒト肝細胞は、HBc-Ag陽

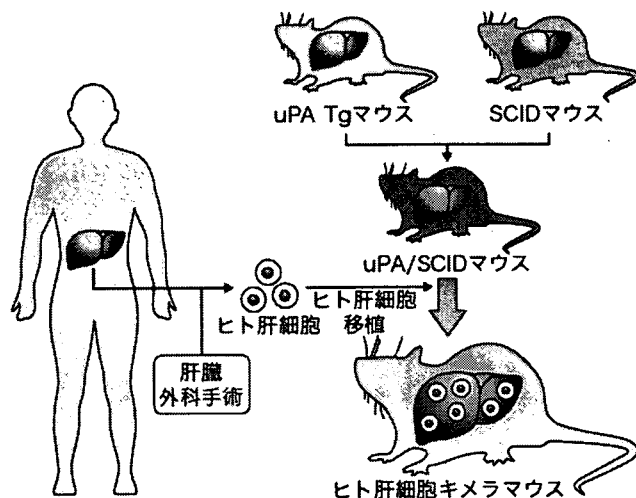


図1 uPA/SCIDマウスおよびヒト肝細胞によるキメラマウスの作製法

(Hepatoday, 2005年, 第10号, 株式会社マックヤン・ヘルスケア Page 3, 図1より)

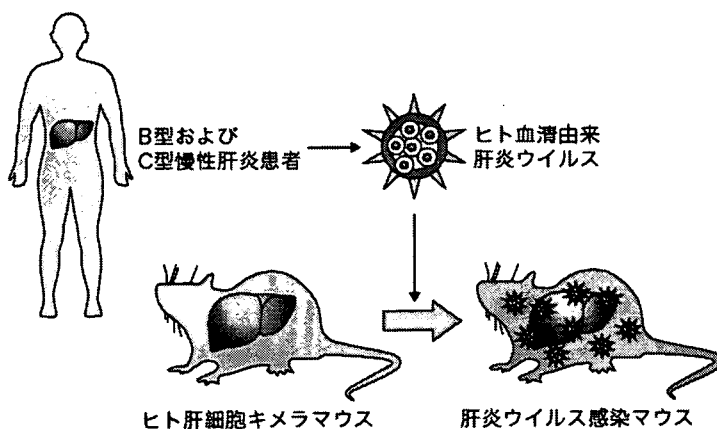


図2 肝炎ウイルス感染マウスの作製法

(Hepatoday, 2005年, 第10号, 株式会社マックヤン・ヘルスケア Page 4, 図2より)

性であった。一方、マウス肝細胞はHBc-Ag陰性であり、置換されたヒト肝細胞に特異的にHBVが感染していることが確認された(図4)。同様の方法により作製されたHBV感染マウスにおいて、肝細胞にHBV感染に特徴的なground-glass appearanceが観察されることも報告されている¹¹⁾。これらHBV感染マウスに核酸アナログであるラミブジン30 mg/kg/日やアデフォビル3 mg/kg/日を経口投与したところ、血中HBV DNAの著明な低下が認められた(図3)。

C. 感染性クローンを用いたB型肝炎ウイルス感染マウス

B型肝炎患者では核酸アナログ投与中、変異株の出現による薬剤耐性獲得が問題となっている^{13,14)}。しかし、薬剤耐性獲得のメカニズムはいまだ解明されておらず、変異ウイルスに対する対策は充分には解決されていない。今後、動物モデルを用いて、これらの問題を解決するためには、人工的に種々の変異を組み込んだウイルスを感染させたマウスの開発が必要である。このため、我々

は、HBVを発現するコンストラクトを作製し、これを用いたHBV感染マウスの作製を試みた。まず、1.4倍長のHBVゲノムを組み込んだplasmidを作製し、HepG2細胞にstable transfectionし、上清中に約 10^6 copy/mlのHBVを恒常的に産出する細胞を作製した。野生型のYMDD株と同時に、ラミブジン耐性であるYVDD株を恒常的に産出する細胞も作製した。これらの細胞の培養上清をキメラマウスへ静脈内投与したところ、野生株およびYVDD株ともHBV感染が確認され(図5)、人工的に作製した変異ウイルスに感染したマウスが作製された。また興味あることに、野生株を感染させたマウスでは、YVDD株を感染させたマウスに比べ、血中HBV DNAは高値であった。これらの結果から、生体内において、野生株はYVDD株に比べ、ウイルス増殖が高度であることが示唆され、今後、他のクローンでも同様の現象が起こるか否かの検討が必要と思われる。これらHBV感染マウスに30mg/kg/日のラミブジンを経口投与したところ、野生株感染マウスでは血中HBV DNAの低下が認められたが、YVDD株感染マウスでは低

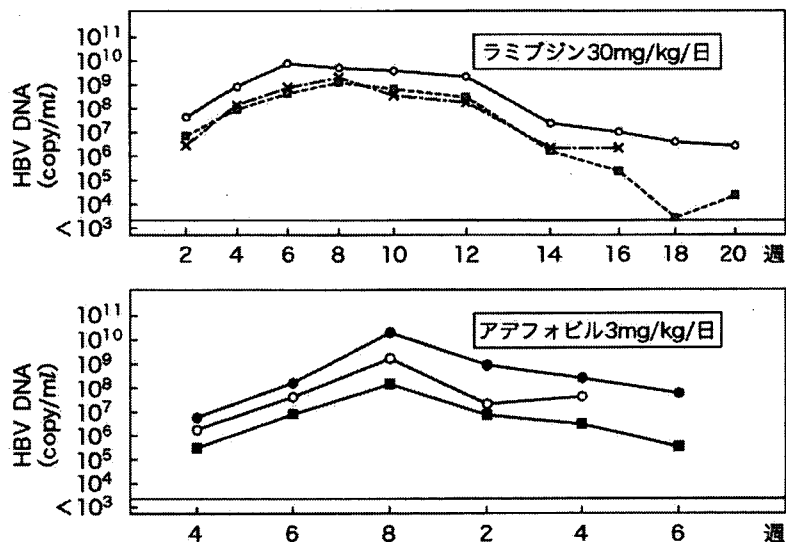


図3 血清を用いたマウスへのHBV感染

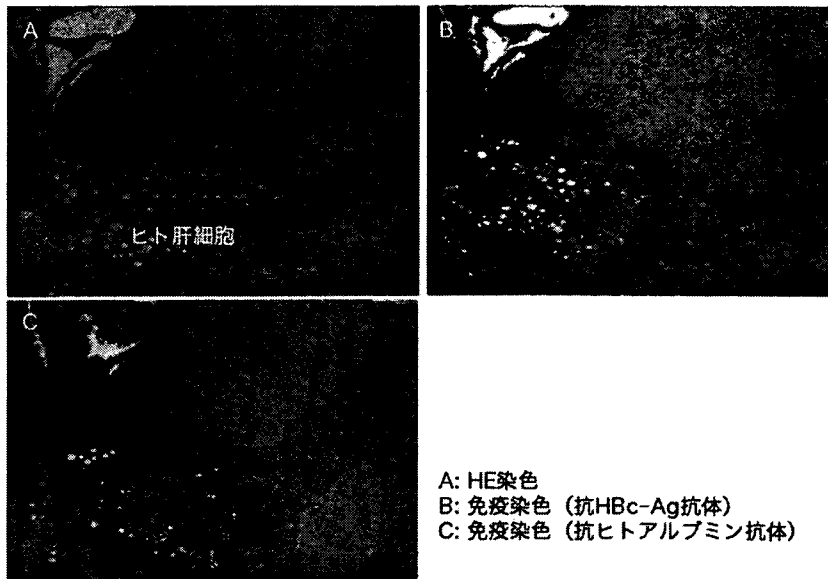


図4 HBV感染マウスの肝組織

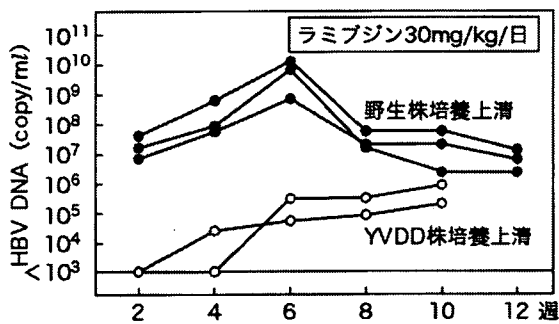


図5 培養上清を用いたマウスへのHBV感染

下を認めなかった (図5)。これらの結果から、このHBV感染マウスが薬剤の効果判定に有用であることが示された。

D. 今後の展望

近年、細胞を用いた肝炎ウイルス研究は飛躍的に進歩している。一方、肝炎ウイルスの小動物モデルはいまだ確立しておらず、生体内におけるその研究は困難である。ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルス感染モデルは、ヒト肝細胞へのウイルス感染であり、より生理的なモデルと思

われる。HBV発現 plasmid を用いることにより、種々の変異HBVを血中に有するマウスの作製が可能であり、これらの手法を用いて、ラミブジン投与中に、B型肝炎患者の血中に出現した新規耐性株の評価も可能であった¹⁵⁾。また同様の手法により、HBV genotype間でのウイルス感染・増殖、肝線維化の違いも報告されている^{16,17)}。今後、これらのウイルス感染マウスを用いて、肝炎ウイルスの感染・増殖のメカニズムの解明、ウイルス性肝炎患者の病態解明、さらには新規抗ウイルス剤の開発などが期待される。

文献

- 1) Acs G, Sells MA, Purcell RH, et al. Hepatitis B virus produced by transfected HepG2 cells causes hepatitis in chimpanzees. Proc Natl Acad Sci USA. 1987; 84: 4641-4.
- 2) Takahashi H, Fujimoto J, Hanada S, et al. Isselbacher, Acute hepatitis in rats expressing human hepatitis B virus transgenes. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92: 1470-4.
- 3) Suzuki T, Takehara T, Ohkawa K, et al. Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV

- and induces humoral immune response in mice. *BBRC*. 2003; 300: 784-8.
- 4) Yang PL, Althage A, Chung J, et al. Hydrodynamic injection of viral DNA: a mouse model of acute hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 13825-30.
 - 5) Tsuge M, Hiraga N, Takaishi H, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology*. 2005; 42: 1046-54.
 - 6) Hiraga M, Imamura M, Tsuge T, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Letts*. 2007; 581: 1983-7.
 - 7) Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, et al. Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. *Cell*. 1990; 62: 447-56.
 - 8) Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, et al. Replacement of diseased mouse liver hepatic cell transplantation. *Science*. 1994; 263: 1149-52.
 - 9) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, et al. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol*. 2004; 165: 901-12.
 - 10) Dandri M, Burda MR, Torok E, et al. Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology*. 2001; 33: 981-8.
 - 11) Meuleman P, Libbrecht L, Wieland S, et al. Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. *J Virol*. 2006; 80: 2797-807.
 - 12) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med*. 2001; 7: 927-33.
 - 13) Suzuki F, Tsubota A, Arase Y, et al. Efficacy of lamivudine therapy and factors associated with emergence of resistance in chronic hepatitis B virus infection in Japan. *Intervirology*. 2003; 46: 182-9.
 - 14) Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, et al. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology*. 1999; 30: 567-72.
 - 15) Yatsuji H, Noguchi C, Hiraga N, et al. Emergence of a novel lamivudine-resistant hepatitis B virus variant with a substitution outside the YMDD motif. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 3867-74.
 - 16) Sugiyama M, Tanaka Y, Kato T, et al. Influence of hepatitis B virus genotypes on the intra and extracellular expression of viral DNA and antigens. *Hepatology*. 2006; 44: 915-24.
 - 17) Sugiyama M, Tanaka Y, Sakamoto T, et al. Early dynamics of hepatitis B virus in chimeric mice carrying human hepatocytes monoinfected or coinfecting with genotype G. *Hepatology*. 2007; 45: 929-37.

【HCV感染キメラマウスモデル】

Hepatitis C virus-infected human hepatocyte chimeric mice model

今村 道雄・平賀 伸彦・茶山 一彰

Imamura Michio, Hiraga Nobuhiko, Chayama Kazuaki

Key words

C型肝炎ウイルス、動物モデル、
インターフェロン、
合成RNA、変異ウイルス

要 約

近年、細胞内におけるC型肝炎ウイルス (HCV) の感染・複製系が樹立され、HCV研究は飛躍的に進歩している。一方、HCV感染の動物モデルは確立しておらず、生体内におけるその研究は未だ困難である。その原因として、HCVはヒトとチンパンジーにしか感染しないため、有効な小動物モデルが存在していなかったことにある。ヒト肝細胞キメラマウスは、マウス肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されており、HCVを投与すると、置換されたヒト肝細胞へのHCV感染および細胞内でのウイルス複製が生じる。本マウスは、扱いが簡便であること、HCVの感染・複製がヒト肝細胞内で生じることなどの点より、優れたHCV感染モデルに成りうると思われる。今後、本マウスを用いて、生体内における肝炎ウイルスの感染・複製のメカニズムの解明、C型肝炎患者の病態解明、さらには新規抗ウイルス剤の開発などが期待される。

はじめに

本邦には約200万人のC型肝炎ウイルス (HCV) 感染患者が存在し、肝臓癌患者の多くはその病態の持続によるものである。近年、HCVに対する抗ウイルス剤であるインターフェロン製剤の改良により、HCV感染患者に対する治療効果は向上しつつあるも、未だ満足すべきものではない。HCVのアミノ酸配列がインターフェロン抵抗性と関与していると考えられているが、どの部位のどのような配列

が関与しているかは明らかでない。HCVのインターフェロン抵抗性のメカニズムの解明やC型肝炎患者に対する新規薬剤の開発のためには、動物モデルが必要である。しかし、HCVはヒトとチンパンジーにしか感染しない。チンパンジーにHCVを投与すると、肝細胞へのHCV感染および肝炎が発症する。このようにチンパンジーは優れたHCV感染モデルになりうるが、倫理的、経済的に大きな問題を抱えている。よってチンパンジーに変わる、マウスなどの小動物を用いたより実践的な感染モデルが必要である。HCVはヒト肝細胞に発現しているレセプターを介して感染すると考えられており^{1,2,3,4)}、通常のマウスにHCVを投与しても感染は認められない。一方、ヒト肝細胞キメラマウスは、肝臓が高度にヒト肝細胞に置換されたマウスであり⁵⁾、HCVの投与により置換されたヒト肝細胞への感染が可能である⁶⁾。

ここでは、ヒト肝細胞キメラマウスを用いた、HCVの生物学的研究および今後の展望について述べる。

1. ヒト血清を用いたC型肝炎ウイルス感染マウス

ヒト肝細胞キメラマウスにHCV感染患者 (genotype 1b型でHCV RNA量が2000 KIU/mL) の血清50 μ Lを経静脈的に投与したところ、投与2週

広島大学大学院医歯薬学総合研究科分子病態制御内科学

: Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

〒734-8551 広島市南区霞 1-2-3 Tel: 082-257-5192 Fax: 082-257-5194

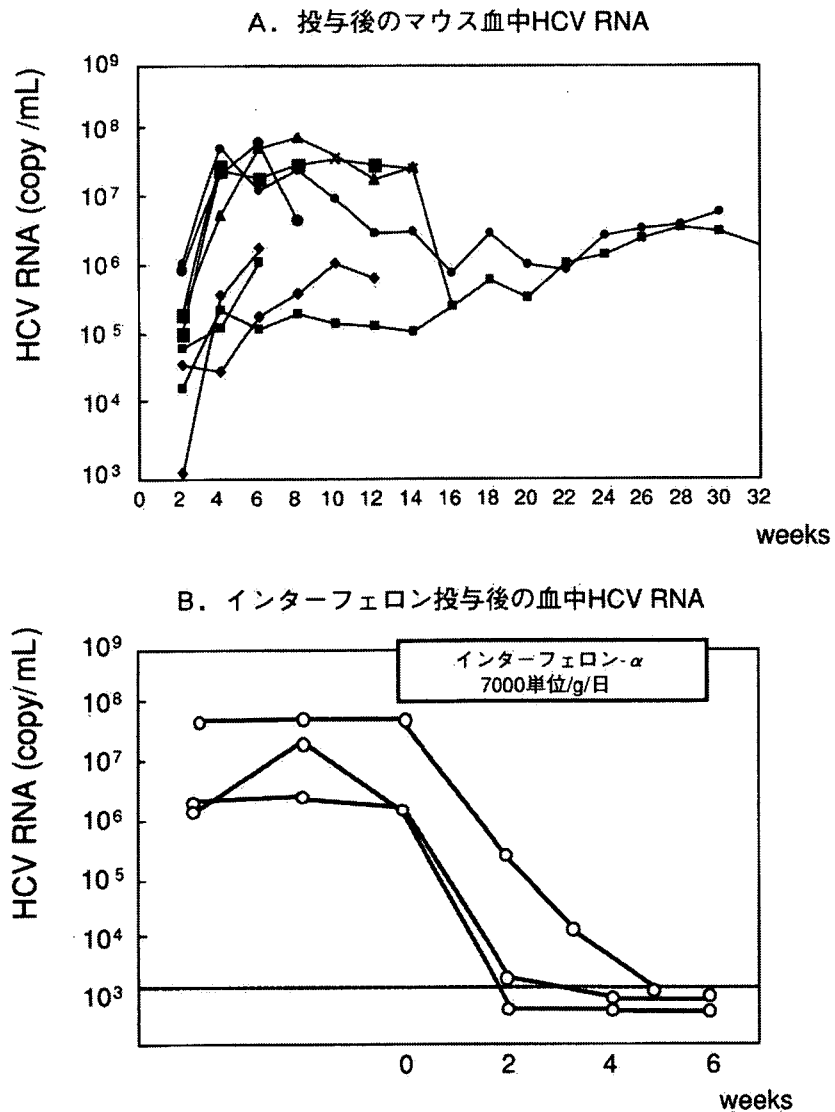


図1 HCV感染患者血清を用いたマウスへの感染

後、マウス血中のHCV RNAはすべて陽性となり、real-time PCRによる定量にて、 $10^4 \sim 10^8$ copy/mLのウイルス血症が検出された。以後、血中HCV RNAは $10^5 \sim 10^7$ copy/mLと、ヒトC型肝炎患者と同程度に上昇し、高titerのウイルス血症が長期に渡り認められた⁷⁾。ウイルス血症は最長で35週、平均で約12週間観察された(図1 A)。さらに、これらHCV感染マウスのインターフェロン感受性を検討した。HCV感染マウスへ7000単位/g/日のインターフェロン- α を連日筋注したところ、2~5週後、すべてマウスにおいて血中HCV RNA量は感度(10^3 copy/mL)以下に低下し(図1 B)、これらHCV感染マウスがインターフェロンへの感受性を示すことが確認された。

2. 感染性HCVクローンを用いたマウスへの感染

HCVには種々のgenotypeが存在し、genotype間によりインターフェロンの感受性が異なることが知られている。すなわち、genotype 1型は2型に比べ、インターフェロン抵抗性である。また同じgenotype型であっても、クローンにより、インターフェロン感受性が異なっている。これらの原因としてHCVのアミノ酸配列が重要と考えられているが、どの部位のどのようなアミノ酸配列がインターフェロン抵抗性と関与しているのかは未だ明らかではない。種々のアミノ酸変異を持つHCV感染マウスの作製が可能となれば、これらの解明の足がかりとなると

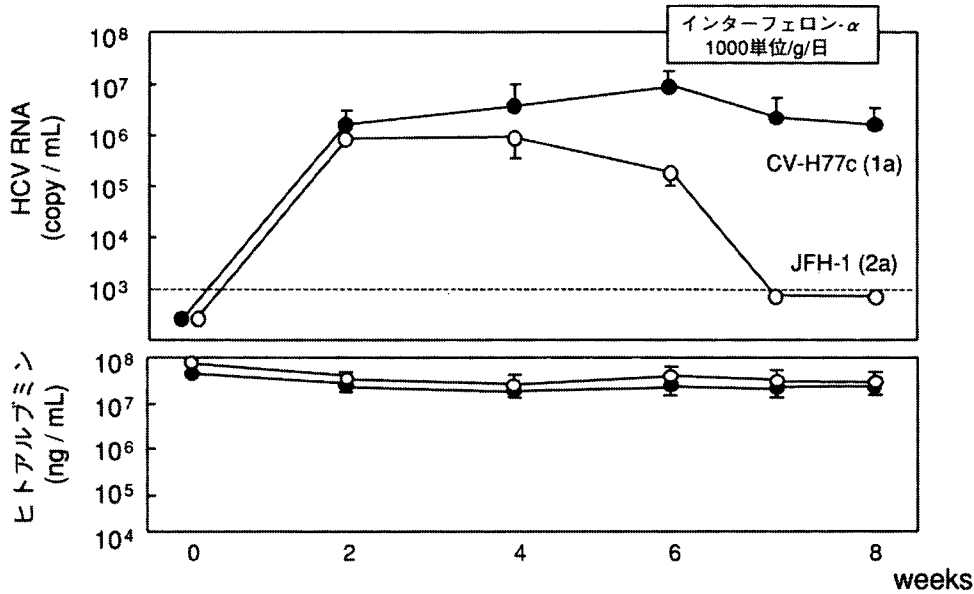


図2 感染性クローンを用いたHCV感染

A. poly(U/UC)の長さでHCV感染

クローン	poly(U/UC) tract (bp)	マウス数		感染率	p=0.013
		感染	非感染		
HCV-KT1	86	1	6	(n=7)	14%
HCV-KT9	115	9	2	(n=11)	82%

B. 1b型クローン投与後のマウス血中HCV RNA

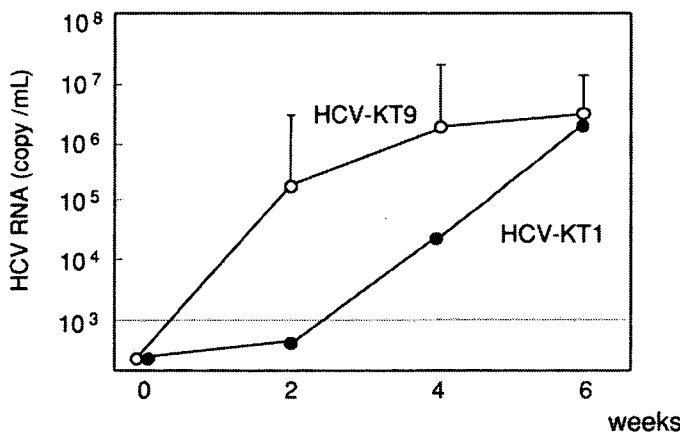


図3 1b型クローンを用いたHCV感染

思われる。

そこでわれわれは genotype 1a型感染性HCVクローンである CV-H77C⁸⁾ (金沢大学, 金子周一先生より供与) および genotype 2a型感染性HCVクローンである JFH-1⁹⁾ (国立感染症研究所, 脇田隆字先生より供与) を用いてマウスへの感染を行った。これら

の cDNA を発現する plasmid より *in vitro* transcription 法にて HCV RNA を合成した。マウスへの genotype 1a 型 HCV の感染は, 合成した CV-H77C の RNA をマウス肝臓内に直接注入して行った。一方, genotype 2a 型の JFH-1 は細胞内で感染性ウイルス粒子を作製することが報告されており⁹⁾, 合成 RNA を electroporation 法にて Huh7 細胞に transfection し, 3 日後の培養上清 500 μ L をマウスに静脈内投与した。いずれの手法においても, すべてのマウスにおいて, 投与 2 週後, 血中 HCV RNA は定量可能となり, 合成 RNA を用いた genotype 1a 型および 2a 型の HCV 感染マウスが作製された (図 2)⁷⁾。これらウイルス感染マウスの血清 10 μ L を naïve なマウスに投与したところ, HCV 感染が確認され, マウス血中に感染性 HCV が含まれていることが確認された。さらに, これらの感染

マウスに 1000 単位/g/日の インターフェロン- α を連日筋注したところ, genotype 1a 型の感染マウスでは, 血中 HCV RNA は投与 1 週後 0.6 log, 投与 2 週後 0.7 log のみの低下であったが, genotype 2a 型の感染マウスでは, 投与 1 週後, すべて感度以下に低下した (図 2 上段)。また インターフェロン投与によっても,

マウス血中ヒトアルブミン値、すなわちヒト肝細胞のキメラ率には変化が無く(図2下段)、HCV RNAの低下はインターフェロンの直接的な抗ウイルス効果であると考えられた。これらの結果より、genotype 1a型は2a型に比べ、インターフェロン抵抗性であることが確認された。

3. Genotype 1b型感染性クローンの樹立およびマウスへの感染

本邦におけるC型肝炎患者の約70%はgenotype 1b型のHCVの感染であり、さらにgenotype 1b型は最もインターフェロン抵抗性であると考えられている。そこでわれわれは独自にgenotype 1b型の感染性HCVクローンを樹立し、マウスへの感染を試みた。Genotype 1b型のHCV感染による重症のC型急性肝炎患者の血清からHCV全長をクローニングした。レプリコン細胞を用いた研究により、HCVの3'非翻訳領域に存在するpoly(U/UC) tractが長いほどウイルスの複製に有利であることが報告されている。

そこでわれわれは同じアミノ酸配列でもpoly(U/UC) tractが115塩基と最も長いクローン(HCV-KT9)と86塩基と最も短いクローン(HCV-KT1)の全長cDNAを作製した。これらのcDNAから合成したHCV RNAをマウス肝臓内へ投与したところ、poly(U/UC) tractの長いHCV-KT9を投与したマウスでは11頭中9頭(82%)で感染が確認された(図3A)、得られたHCVクローンが感染性クローンであることが確認された。一方、poly(U/UC) tractの短いHCV-KT1を投与したマウスでの感染は7頭中1頭(14%)のみであった($P=0.013$)。また興味あることに、HCV-KT9の投与により感染した7頭のマウスは、すべて投与2週後にウイルス血症が確認されたのに対し、HCV-KT1の投与により感染した1頭のマウスは、投与4週後にウイルス血症が確認され、その後の血中HCV RNAの増加も緩やかであった(図3B)。これらの結果から、レプリコンを用いた細胞での結果と同様、生体内においてもpoly(U/UC) tractが長いほど、HCVの感染・複製に有利に働いていることが示唆された。またHCV-KT9に感染したマウスに1000単位/g/日のインターフェロン- α を2週間連日筋注したところ、血中

HCV RNAは1.2 logのみの低下であり、genotype 1b型も2a型に比べインターフェロン抵抗性であることが確認された。

おわりに

ヒト肝細胞キメラマウスは、扱いが簡便であること、HCVの感染・複製がヒト肝細胞内で生じることなどの点より、優れたHCV感染モデルに成りうると思われる。本マウスに合成RNAを投与することにより、種々のgenotype型のHCV感染マウスが作製され、genotype間によるインターフェロンの効果判定も可能であった。同様の手法を用いることにより、種々の変異を組込んだ変異ウイルスに感染したマウスを作製することにより、さらに詳細な検討が可能になると考えられる。今後、ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCVの感染・増殖や薬剤耐性のメカニズムの解明、C型肝炎患者の病態解明、さらには新規抗ウイルス剤の開発などが期待される。

文 献

- 1) Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, *et al.*: Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-941, 1998.
- 2) Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, *et al.*: L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 4498-4503, 2003.
- 3) Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, *et al.*: The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21: 5017-5025, 2002.
- 4) Agnello V, Abel G, Elfahal M, *et al.*: Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 12766-12771, 1999.
- 5) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, *et al.*: Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165: 901-912, 2004.
- 6) Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, *et al.*: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med.* 7: 927-933, 2001.
- 7) Hiraga M, Imamura M, Tsuge T, *et al.*: Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Letts.* 581: 1983-1987, 2007.
- 8) Yanagi M, St Claire M, Shapiro M, *et al.*: Transcripts of a chimeric cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1b are infectious in vivo. *Virology* 244: 161-172, 1998.
- 9) Wakita T, Pietschmann T, Kato T, *et al.*: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 11: 791-796, 2005.
- 10) Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol* 76: 5326-5338, 2002.

Successful Treatment of an Entecavir-Resistant Hepatitis B Virus Variant

Hiromi Yatsuji,^{1,2,3} Nobuhiko Hiraga,^{1,2} Nami Mori,^{1,2} Tsuyoshi Hatakeyama,^{1,2} Masataka Tsuge,^{1,2} Michio Imamura,^{1,2} Shoichi Takahashi,^{1,2} Yoshifumi Fujimoto,² Hidenori Ochi,^{2,4} Hiromi Abe,^{1,4} Toshiro Maekawa,⁴ Fumitaka Suzuki,³ Hiromitsu Kumada,³ and Kazuaki Chayama^{1,2,4*}

¹Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

²Liver Research Project Center, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

³Department of Gastroenterology, Toranomon Hospital, Tokyo, Japan

⁴Laboratory for Liver Disease, SNP Research Center, The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN), Yokohama, Japan

Emergence of a lamivudine (LAM)-resistant hepatitis B virus (HBV) with amino acid substitutions in the YMDD motif is a well-documented problem during long-term LAM therapy. Entecavir (ETV) is a new drug approved for treatment of HBV infection with or without LAM-resistant mutants. This report describes an ETV-resistant strain of HBV, which emerged after prolonged ETV therapy in a patient who did not respond to LAM therapy. Direct sequence analysis of the ETV-resistant strain showed appearance of amino acid substitution rtS202G in the reverse transcriptase (RT) domain, together with rtL180M + M204V substitution that had developed at the emergence of LAM-resistant mutant. In vitro analysis demonstrated that the rtL180M + M204V + S202G mutant strain displayed a 200-fold and a 5-fold reduction in susceptibility to ETV compared with the wild-type and the rtL180M + M204V mutant strain, respectively. Adefovir was effective against the ETV-resistant strain both in vitro and during the clinical course. In conclusion, this study showed that virological and biochemical breakthrough due to ETV could occur in patients infected with LAM-resistant HBV and confirmed that the addition of rtS202G substitution to the rtL180M + M204V mutant strain is responsible for ETV resistance and we could treat the resistant mutant successfully. *J. Med. Virol.* 79:1811–1817, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: HBV; rtS202G; lamivudine; adefovir; in vitro

INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) is a small enveloped DNA virus known to cause chronic hepatitis and often leads to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [Bruix and Llovet, 2003; Ganem and Prince, 2004]. To date, interferon and three nucleoside and nucleotide analogs (lamivudine [LAM], adefovir dipivoxil [ADV], and entecavir [ETV]) have been approved for the treatment of chronic HBV infection. Nucleoside and nucleotide analogues suppress HBV replication in most patients and improve transaminase levels and liver histology [Nevens et al., 1997; Lai et al., 1998; Suzuki et al., 1999]. However, prolonged therapy results in the emergence of drug-resistant mutants.

LAM is associated with a higher rate of emergence of drug-resistant mutants than ADV or ETV, which is 24% and 70% after 1 and 4 years of therapy, respectively, followed by increases in viral load and re-elevation of transaminase levels [Lai et al., 2003]. Most LAM-resistant

Abbreviations used: HBeAg, hepatitis B e antigen; HBsAg, hepatitis B surface antigen; HBV, hepatitis B virus; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; RT, reverse transcriptase

Grant sponsor: Ministry of Education, Sports, Culture, and Technology; Grant sponsor: Ministry of Health, Labor and Welfare.

*Correspondence to: Kazuaki Chayama, Department of Medicine and Molecular Science, Division of Frontier Medical Science, Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima-shi 734-8551, Japan.

E-mail: chayama@hiroshima-u.ac.jp

Accepted 28 June 2007

DOI 10.1002/jmv.20981

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

strains show amino acid substitutions in the YMDD (tyrosine–methionine–aspartate–aspartate) motif in the C domain of HBV polymerase. In addition to the emergence of the YMDD mutation, rtL180M and rtV173L mutations in the B domain of HBV polymerase are frequently observed [Allen et al., 1998; Delaney et al., 2003].

Both in vitro and clinical studies have shown recently that ADV and ETV could suppress both wild-type and LAM-resistant strains and were confirmed as salvage therapy for LAM-refractory patients [Levine et al., 2003; Sherman et al., 2006; Rapti et al., 2007]. However, a few studies have already reported the emergence of resistant mutants to these drugs.

ADV-resistant mutations are infrequent and their appearance is delayed in treatment-naïve patients; mutation occurs at 0% after 1 year and 28% after 5 years and the selection of rtA181V/T or rtN236T mutant was associated with resistance to ADV [Maecellin and Asselah, 2005]. On the other hand, the emergence rate of ADV-resistant mutations in LAM-resistant patients was 18% after 48 weeks of ADV monotherapy [Lee et al., 2006]. A recent study reported patients treated with combination therapy of ADV with LAM did not develop resistance to ADV for 3 years [Rapti et al., 2007].

ETV is the most novel nucleotide analogue of the three drugs and displays greater in vitro potency than LAM or ADV against wild-type HBV. ETV-resistance is reported to be rare in treatment-naïve patients [Colonno et al., 2006]. However, ETV-resistant mutants appeared at 6–9% per year in LAM-refractory patients [Tenney et al., 2004, 2007; Sherman et al., 2006].

In the present study, an ETV-resistant strain of HBV was identified after prolonged ETV therapy in a patient who did not respond to LAM therapy. To our knowledge, this is the first report that breakthrough hepatitis was induced by emergence of an ETV-resistant strain and was successfully treated with ADV. This study checked the importance of amino acid substitutions in the HBV polymerase for resistance to ETV in vitro. Furthermore, the susceptibility of the mutant strain to ADV was analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Antiviral Compounds

LAM [()-β-L-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine] was provided by GlaxoSmithKline (Stevenage, Herts, UK). Adefovir {9-[2-(phosphonomethoxy)ethyl]-adenine} was provided by Gilead Sciences (Foster City, CA), and ETV {2-amino-1,9-dihydro-9-[(1S,3R,4S)-4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-methylenecyclopentyl]-6H-purin-6-one, monohydrate} was provided by Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute (Wallingford, CT).

Analysis of Virological Markers

Hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B e antigen (HBeAg), and antibody against HBeAg (anti-HBe) were determined by enzyme immunoassay kits (Abbot Diagnostics, Chicago, IL). HBV-DNA was measured by real-time PCR using the Light Cycler

(Roche, Mannheim, Germany) by the polymerase chain reaction (PCR). The primers used for amplification were 5'-TTTGGGCATGGACATTGAC-3' and 5'-GGTGAA-CAATGTTCCGGAGAC-3'. The amplification condition included initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec, annealing at 58°C for 5 sec and extension at 72°C for 6 sec. The lower detection limit of this assay was 300 copies.

Cloning of HBV-DNA and Plasmid Construction

HBV-DNA was extracted from 100 μl of serum samples by SMITEST (Genome Science Laboratories, Tokyo, Japan) and was dissolved in 20 μl H₂O. The full-length HBV-DNA was amplified using the above HBV-DNA samples by the method of Gunther et al. [1998]. Nucleotide sequence positions were numbered from the unique *EcoRI* site. The 1.4 genome lengths HBV-DNA amplified from the serum of a patient who showed ETV resistance was cloned into a plasmid vector pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA). In brief, the PCR product amplified using serum from the patient was cleaved with *Bam*HI and *Apa*I (HBV positions 1,400–2,600) and cloned into pcDNA3, which was named pcDNA3-1. Similarly, the PCR product was cleaved with *Apa*I and *Bam*HI (HBV positions 2,600–3,215, 1–1,400) and cloned into pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA), which was named pB-1. The *Kpn*I-*Bam*HI fragment from pB-1 and *Kpn*I-*Apa*I fragment from pcDNA3-1 were cloned into pcDNA3-1. To introduce the nucleotide substitutions into the rtL180M, M204V, and S202G, site-directed mutagenesis was performed using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). Four plasmids with/without amino acid substitutions were created and are listed in Table IV.

Cell Culture, Transfection, and Determination of IC₅₀

HepG2 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) at 37°C under 5% CO₂. Cells were seeded to semi-confluence in 6-well tissue culture plates. Transient transfection of the plasmids into HepG2 cell lines was performed using TransIT-LT1 (Mirus, Madison, WI) according to the instructions provided by the supplier. To determine 50% inhibitory concentrations (IC₅₀s) for each anti-viral drug, various concentrations of LAM, ADV, and ETV were added after 24 hr to the culture plate containing the cells, and harvested after 5 days. The medium containing the drugs was changed at days 1, 3, and 4. All experiments were performed in triplicate. GraphPad prism (GraphPad Prism Software, Inc., San Diego, CA) was used to determine the best-fit values for individual dose–response equations.

Analysis of Replicative Intermediate of HBV by Quantitation

The cells were harvested at 5 days after transfection and lysed with 250 μl of lysis buffer (10 mM Tris-HCl [pH