

で低下していた。いずれの BILN206 添加の場合も細胞 total RNA 量の低下は認められなかったことから、少なくとも 100 nM 以下では細胞傷害性を示さないと判断した。

次に、薬剤耐性ウイルスが出現するかどうかを調べるため、BILN2061 100 nM を HCV 持続感染細胞に添加し継代を継続した。継代毎 (3-5 日毎) に BILN2061 を加え、また細胞を一部回収し HCV RNA を測定した。BILN2061 添加細胞の HCV RNA レベルは、添加開始後 3 週間の時点では非添加細胞の 1% 未満であったが、その後経時的に上昇し BILN2061 添加 82 日以降では非添加細胞と同レベルとなった。

この結果より、BILN2061 の長期間処理によって耐性ウイルスが出現した可能性が考えられた。そこで、BILN2061 添加 87 日目の感染細胞中の HCV 遺伝子配列 (NS3-NS5B 領域) の解析を行ったところ、NS3 領域内に 2 カ所アミノ酸配列が変化する置換変異が同定された。すなわち、71 番目バリンからアラニンへ (V71A)、122 番目リジンからアルギニンへ (K122R) の変異が見出された。

そこで、これらの変異が耐性獲得に関与しているかを明らかにするため、V71A、K122R それぞれまたは両方の変異を導入した JFH-1 ゲノム cDNA を構築し、合成 RNA から各変異 HCV

(JFH1V71A, JFH1K122R, JFH1V71AK122R) を作出した。変異型また野生型ウイルスをそれぞれ感染させた細胞に BILN2061 を 25-100 nM で添加した後 3 日間培養し細胞内 HCV RNA を測定した。その結果、各 BILN2061 濃度とも JFHV71AK122R 感染細胞では BILN2061 の抗 HCV 活性が顕著に低下することが示された。100 nM BILN2061 の添加における変異 HCV 感染細胞の HCV RNA レベルは、野生型 JFH-1 感染細胞に比べ JFH1V71A、JFH1K122R、JFH1V71AK122R でそれぞれ約 2 倍、4 倍、及び 7 倍であった (Fig. 1)。V71A、K122R とも BILN2061 に対する感受性の低下に寄与し、両変異は相加的に働く可能性が示唆された。

D. 考察

現行のインターフェロン・リバビリン療法とは作用機序が異なり、より HCV 選択的な抗 HCV 活性を有する治療薬として、HCV NS3 セリンプロテアーゼまた NS5B ポリメラーゼに対する阻害剤の開発が進んでいる。BILN2061 は臨床試験レベルで初めて C 型肝炎治療効果を実証したプロテアーゼ阻害剤である。副作用のため第二相試験でドロップアウトしているが、作用機序の近似した化合物の開発は精力的に行われており、実際に VX950、SCH503034 は有望な治療薬候補である。これらのプロテアーゼ阻害剤に対する耐性獲得に関与する HCV 変異の解析は主に genotype 1 のサブゲノムレプリコンを用いて行われてきた。感染細胞系また他の genotype を用いた研究は報告されていない。

本研究で初めて HCV 持続感染細胞系が薬剤耐性ウイルスの解析に有用であることが示され、プロテアーゼ阻害剤に対する耐性獲得に関与する新たなアミノ酸変異が同定された。

NS3 領域のアミノ酸 71、122 番についてデータベースに登録されている genotype 1a、1b、2a、2b クロウンを比較した (Table 1)。その結果、アミノ酸 71 番目は genotype 1a、2a、2b でバリンが、genotype 1b ではイソロイシンがそれぞれドミナントであった。またアミノ酸 122 番目は、genotype 1a、1b ではセリンが、genotype 2a ではリジンが、genotype 2b ではアルギニンがそれぞれドミナントであった。K122R は genotype 2a 選択的な変異、V71A は他の genotype でも生じ得ることが示唆された。また、genotype 2b のうち 8.7% の population ではアミノ酸 71、122 番はそれぞれアラニン、アルギニンであることから、genotype 2b 感染者にはプロテアーゼ阻害剤に対して感受性の異なる集団が存在する可能性が示された。

E. 結論

HCV 持続感染細胞系を利用して HCV プロテアーゼ阻害剤に対する耐性獲得に関与する新たなアミノ酸変異を同定した。

F. 研究発表

論文発表

1. Hara, H., Aizaki, H., Matsuda, M., Shinkai-Ouchi, F., Inoue, Y., Murakami, K., Shoji, I., Kawakami, H., Matsuura, Y., Lai, M.M.C., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Involvement of creatine kinase B in hepatitis C virus genome replication through interaction with the viral NS4A protein. *J. Virol.* (in press).
2. Shimoji, T., Murakami, K., Sugiyama, Y., Matsuda, M., Inubushi, S., Nasu, J., Shirakura, M., Suzuki, T., Wakita, T., Kishino, T., Hotta, H., Miyamura, T., Shoji, I. Identification of Annexin A1 as a novel substrate for EGAP-mediated ubiquitylation. *J. Cell. Biochem.* (in press).
3. Suzuki, R., Moriishi, K., Fukuda, K., Shirakura, M., Ishii, K., Wakita, T., Miyamura, T., Matsuura, Y., Suzuki, T. Proteasomal turnover of hepatitis C virus core protein is regulated by two distinct mechanisms: ubiquitin-dependent and ubiquitin-independent but PA28gamma-dependent. *J. Virol.* 83: 2389-2392 (2009).
4. Nitahara-Kasahara Y, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Sato S, Suzuki T, Murakami K, Wakita T, Hanada K, Miyamura T, Nishijima M. Cellular vimentin content regulates the protein level of Hepatitis C virus core protein and the Hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology* 383: 319-327 (2008)
5. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 747-751 (2008).
6. Masaki, T., Suzuki, R., Murakami, K., Aizaki, H., Ishii, K., Murayama, A., Date, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Interaction of hepatitis C virus nonstructural protein 5A with core protein is critical for the production of infectious virus production. *J. Virol.* 82: 7964-7976 (2008).
7. Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, SS., Bin, Z., Li, J., Shirakura, M., Morikawa, K., Suzuki, R., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 446-450 (2008).
8. Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 82: 5715-5724 (2008).
9. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C

- virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82: 8349-8361 (2008).
10. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82: 3480-3489 (2008).
 11. Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 82: 2631-2641 (2008).
 12. Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., Suzuki, T. Identification and characterization of the human inhibitor of caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis.* 13: 929-937 (2008).
 13. Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., Shoji, I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J. Gen. Virol.* 89: 1587-1592 (2008).
 14. Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.S., 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.* 148: 174-181 (2008).
- G. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

Fig. 1 Identification of HCV JFH-1 mutations conferring reduced susceptibility to BILN-2061

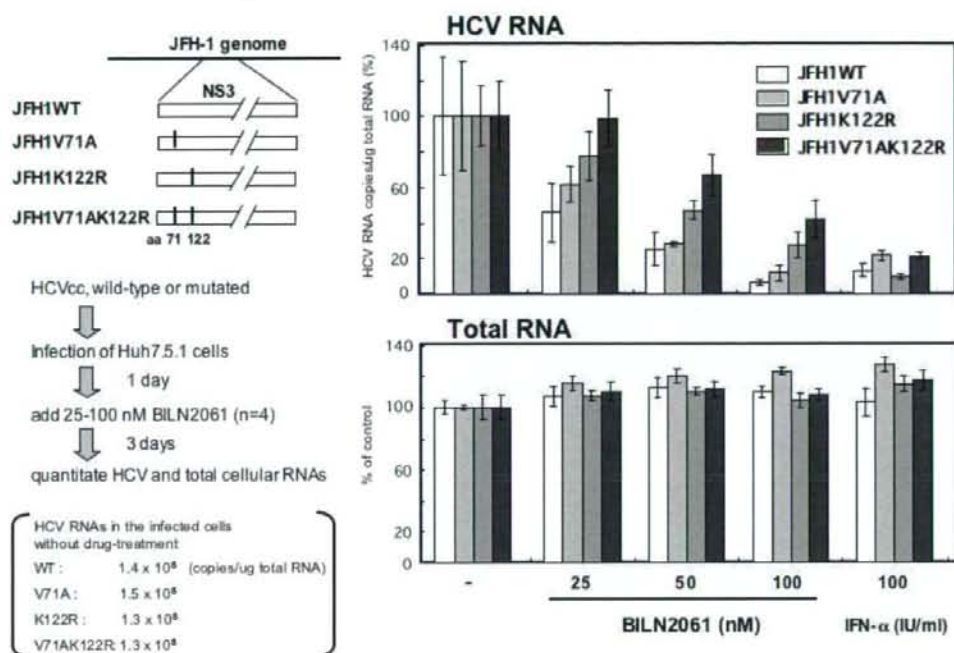


Table 1 Comparison of amino acid residues at 71 and 122 in NS3 of HCV genotype 1 and 2

Genotype (No of clones)	aa 71			aa 122						
	Val	Ile	Ala	Ser	Lys	Arg	Gly	Asn	Thr	Cys
1a (213)	99.5%	0	0.5%	94.4%	0	0	5.6%	0	0	0
1b (405)	9.1%	90.1%	0	86.2%	0	0	6.9%	3%	3.7%	0.3%
2a (23)	95.7%	4.3%	0	4.3%	95.7%	0	0	0	0	0
2b (23)	91.3%	0	8.7%	0	0	100%	0	0	0	0

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。さらに NS3-4A protease inhibitor である Telaprevir の治療成績についても検討を行った。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症例とアデフォビル併用療法を行った282例。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例とTelaprevir (MP-424)とPEG-IFN+RBV併用療法を施行した20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、Invader assayにて全例が検出され従来の測定法よりも早期に検出可能であった。ラミブジン耐性ウイルスに対するアデフォビル併用療法における耐性ウイルスの検討では、5例(2%)で耐性ウイルスの出現が認められた。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、などであった。またNVRにおいてもCore領域のアミノ酸置換は重要な因子であった。さらにTelaprevir (MP-424)とPEG-IFN+RBV併用療法は現在最も効果が期待される治療薬と考えられる。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。

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。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。このうちラミブジン耐性ウイルスに対するアデフォビル併用療法とエンテカビル使用例での耐性ウイルス出現に関して検

討した。さらにこれら耐性ウイルスのパターンを検討し、簡易的な測定法である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およびNVRに関係する因子を検討した。さらに、新たな治療薬であるプロテアーゼ阻害剤の成績とウイルス側因子についても検討した。

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。さらに現在ラミブジン耐性ウイルスに対して使用されているアデフォビル併用療法の効果と両剤に対する耐性ウイルス出現に関して検討した。症例の内訳は282例、男:女=232:50、年齢26-78歳(中央値47歳)、投与期間24-274週(中央値95週)、Genotype A:B:C:D=9:15:231:2、HBe抗原陽性:陰性=167:105、治療開始時のALT 12-1563 IU/L(中央値106)、HBV DNA <2.6-7.6< Log copies/mL(中央値7.0)であった。

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 $5.4-33.1 \times 10^4 / \mu\text{L}$ (中央値16.5)であった。これらの症例でSVR(完全著効)、NVR(null response)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。またTelaprevir(MP-424)とPEG-IFN+RBV併用療法12週間投与を施行した20例について検討した。対象は男:女=10:10、年齢36-64歳(中央値54歳)、治療開始時のALT 26-167 IU/L(中央値50)、Albumin 3.7-4.6 g/dL(中央値4.2)、Hb 12.1-16.8(中央値14.2)、血小板 $10.2-26.3 \times 10^4 / \mu\text{L}$ (中央値16.3)、HCV RNA量5.5-7.2 Log IU/mL(中央値6.8)であった。

(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係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。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) ラミブジン耐性ウイルスに対するアデフォビル併用療法における耐性ウイルスの検出

併用療法の治療効果は高く、HBV DNAのAmplicor法での陰性化率は1年目57%、2年目75%、3年目81%、4年目84%であった。両剤併用療法における耐性ウイルス出現例は5例であり、ADV併用開始前から認められた症例は3例、併用後に認められた症例が2例であった。全体からの出現率は2%であった。変異のtypeはいずれもrt181の変異を伴っていた。(rtA181Sが2例、rt181Tが3例であった。)

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

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。NVRに寄与する因子を多変量解析すると、 γ GTP(>109; $P=0.003$)、性別(女性; $P=0.003$)、AFP(>11; $P=0.021$)、Core領域ア

ミノ酸置換(double-mutant type; $P=0.021$)、LDL cholesterol (<86; $P=0.032$)であった。

(4) Telaprevir (MP-424)と PEG-IFN+RBV 併用療法 12 週間投与

治療例の内訳は、naïve 例 10 例、IFN 無効例 6 例、PEG-RBV 無効例(null)4 例であった。経時的な HCV RNA の陰性化率は、2 週目 50%、4 週目 79%、8 週目 94%、12 週目 100%であった。Core 領域の置換(aa70, aa91)が double-wild の場合(10 例)とそれ以外の non-double-wild の場合(10 例)で開始時 2 週目までのウイルス量の低下を比較すると double-wild でやや低下量が多かった。2 週目での HCV RNA の陰性化率は double-wild 60%、non-double-wild 40%であった。投与終了後 12 週目の判定では、naïve 例 10 例中 8 例で陰性、IFN 治療例のある 10 例では 2 例が陰性である。

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が、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。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。またラミブジン耐性ウイルスに対するアデフォビル併用療法における耐性ウイルスの検討では、少数例ながら耐性ウイルスの出現が認められた。この場合の耐性ウイルスは rtA181S/T が主体となっていた。今回我々は Invader assay を用いた測定系を作成しエンテカビルおよびアデフォ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としての ISDR と HCV core 領域の 70 番目と 91 番目のアミノ酸置換は 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重要な因子となっている。また NVR においても Core 領域のアミノ酸置換は重要な因子であった。また Telaprevir (MP-424)と PEG-IFN+RBV 併用療法 12 週間投与の抗ウイルス効果は高く特に naïve 例では中止例を含めても陰性化が持続している症例が多い。また Core 領域のアミノ酸置換との関係でも double-wild の方がウイルス量の低下がより得られていた。

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。エンテカビルおよびラミブジンやアデフォビルによる耐性ウイルス検出も可能である。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。さらに新たな治療薬である Telaprevir (MP-424)と PEG-IFN+RBV 併用療法は現在最も効果が期待される治療薬と考えられる。

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

Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, et al. Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy: Two-year follow-up. *Journal of Hepatology*, 48;

923-931, 2008.

2.学会発表

鈴木 文孝、熊田 博光。

ワークショップ8:B 型慢性肝炎の治療成績と治療戦略、第94回日本消化器病学会総会、福岡、2008.5.10.

鈴木 文孝、芥田 憲夫、熊田 博光。

シンポジウム 1:C型慢性肝炎に対するPEG-IFNとRibavirin併用療法の治療成績と難治例の解析、第44回日本肝臓学会総

会、東京、2008.6.5.

鈴木 文孝、芥田 憲夫、熊田 博光。

シンポジウム 14:C 型慢性肝炎に対するNS3-4A protease inhibitor (Telaprevir;MP-424)の治療成績、第12回日本肝臓学会大会、JDDW、東京、2008.10.2.

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。

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、IFN 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

IFN 発現応答の抑制蛋白として NS34A 以外に NS4B が同定され、N 末端の関与が示唆された。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 NS34A 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とは新規クラスの抗ウイルス療法剤の開発につながることが期待される。また、今回同定された 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ことで、今後 IFN 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と思われる。

G. 研究発表**1. 論文発表**

1. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Nishimura-Sakurai Y, Chen CH, Suda G, Mishima K, Onuki Y, Yamamoto M, Maekawa S, Enomoto N, Kanai T, Tsuchiya K, Watanabe M: Two flavonoids extracts from a herb, *Glycyrrhizae radix*, inhibit *in-vitro* hepatitis C virus replication. *Hepatology Res*, 2009; 39:60-9
2. Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, Saito K, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka M, Sakurai Y, Chen CH, Yano M, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Maekawa S, Enomoto N, Kohara M, Watanabe M: Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastro Hepatol* 2008; 23:1437-1447.
3. Sekine-Osajima Y, Sakamoto N, Nakagawa M, Itsui 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.

4. 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 2008;42: 29-34

5. 中川美奈、坂本直哉、渡辺守: 新規治療法 from cyclosporine to DEBIO: 肝胆膵 特大大号 57: 1057-1065 2008

2. 学会発表

1. 第94回日本消化器病学会総会パネルディスカッション、高齢者C型慢性肝炎に対する治療法の選択、2008年5月、消化器病2009; in press
2. 第43回日本肝臓学会総会シンポジウム、ウイルス因子からみたC型慢性肝炎の治療前効果予測、2008年6月5日
3. 第12回日本肝臓学会大会ポスター (JDDW)、高齢者C型慢性肝炎に対する治療法の最適化、2008年10月1日
4. 第37回日本肝臓学会東部会シンポジウム、HCV コアおよび NS5A 変異からみた PEG インターフェロン治療の効果予測、2008年12月4日

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 東京大学医科学研究所疾患制御ゲノム医学ユニット
特任准教授

研究要旨

- 1) Real-time PCR 法による HBV 多剤耐性変異 M204I/V の高感度検出法を開発し報告した。
2) 組込由来 Fusion HBx による新たな肝発癌メカニズムを提唱した。
2. Real-time PCR 法による治療抵抗性 C 型肝炎ウイルスのウイルス側要因としてのコア第 70 番目アミノ酸変異の高感度定量法を開発した。

A. 研究目的

- 1) B 型肝炎の治療に用いられる核酸アナログは高率に耐性株を生じることが最大の問題となっており、高感度で迅速な耐性株検出法の開発が急務である。本研究では Taqman Minor Groove Binding (MGB) probe を応用し、real-time PCR 法により、核酸アナログ多剤耐性変異である M204V/I 耐性株を迅速かつ定量的に検出する方法を確立することを目的とした。2) HBV による発癌メカニズムとして、HBx の寄与が報告されているが、HBx を大量発現している若年 HBV キャリアでの発癌がほとんど認められないことから、いまだ HBx による発癌メカニズムは不明である。そこで、我々は、組込 HBV DNA 由来でヒト蛋白と融合している Fusion HBx が発癌に寄与しているのではないかと仮定を立て、それを検証する。

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ウイルス側因子として、コア第 70 番目アミノ酸(aa70)の重要性が認識されつつある。すなわち、野生型 (Arg) を有する患者では、変異型 (Gln) を有する患者より SVR 率が高いことが知られている。そこで、Taqman MGB Probe を応用し、real-time PCR 法により、コア aa70 アミノ酸変異を高感度に定量する系を確立し、それぞれのインターフェロン治療中の動態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) HBV 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 real-time PCR 系を確立する。また、実際の患者血清を用いて、M204V/I 変異の高感度検出を行う。2) HBV DNA の組込を有する HepG3 肝癌

細胞を用い、HBV DNA 組込を同定、組込部位より転写される Fusion mRNA を同定、siRNA による Fusion mRNA のノックダウン Hep3B 細胞を樹立し、その細胞増殖、浸潤能、癌化につき検討する。

2. HCV コア aa70 の Arg→Gln 変異を高感度に検出する系を plasmid を鋳型として検証し、確立する。野生型 (Arg) および変異型 (Gln) の両者を有するペグインターフェロン+リバビリン治療を受けた C 型慢性肝炎患者での野生型および変異型の動態につき解析する。

C. 研究結果

1. 1) HBV 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%、また M204I の検出感度は 50 コピー、10%であった。実際にラミブジン治療を行っている患者血清を用いて検討し、高感度に少量の M204I/V 変異を検出し得た。2) Hep3B において全長 2830 bp の 3' 端のかけた X 遺伝子を含む HBV DNA 組込を同定した。また、組込 HBV DNA より転写される全長 3725 bp の Fusion mRNA を同定した。3' 端には 1877 bp のヒト由来塩基配列があった。次に、siRNA により Fusion mRNA 発現をノックダウンした。ノックダウン細胞では、細胞増殖と浸潤能が低下していた。NIH3T3 を用いた解析により、Fusion HBx が HBx にはない癌化能を有することが明らかとなった。
2. HCV コア aa70 変異の高感度定量法を開発した。野生型 MGB probe の検出感度は 5 コピー中の 50%、50 コピー中では 10%、変異型 MGB probe の検出感度は

5 コピー中の 50%、50 コピー中では 10% であった。野生型と変異型の両者を有する患者において、その治療中の動態を解析したところ、ペグインターフェロン+リバビリン治療により、野生型、変異型の両者共に減少したが、減少率は野生型に対し、変異型でより大きく、変異型 HCV がペグインターフェロン+リバビリン治療により耐性であるという結論は得られなかった。

D. 考察

1. 1) Taqman MGF プローブを用いて HBV 多剤耐性変異 M204V/I を高感度に検出可能となったことにより、核酸アナログ耐性株の早期検出が可能となった。核酸アナログ併用療法などへの変更を迅速に判断できるようになると期待される。2) 組込 HBV DNA 由来の Fusion HBx が肝発癌に寄与していることが明らかとなった。Fusion HBx をターゲットとした新たな治療戦略の展開が期待される。
2. ペグインターフェロン+リバビリン治療に抵抗性と考えられるコア aa70 変異型を有する患者でも、コア aa70 変異型 HCV 自体のペグインターフェロン+リバビリン治療感受性は野生型と同等と考えられた。治療抵抗性機序のさらなる解明が必要である。

E. 結論

1. Taqman MGB プローブを用いて、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。また、組込由来の Fusion HBx が発癌に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

2. Taqman MGB probe を用いた HCV コア aa70 の高感度定量法を開発した.

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sermasathanasawadi R, Kato N, Muroyama R, Dharel N, Shao R-X, Chang J-H, Li C-Z, Kawabe T, Omata M. Association of IRF-7 gene polymorphism with liver cirrhosis in chronic hepatitis C patients. *Liver Int* 2008; 28: 798-806

2) Hua R, Tanaka Y, Fukai K, Tada M, Seto M, Asaoka Y, Ohta M, Goto T, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M. Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using TaqMan-minor groove binder probes. *Clinica Chimica Acta* 2008; 395: 151-154

3) 加藤直也, 小俣政男. B型慢性肝炎の治療. *からだの科学* 2008; 258: 114-118

2. 学会発表

1) Kato N. HCC susceptibility genes in patients with hepatitis C. Hong Kong Cancer Institute/AACR International Conference in conjunction with the State Key Laboratory in Oncology in South China, The Chinese University of Hong Kong. Infection and Cancer: Biology, Therapeutics, and Prevention. 2008/12/5-7. Hong Kong SAR, China

2) Kato N. Hepatitis C virus and innate immunity. 1st Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE. 2009/2/10. Tokyo,

Japan

3) 加藤直也, 常 金海, 小俣政男. C型肝炎ウイルス増殖と病態を規定するインターフェロン関連分子とその多型. 第 94 回日本消化器病学会総会. 2008/5/8. 福岡

4) 室山良介, 加藤直也, 大塚基之, 常金海, 川邊隆夫, 小俣政男. HBV-DNA組み込み由来のFusion蛋白は肝発癌および進展に関連する. 第 44 回日本肝臓学会総会. 2008/6/5. 松山

5) 常金海, 加藤直也, 室山良介, 川邊隆夫, 小俣政男. C型肝炎ウイルスに対するMxAの増殖抑制効果. 第 44 回日本肝臓学会総会. 2008/6/5. 松山

6) 加藤直也, 山田尚弘, 小俣政男. 創薬のターゲットとなるC型肝炎ウイルスNS5Aと結合する宿主蛋白の同定. 第 12 回日本肝臓学会大会. 2008/10/2. 東京

7) 室山良介, 加藤直也, 小俣政男. 組込みB型肝炎ウイルス由来のHBxによる新しい肝発癌メカニズムの提唱とその検証. 第 12 回日本肝臓学会大会. 2008/10/2. 東京

8) 常 金海, 加藤直也, 小俣政男. C型肝炎ウイルス増殖を規定するインターフェロン誘導遺伝子. 第 12 回日本肝臓学会大会. 2008/10/2. 東京

9) 室山良介, 加藤直也, 小俣政男. 組込みHBVより転写・翻訳されるfusion HBxは肝発癌および進展に関連する. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008/10/29. 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

インターフェロン耐性 HCV の分子機構に関する研究

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨: C 型肝炎ウイルス(HCV)がインターフェロン(IFN)に耐性を示す分子機構を解明することを目的とした。今年度も昨年度に引き続き遺伝子型 1b で O 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞について樹立時と2年間培養後における HCV 遺伝子動態比較と IFN 感受性比較を行い以下に示すような新たな結果を得た。(1) HCV RNA の遺伝的変異速度は RNA 複製に必須な領域である非構造タンパク質領域では低く、それ以外では高まっていることを明らかにした。(2) 長期培養により HCV RNA の GC 含量が増加することを明らかにした。(3) 長期培養により IFN に抵抗性を示すようになった全長 HCV RNA 複製細胞内の HCV と IFN 未処理の全長 HCV RNA 複製細胞内の HCV の遺伝子解析(非構造タンパク質領域)を行い相互に比較した。その結果、IFN 抵抗性を示す細胞から得られた HCV ゲノムは、遺伝的系統樹内で一つのクラスターを形成することが分かった。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)の感染は肝がん患者の8割に認められており、HCV の持続感染状態である C 型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子である。肝発がんを予防するためには、HCV を体内から排除して持続感染状態を脱することが必須である。しかしながら、C 型慢性肝炎に対する有効な治療薬はインターフェロン(IFN)しかなく、ペグ IFN とリバビリンとの併用療法により半数は治癒するようになったが、依然として残りの半数は現行治療に耐性を示す。本研究では、HCV がどのような分子機構により IFN 耐性を示すのかを明らかにすることを目的として、我々が近年開発して様々な研究に用いている全長 HCV RNA 複製細胞(遺伝子型 1b の O 株)を用いて昨年に引き続き以下に示すような実験を行った。

B. 研究方法

(1) 昨年度塩基配列を決定した HCV ゲノム情報を用いた比較解析

5種類の全長 HCV RNA 複製細胞(O, OA, OB, OD および OE)の樹立時、1年培養時および2年培養時における HCV ゲノムの塩基配列(昨年度決定)を用いて昨年度検討していなかった項目(領域ごとの変異速度、GC 含量変化および遺伝的多様性)について詳細に比較検討した。

(2) IFN 感受性の変化と HCV ゲノム情報との比較解析

2年間継代培養した全長 HCV RNA 複製細胞である O2 細胞を 10 cm のデッシュにそれぞれ 2×10^4 個播き、IFN- α (50 IU/ml)を4日ごとに添加する群と IFN- α を添加しない群に分け、G418 存在下、約3週間培養した。3週間後に G418 耐性として増えた細胞については、一部を Coomassie brilliant blue (CBB) により染色し、残りについてはそれぞれの群で得られた細胞をプールし、HCV の遺伝子解析に使用した。

HCV の遺伝子解析については、まず細胞より RNeasy extraction kit (Invitrogen)に

て Total RNA を抽出した。得られた RNA を用いて RT-PCR 法を用いて HCV ゲノムの非構造領域 (NS) 6kb を増幅した。cDNA の作成には Primscript (Takara) を用い、PCR には fidelity の高い KOD-plus DNA polymerase を用いた。増幅した 6 kb の DNA 断片を pBR322MS ベクターにクローニングして、それぞれ独立的に得られた 10 クローン の塩基配列の決定を行った。得られた塩基配列を相互に比較し、GENETYX-MAC プログラムを用いた Neighbor-joining 法による系統樹解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのため倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究成果

(1) 昨年度塩基配列を決定した HCV ゲノム情報を用いた比較解析

5種類 の全長 HCV RNA 複製細胞 (O, OA, OB, OD および OE) から得られた全長 HCV RNA の塩基配列 (それぞれ 3 クローン) を 5' 末端から EMCV-IRES までの領域 (1938 ヌクレオチド)、Core から NS2 領域 (3078 ヌクレオチド) および NS3 から NS5B 領域 (5955 ヌクレオチド) の 3 領域に分けて変異速度を算定した。その結果、NS3 から NS5B 領域の変異速度は 1 年および 2 年培養時においても 5 種類の細胞においてほぼ一定の値 (約 3×10^{-3} 置換/ヌクレオチド/年) となり、他の領域における変異速度と比較するとほぼ半分であることが分かっ

た。また、この遺伝子解析において HCV ゲノムにおける GC 含量が培養時間に依存してわずかではあるが上昇していくことを見出した。最初に細胞に導入された HCV RNA (GC 含量 58.63%) と比較すると例外なく、GC 含量が増加しており、どの細胞においても 1 年培養で 58.80% 前後に、2 年培養で 59.00% 前後に増加してくることが分かった。しかしながら、それぞれの時期で得られた 3 クローン間における遺伝的多様性については、OA 細胞や OD 細胞では時間依存性に増大することが観察されたが、O 細胞、OB 細胞および OE 細胞では頭打ちになるか 2 年目ではかえって 1 年目より小さくなるという現象が観察された。2 年間の培養において HCV クローン間で生じる遺伝的多様性は 0.64% から 1.05% 程度の範囲の中にあることが分かった。

(2) IFN 感受性の変化と HCV ゲノム情報との比較解析

昨年度、長期に培養した細胞は樹立時の細胞と比較すると細胞内における HCV RNA の複製が IFN 抵抗性になる頻度が高まることを 5 種類の全長 HCV RNA 複製細胞を用いて明らかにした。今年度は、そのメカニズムを明らかにすることを目的として、実際に IFN 抵抗性を示す細胞内に存在する HCV RNA の塩基配列を決定して IFN 感受性である細胞樹立時における細胞内 HCV との比較を行うことを計画した。5 種類の全長 HCV RNA 複製細胞のうち、最も詳細にその性状が調べられている O2 細胞 (O 細胞を 2 年間培養した細胞) を選択した。O2 細胞に IFN- α (50 IU/ml) を 4 日置きに添加しながら 3 週間培養して IFN 抵抗性細胞を得ようとする群 (以後 O2r 細胞と呼ぶ)

と IFN- α を添加しないで3週間培養する細胞群(以後 O2 細胞と呼ぶ)の2つに分けた。O2r 細胞群(20000 個/プレート)からは IFN- α 添加を始めて3週間後にプレート当たり約 100 個程度の G418 耐性コロニーが得られ、昨年度の実験結果の再現性がよいことを確認した。O2 細胞群の方は、培養3週間後にはプレート上に一杯になった。

O2 細胞と O2r 細胞から得られた HCV RNA について NS3-NS5B 領域 (6 kb) の塩基配列をそれぞれの細胞由来の10クローンについて決定し、それらについて相互に比較検討を行った。

当初期待したような、IFN 抵抗性の O2r 細胞由来の HCV RNA から特異的なアミノ酸置換 (10クローンとも共通して O2 細胞のものとは異なるという意味) が得られることはなかった。しかしながら、O2 細胞由来の10クローンと O2 細胞由来の10クローンを合わせて Neighbor-joining 法による系統樹解析を行うと、NS3-5B 領域全体において、ヌクレオチドおよびアミノ酸レベルの両方で、O2r 細胞由来の HCV クローンが1つのクラスターを形成するようになることがわかった。そこで、NS 領域のどの部分がこの現象に寄与しているのかをそれぞれの領域ごとに同様の手法により解析したところ、NS5A 領域が NS3-5B 領域で認められたクラスター形成という現象に大きく寄与していることが分かった。NS5A 領域をさらに詳しく調べた結果、C 型肝炎患者の治療予測に有効とされている IFN 感受性規定領域 (ISDR) (aa2209-2248) では O2 細胞と O2r 細胞由来の HCV クローン間でアミノ酸配列に違いがなかったが、その下流で最近治療予測に使えるのではないかと提唱さ

れている IRRDR 領域(aa2334-2379)で O2r 細胞由来の HCV クローンがかなり均一化していることが分かった。

O2 細胞および O2r 細胞から得られた個々の HCV クローンが O2 と O2r 細胞内の HCV 集団から遺伝的にどの程度離れているかを調べた結果においても、O2 細胞から得られた HCV クローンではかなりのばらつきがあったが、O2r 細胞から得られた HCV クローンは遺伝的にもかなり均一化していることが認められた。

D. 考察

(1) 昨年度塩基配列を決定した HCV ゲノム情報を用いた比較解析

HCV RNA の複製を2年間継続させた場合、HCV RNA に変異が蓄積していく様子やその変異速度は予想の範囲内であったが、ウイルスゲノムの GC 含量が経時的に増加していく現象は予想外であった。HCV ゲノム上で G 或は C が40個程度増加することから、HCV ゲノムの2次構造上 GC ペアの新たな出現でエネルギー的にも安定化するように作用している可能性がある。しかしながら、この現象は一時的なものである可能性もあるので、さらに時間が経過した場合にどのような推移をたどるのかを検討する必要がある。

遺伝的多様性については、これまでの HCV レプリコンの解析結果などから、免疫学的プレッシャーのない培養細胞を用いた解析では、培養時間に依存して増加の一途をたどるのではないかと思われていた。しかしながら、5種類の細胞のうち2種類では確かに2年目まで遺伝的多様性の増大が認められたが、1種類では2年目で頭打

ちになり、残りの2種類では逆に2年目では1年目よりクローン間の遺伝的多様性が減少するというまちまちの結果となった。この事は、培養細胞においでも何らかの遺伝的プレッシャーにより、ある程度の均一性を保ちつつ一定の変異速度のもとRNA複製が行われていることを物語っているものと考えられる。

本研究においては、ヒト肝癌細胞株 HuH-7 由来の細胞を用いた解析結果であることから、非常に特殊な環境下での HCV RNA の変異解析となっている可能性がある。特に HuH-7 細胞においては HCV に限らず、遺伝子変異が入りやすい細胞であることが分かっていることから、違う環境下での変異速度解析も必要である。

最近、我々は、HuH-7細胞とは異なるヒト肝癌細胞株 Li23 を用いて、全長 HCV RNA 複製細胞株を複数樹立することに成功した。現在、HuH-7 細胞の場合と同じく、長期培養を開始しており、HuH-7 由来の細胞で認められた HCV の遺伝的変異が Li23 由来の細胞においても同じように起こってくるものなのかどうかを今後検証していく予定である。

(2) IFN 感受性の変化と HCV ゲノム情報との比較解析

2年間の培養により HCV RNA の塩基配列は最初に細胞内に導入した HCV RNA のものとは 0.77% から 1.39% 異なってくることをこれまでの遺伝子解析により明らかにしている。従って、本研究で得られた IFN に抵抗性を示す O2r 細胞内で複製している HCV RNA の塩基配列に興味を持たれた。解析の結果、O2r 細胞内から得られた HCV RNA は最初に導入した HCV RNA と

比較すると2年培養したことによる変異率(平均1%)を保っていたが、解析した NS 領域については HCV クローン間でかなり均一化していることが分かった。この結果は、HCV RNA というより O2r 細胞が均一化している可能性も考えられることから、O2 細胞や O2r 細胞から HCV RNA を排除したいいわゆる治療細胞を作成して IFN- α のシグナル伝達における効率に違いがないかどうかを調べる必要がある。それと並行して今回の解析では行っていない HCV RNA の前半部(5kb)についても遺伝子解析を今後行う予定である。さらに、O2 細胞や O2r 細胞から total RNA (HCV RNA が含まれている)を抽出して、O2 や O2r の治療細胞に導入することにより再度全長 HCV RNA 複製細胞を作成して、それらの IFN 感受性に差が出るかどうかの検討も今後必要である。これらの実験により HCV RNA の多様性がどの程度、IFN 感受性に影響を与えるかについての回答がある程度得られるのではないと思われる。

E. 結論

全長 HCV RNA 複製細胞の長期培養により HCV の遺伝的変異が蓄積し、IFN- α 抵抗性になる頻度が高くなるという現象の再現性を確認した。IFN- α 抵抗性細胞由来の HCV は親細胞由来の HCV と比較すると遺伝的系統樹のなかで1つのクラスターを形成することが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. Arch. Virol. 154:77-85(2009).
- 2) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors Ataxia-Telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. J. Virol. 82:9639-9646 (2008). J. Virol. 82, 9305 (2008) spotlight
- 3) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N. A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. Virus Res. 137:72-79 (2008).
- 4) Mori K, Abe KI, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. Biochem Biophys Res Commun. 371:104-109 (2008).
- 5) Ando M, Korenaga M, Hino K, Ikeda M, Kato N, Nishina S, Hidaka I, Sakaida I. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. Liver Int. 28:1158-1166 (2008).
- 6) Hirano K, Ichikawa T, Nakao K, Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Ikeda M,

Yamasaki H, Kato N, Kanematsu T, Ishii N, Eguchi K. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. Liver Transpl. 14:292-298 (2008).

- 7) Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Tada S, Kumagai N, Kato N, Shimotohno K, Hibi T. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus ribavirin treatment. J Med Virol. 80:632-639 (2008)

2. 学会発表

- 1) 河合 良成、池田 正徳、阿部 健一、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之、山本 和秀. 全長 HCV-RNA 複製細胞を基に作成した IFN 治療後再発モデルによる有効な治療法に検討・評価. 第44回日本肝臓学会総会、松山、2008年6月.
- 2) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. A new human hepatoma cell line enabling persistent reproduction of HCV life cycle and assay for anti-HCV reagents. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 3) Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N. Genome-length HCV RNA replicating cells possessing IFN- α resistant phenotype for the

development of relapse model. 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.

- 4) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with HCV genome derived from a patient with acute hepatitis 15th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, San Antonio, Texas USA, October 2008.
- 5) 池田 正徳、森 京子、西村 剛、阿部 健一、有海 康雄、團迫 浩方、中沢 貴秀、加藤 宣之. 異なる1b型HCV陽性血清由来の全長HCV RNA複製レポーターアッセイ系の開発. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
- 6) 河合 良成、池田 正徳、阿部 健一、矢野 雅彦、有海 康雄、團迫 浩方、山本 和秀、加藤 宣之. IFN抵抗性全長HCV-RNA複製細胞の特徴および有効な治療法を見出すための治療後再発モデルの構築. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
- 7) 西村 剛、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、中沢 貴秀、加藤 宣之. 異なるHCV陽性血清由来の1b型HCVレプリコン複製細胞株の樹立と薬剤感受性の評価. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
- 8) 加藤 宣之、森 京子、阿部 健一、團迫 浩方、有海 康雄、脇田 隆宇、池田 正徳. 新しいヒト肝癌細胞株Li23を用いたHCV生活環再現システム. 第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月.
- 9) Mori K, Abe K, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C

virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月.

- 10) Ikeda M, Mori K, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Nakazawa T, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication reporter assay systems using various genotype 1b HCV strains. 第67回日本癌学会学術総会、名古屋、2008年10月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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（平成 20 年度）

研究分担者：千葉大学大学院医学研究院腫瘍内科学講座 教授 横須賀 収

研究：HBV、HCV 全塩基配列に基づく薬剤耐性機序に関する研究

研究要旨：C型慢性肝炎1型高ウイルス例はインターフェロン治療に抵抗性で、現在の標準的治療でもウイルス駆除は約50%にすぎない。治療効果に関与するウイルス因子を検討するため、ペグイントロンとレボトール1年間投与によりSVR（投与終了24週後のHCV-RNA陰性）となった5例とNR（HCV-RNA持続陽性）5例の全塩基配列を決定し比較検討した。候補部位の変異と治療効果との関連を最終的に104例で検討比較したところ、E1の330TがRVR（投与4週後のHCV-RNA 2log以上減少）と、Coreの91LがRVR、EVR（12週後のHCV-RNA 2 log以上減少）、SVRと、ISDR ≥ 2 がSVRと関連していた。さらに各種臨床背景を含めた多変量解析により、Core70R、91Lのdouble wild (DW)はRVR、EVR、SVR、NRと有意な関連が認められた。ISDR変異数 ≤ 1 かつコアnon-DWで60歳以上の症例はSVR率が2/19(11%)と最も低く難治であった。

A. 研究目的

C型慢性肝炎1型高ウイルス例はインターフェロン治療に抵抗性で、現在の標準的治療でもウイルス駆除は約50%にすぎない。そこで治療効果に関連するウイルス側因子を検討した。

B. 研究方法

1型高ウイルス量 (≥ 100 KIU/ml) の C 型慢性肝炎患者 104 例を対象とした。治療法は、PEG-IFN α -2b 1.5 μ g/kg 週 1 回、リバビリンは体重別に 600-1000mg/日を 48 週間投与した。SVR 5 例と null response (NR) 5 例を対象に direct sequence 法により HCV-RNA の全塩基配列を決定、アミノ酸配列を 1 か所ごとに HCV-J 株と比較し 2 群間で Wild-type の

割合を比較、差の大きいアミノ酸部位を抽出した。抽出したアミノ酸部位を 33 例で検討し、引き続き治療効果との関連が認められた部位を治療関連候補部位とした。治療関連候補部位と Core 70R、91L、ISDR、PKRBD について 104 例で配列を決定し RVR、EVR、SVR との関連を検討した。さらに Core 70R、91L、ISDR と臨床背景因子を加えてウイルス効果に関連する因子を多変量解析で検討した。患者からは HCV-RNA 遺伝子検査の同意は得ており本研究の遂行に問題はないと考えられる。

C. 研究結果

(1) SVR5 例と NR5 例の全塩基配列の比較で、E1 領域の 308I、330T、E2 領域の 477P、NS2 領域の 983I、1942A、NS5A 領域の 2064A、NS5B 領域の 2554D、2906S の 8 か所に差が