

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和47年-昭和58年 国立遺伝学研究所 分子遺伝部 (研究員)
 昭和53年-昭和56年 米国 ウィスコンシン大学 McArdle 癌研究所 (博士研究員)
 昭和58年-平成6年 国立がんセンター研究所 ウィルス部 (室長・部長)
 平成6年-平成19年 京都大学 ウィルス研究所 (教授・所長)
 平成19年-現在 慶應義塾大学 医学部 (特別研究教授)
 平成19年-現在 千葉工業大学 附属研究所 (研究員)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

三浦 謹一郎 (国立遺伝学研究所)
 Howard M. Temin (米国 McArdle 癌研究所)
 杉村 隆 (国立がんセンター研究所)

・主な研究課題

- (1) レトロウィルスの複製機構の解析
- (2) レトロウィルスベクターに関する研究
- (3) ヒトT細胞白血病ウィルス (HTLV) の分子ウイルス学的研究
- (4) HCVの複製機構およびウィルス発がんに関する研究

・これまでの研究実績

- Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T and Shimotohno K., Negative regulation of the RIG-I signaling by the novel ubiquitin ligase RNF125. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104 : 7500-7505, 2007
- Miyazaki Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nat Cell Biol.** 9(9):1089-1097, 2007
- Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. **J Biol Chem.** 282(45):32765-32772, 2007
- Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyazaki Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. **Mol Cell.** 19 :111-122, 2005.
- Ohshima T, Koga H, Shimotohno K. Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification. **J Biol Chem.** 279:29551-29557, 2004
- Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K, Chiba T. The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. **Gastroenterology.** 127:1775-1786, 2004
- Miyazaki Y, Hijikata M, Yamaji M, Hosaka M, Takahashi H, Shimotohno K. Hepatitis C virus Non-structural proteins in the probable membranous compartment function in viral RNA replication. **J Biol Chem.** 278: 50301-50308, 2003
- Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. **Hepatology.** 38 :1282-1288, 2003
- Hijikata, M, Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and Shimotohno, K., Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 90: 10773-10777, 1993
- Tajima, K., Shimotohno, K. and Oki, S. Natural horizontal transmission of HCV in microepidemic town in Japan. **Lancet**, 337: 1410-1411, 1991
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. and Shimotohno, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 9524-9528, 1990
- Kitado, H., Chen, I.S.Y., Shah, N.P., Cann, A.J., Shimotohno, K. and Fan, H. U3 sequences from HTLV-I and -II LTRs confer pX protein response to a murine leukemia virus LTR. **Science**, 235: 901-904, 1987
- Shimotohno, K., Takano, M., Teruuchi, T. and Miwa, M. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83: 8112-8116, 1986
- Shimotohno, K., Miwa, M., Slamon, D.J., Chen, I.S.Y., Hoshino, H., Takano, M., Fujino, M. and Sugimura T. Identification of new gene products coded from X regions of human T-cell leukemia viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 302-306, 1985
- Shimotohno, K., Takahashi, Y., Shimizu, N., Gojobori, T., Golde, D.W., Chen, I.S.Y., Miwa, M. and Sugimura, T. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: An open reading frame for the protease gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 82: 3101-3105, 1985
- Wachsman, W., Shimotohno, K., Clark, S.C., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Expression of the 3' terminal region of human T-cell leukemia virus. **Science**, 266: 177-179, 1984
- Slamon, D.J., Shimotohno, K., Cline, M.J., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia virus. HTLV-I and HTLV-II. **Science**, 266: 61-65, 1984
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Loss of intervening sequence in genomic mouse alpha-globin DNA inserted in an infectious retrovirus vector. **Nature**, 299: 265-268, 1982
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. **Cell**, 26: 67-77, 1981
- Shimotohno, K., Mizutani, S. and Temin, H.M. Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. **Nature**, 285: 550-554, 1980
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. No apparent nucleotide sequence specificity in cellular DNA juxtaposed to retrovirus provirus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77: 7357-7361, 1980

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研究班

「肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発要因及びウイルス増殖に対する人為的制御による肝炎制圧」

班員

班員	個別研究課題
下邊野邦忠	HCVIによる細胞の異常増殖性の機構
高久 洋	HCV増殖に関与するヒートショックタンパク質の機能解析
堀田 博	HCV複製、細胞の増殖を制御する細胞側因子の解明と機能解析
加藤 宣之	HCV増殖制御に関与する宿主因子とその機能解析
西口 修平	HCV感染によるミトコンドリア遺伝子異常の解析
小原 恭子	HCVIによる細胞増殖性獲得機構の分子機構
落谷 孝広	間葉系幹細胞から肝細胞への分化と肝炎ウイルス感染系の確立
杉山 和夫	肝炎患者に存在するHCVゲノム多様性の意義
丸澤 宏之	HCV感染による宿主遺伝子への変異蓄積の分子機構解析

目的

HCV感染により引き起こされる細胞の異常化の分子基盤を明らかにし、それを人為的に治す方法を探る。一方、ウイルス複製を阻止する方策も探り最終的にはHCVIによる疾患の予防と治療を目指す。

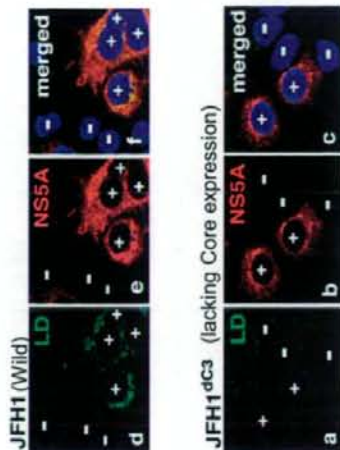
これまでの成果

HCV感染による細胞の変化

- (1) 細胞内脂肪滴の増加はHCVの複製に重要である(下邊野)
- (2) HCVIによる細胞の遺伝子変化の促進(丸澤、西口)
(核酸編集遺伝子(AID)の活性化およびミトコンドリア遺伝子変異)
- (3) HCV感染による細胞の生あるいは死への運命付け(堀田、小原)

HCVは複製に脂肪滴を利用する

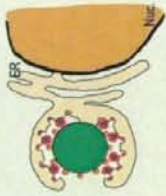
HCV 感染は細胞内の脂肪滴を増やす



HCV蛋白質は、脂肪滴の周りに整然と集合している

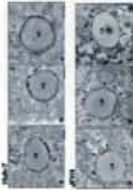


感染細胞内におけるウイルスタンパク質複合体と脂肪滴、小胞体との関係

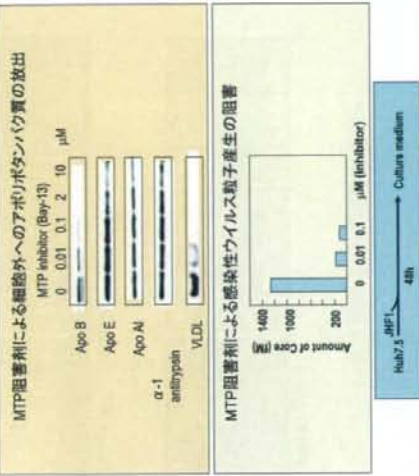


- : NS proteins complex (NPC)
- : Replication Complex (RC)
- : Core

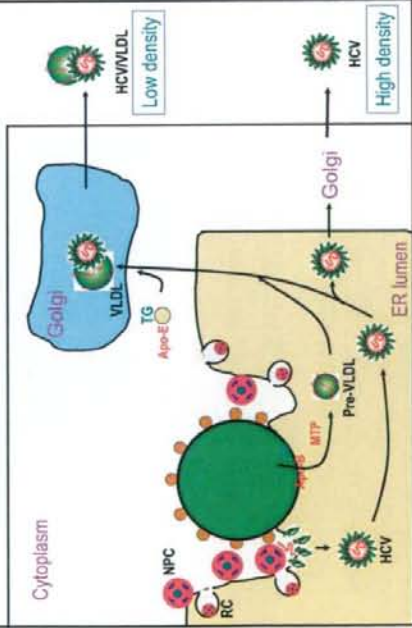
HCV複製細胞内の脂肪滴は、膜様構造に囲まれている



感染性ウイルス粒子の産生はアポリポタンパク質の放出量と相関する



Core-coated LD周辺の小胞体ルーメン内ではVLDLとウイルスの会合頻度が高い?

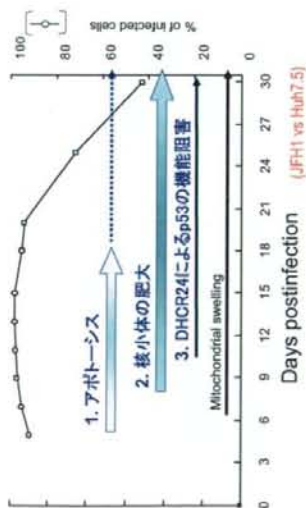


AID遺伝子の活性化

HCVのCoreタンパク質およびTNF α によりヒト肝細胞にActivation-induced cytidine deaminase (AID)が発現誘導される



HCV感染は様々な機構により細胞変性を引き起こす



これまでの成果

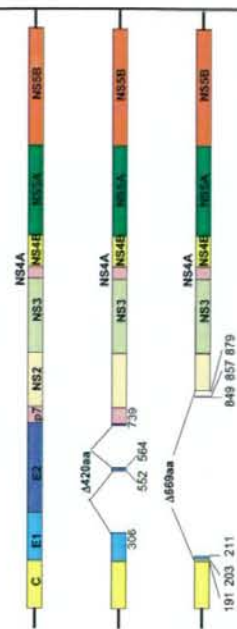
宿主因子によるHCVの増殖制御など

- (4) 分子シャペロンによるHCV複製制御(高久)
- (5) DNA 障害に関与する因子によるHCV複製制御(加藤)
- (6) HCV感染血液内の欠失ゲノムにはコアが保存されており、感染性粒子を産生する(杉山)
- (7) 間葉系脂肪細胞の肝細胞への分化とその感染及び評価系の構築(落谷)

Hsp90はNS3に結合して、ATM、Chk2はNS5Bに結合してウイルスゲノムの複製を抑制する

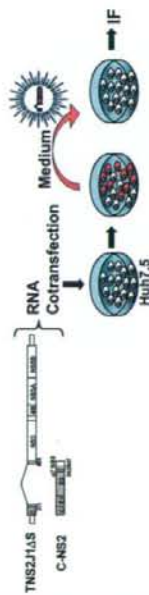


患者血清からEnvelope領域がin frameで欠失しているHCVゲノムはコアの配列が保存されている



調べた血清の約3割に欠失ゲノムが観察される

欠失ゲノムに構造領域を供給するとウイルス粒子が産生される



TNS2J1ΔS
C-NS2 (mRNA)



欠失ゲノムはコアタンパク質の過剰産生を促し、ウイルス複製の増強あるいは肝疾患に関与している可能性がある

間葉系幹細胞から分化させた肝細胞系の不死化と
肝炎ウイルス感染系への応用

- (1) HCV感染を認めた
- (2) 不死化実験は進行中

今後の研究

HCV感染による細胞の変化

- (1) HCV感染による脂肪滴の増加の分子機構
- (2) アポリポタンパク質によるHCV産生の制御
- (3) AIDの活性化機構の詳細
- (4) ミトコンドリア遺伝子変異と機能との関係
- (5) HCV感染による細胞死の分子機構
- (6) 欠失HCVゲノムと細胞障害との関連性

→ HCVによる細胞増殖変化および障害性惹起の分子基盤を明らかにして疾患発症の予防に向けた技術開発を目指す

宿主因子によるHCVの増殖制御など

- (7) HCV複製制御に関わる宿主因子の探索と機能解析
- (8) 間葉系脂肪細胞の肝細胞への分化とその感染及び肝細胞系の構築

→ HCVの感染阻止系の開発

平成20年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：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

課題番号：H19-肝炎一般-002

研究代表者：榎本 信幸

I. 研究の意義

1. 薬剤耐性(治療抵抗性)肝炎ウイルス感染が大きな問題となっている。
2. 本研究では、これらの薬剤耐性の病態を解明しその対策の基盤的研究を行うことにより、薬剤耐性ウイルス感染の診断・治療アルゴリズムの確立、新規治療法の開発を行う。

II. 研究の目的、期待される成果

本研究は以下の目的で実施する。

1. 薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態を解明し、その予測・診断法を確立する。
2. 耐性を予防・克服し現行の治療の効果を高める治療法の開発の基礎的研究を行う。
3. 既存治療に耐性の肝炎ウイルスに対しても有効な新規治療の開発を行う。

本研究の結果として、直接的には以下の成果が期待される

1. 現行治療の効果的な適用により安全・確実なウイルス肝炎治療体系が実現する。
2. 肝炎ウイルス感染機構に関する理解が深まるとともに耐性克服の基盤が形成される。
3. 既存治療とは全く異なる機序の治療法の開発による、耐性ウイルス感染の治療への展望が得られる。

III. 2年間の研究成果

●研究代表者(榎本信幸):ハイスループットのHCVゲノムワイド解析システムを構築し、多数症例でHCV全遺伝子配列を網羅的に決定し、HCVコア遺伝子およびNS5A遺伝子にPeginterferon/Ribavirin併用療法の治療効果を決定するアミノ酸変異が存在することを解明した。核酸アナログ治療前のHBV全遺伝子配列の解析を行い、耐性変異出現に関与する遺伝子構造の探索を開始した。

●研究分担者(横須賀敦):HBVの遺伝子変異と治療反応性との関連を明らかにし、ラミブジン感受性ウイルスにはRTドメインのアミノ酸変異が多いことを明らかにした。

●研究分担者(朝比奈靖浩):肝内脂肪沈着、血糖値、GGT、LDL-C、肝内自然免疫遺伝子発現などの宿主側因子がC型肝炎の治療効果に影響することを見出した。

●研究分担者(鈴木文孝):Invader assayを用いたB型肝炎ウイルスの耐性遺伝子の検出法を作成した。HCVコア領域のアミノ酸置換とISDRの変異数が治療効果に関係することを明らかとした。

●研究分担者(加藤直也):Taqman法を用いたラミブジン耐性B型肝炎ウイルスの検出系および培養系を確立した。

インターフェロン関連分子のSNPを解析しC型肝炎の病態と関連するSNPを同定、HCVコア蛋白変異株の定量系を開発した。

●研究分担者(中川美奈):IFN誘導遺伝子であるGBP-1がHCV-NS5B蛋白が特異的に結合しHCV増殖を特異的に抑制すること、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、これらの結合エピソードを同定した。

●研究分担者(堀田博):C型肝炎ウイルスNS5Aの一部(IRRD)のアミノ酸配列多様性がPeginterferon/Ribavirin併用療法の効果予測と関連することを明らかとして、NS5A結合宿主タンパク質としてGCN2キナーゼを同定した。

●研究分担者(加藤宣之):全長HCVゲノム複製細胞(5種類)を2年間にわたり継代培養し、それにより生じるHCVゲノムの遺伝的変異動態および細胞の感受性変化を明らかにする一方、細胞側もIFN抵抗性になる頻度が上昇することを見出した。

●研究分担者(鈴木哲朗):リバビリンに対して耐性の遺伝子型2a HCVを作成し、その耐性に関与するNS5B変異を明らかにする一方、プロテアーゼ阻害剤耐性に寄与するNS3変異を同定し、抗HCV剤耐性組換えウイルスの作製に成功した。

●研究分担者(今村道雄):ヒト肝細胞キメラマウスを用いてHCVのISDR変異と感染性の関連を検討、またプロテアーゼ阻害剤の単剤治療では早期に耐性クローンが選択されることを確認した。

●研究分担者(中本安成):慢性ウイルス肝炎トランスジェニックマウスモデル系のDNAマイクロアレイ解析により、前がん状態で発現の亢進する遺伝子群を同定、がん化に伴いiNOS、8-OHdGの蓄積が生じることを見出した。

●研究分担者(松本武久):In silico screeningにより探索したNS3プロテアーゼ活性とHCV subgenomic repliconの両方を強く阻害するリード化合物の構造類似化合物をデータベースから探索し、さらに抗HCV活性の強い化合物の同定に成功した。

●研究分担者(伊藤正彦):7種のHCV NS3プロテアーゼ阻害化合物をin silico screeningおよびin vitroにおける抑制効果判定実験により見出し、より効果の高い類似体を同定した。またgenotype1bおよび2aの両者に有効な化合物を見出した。抗真菌薬griseofulvin、抗癌剤paclitaxelの抗HCV活性を見出した。

IV. 21年度の課題

1. HBV 全遺伝子解析による核酸アナログ耐性変異の解析および予測・診断法開発
2. HBV 培養系による核酸アナログ耐性機構の解析
3. HCV 遺伝子変異による治療抵抗性の臨床的および基礎的解析と診断法の確立
4. HCV インターフェロン抵抗性の宿主因子の基礎的および解析
5. マウスモデルによる薬剤耐性肝炎ウイルス解析
6. In silico screening による薬剤耐性肝炎ウイルスに有効な新規化合物の探索

V. 行政施策への貢献の可能性

1. 薬剤耐性肝炎ウイルス感染の診断法開発とそれに基づく現行治療法のアルゴリズムの改善
2. 薬剤耐性変異ウイルスの病態解明による耐性を予測・予防・克服する治療法の開発
3. 新たな抗 HCV 化合物の同定による薬剤抵抗性 HCV に対する新規治療法開発

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

●主任研究者 (榎本信幸)

Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection.

J Infect Dis. 2008 Feb 1;197(3):361-70.

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 levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy.

J Hepatol. 2008 May;48(5):736-42. Epub 2008 Feb 26.

●研究分担者 (伊藤正彦)

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 hepatitis C virus replication in vitro. **Hepatol Res.** 2008 Vol 38 p909-18.

●研究分担者 (横須賀收)

Fukai K, Zhang KY, Imazeki F, Kurihara T, Mikata R, Yokosuka O. Association between lamivudine sensitivity and the number of substitutions in the reverse transcriptase region of the hepatitis B virus polymerase. **J Viral Hepat.** 2007 Sep;14(9):661-6.

●研究分担者 (朝比奈靖浩)

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, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. **Gastroenterology.** 2008 May;134(5):1396-405. Epub 2008 Feb 1

●研究分担者 (鈴木文孝)

Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Watahiki S, Iwasaki S, Kobayashi M, Kumada H. 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** 2008; 48:923-931.

●研究分担者 (加藤直也)

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

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

●研究分担者 (中川美奈)

Tasaka M, Sakamoto N (equal contribution), Itakura Y, Nakagawa M, Itsuji 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 Dec;88(Pt 12):3323-33.

●研究分担者 (堀田 博)

El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in the hepatitis C virus NS5A protein predicts clinical outcome of pegylated interferon/ ribavirin combination therapy. **Hepatology.** 2008; 48:38-47.

●研究分担者 (加藤直之)

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.** doi:10.1007/s00705-008-0282-8 (2008)

●研究分担者 (鈴木哲朗)

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).

●研究分担者 (今村道雄)

Kimura T, Imamura M, Hiraga N, Hatakeyama T, Miki D, Noguchi C, Mori N, Tsuge M, Takahashi S, Fujimoto Y, Iwao E, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Arataki K, Tateno C, Yoshizato K, Wakita T, Okamoto T, Matsuura Y, Chayama K. Establishment of an infectious genotype 1b hepatitis C virus clone in human hepatocyte chimeric mice. **J Gen Virol** 2008;89:2108-13.

●研究分担者 (中本安成)

Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Kakinoki K, Li YY, Wu Y, Matsushima K, Kaneko S and Mukaida N: Tumor cell apoptosis induces tumor-specific immunity in a CC chemokine receptor 1- and 5-dependent manner in mice. **J. Leukoc. Biol.** 84: 1001-1010, 2008

VII. III (2年間の研究成果)の概要図等

研究の目的:核酸アナログ耐性HBV、インターフェロン・リバビリン抵抗性HCVの病態解明

背景 B型肝炎ウイルス(HBV)に対する核酸アナログ治療の導入
 著明な短期的効果 →長期投与による核酸アナログ耐性ウイルスの出現
 C型肝炎ウイルス(HCV)に対するインターフェロン・リバビリン治療の導入
 3分の2の患者でのみウイルス排除可能
 →依然として多数の治療抵抗性患者が存在
 薬剤耐性肝炎ウイルスの病態解明・治療法開発が急務

H19・20年度の成果

核酸アナログ耐性B型肝炎ウイルス感染病態の解析

1. 核酸アナログに対する治療反応性・耐性化に関するHBV遺伝子構造の特徴を解析
2. Realtime PCRおよびinvader法による耐性変異検出法を開発

治療抵抗性C型肝炎ウイルス感染病態の解析

1. インターフェロン・リバビリン治療抵抗性にHCVコアおよびNS5A遺伝子変異が関与することを発見
2. HCV培養細胞系においてインターフェロン、リバビリン、プロテアーゼ阻害薬に抵抗性のウイルスおよび細胞の特徴を解析
3. HCV NS5B蛋白、NS5A蛋白と相互作用する宿主蛋白を同定
4. 肝細胞脂肪化などの宿主代謝因子がC型肝炎治療抵抗性に関連することを発見
5. 肝内自然免疫関連宿主遺伝子が治療抵抗性に関与することを解明
6. 病変進展に関する宿主遺伝子のSNPを同定

新規治療法の基盤開発

1. 肝炎モデルマウスにより薬剤耐性肝炎ウイルス感染系を作成
2. 肝炎モデルマウスにより病変進展に関する遺伝子変動を解析
3. In silico screeningとウイルス培養細胞系を用いた抗ウイルス化合物探索システムにより抗HCV候補化合物を発見

期待される成果:耐性機構の解明、診断・治療への応用、新規治療法の開発

核酸アナログ耐性HBVの病態解明 →
 予測・診断法、発生機構・病原性解明および治療法開発
 インターフェロン・リバビリン抵抗性HCVの病態解明 →
 インターフェロン系抑制機構および抵抗性のウイルスおよび宿主因子の解明
 インターフェロン・リバビリン抵抗性の診断および克服法の開発
 耐性ウイルスに有効な新規治療法の開発
 肝硬変・肝癌による死亡の減少

○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和62年(1987)~平成2年(1990) 金沢医科大学・消化器内科
 平成3年(1991)~平成12年(2000) 東京医科歯科大学・第2内科
 平成13年(2001)~平成15年(2003) 東京医科歯科大学・消化器内科
 平成16年(2004)以降 山梨大学医学部・第1内科

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

金沢医科大学・消化器内科 高田 昭 教授
 東京医科歯科大学・第2内科 丸茂文昭 教授
 東京医科歯科大学・保健衛生学科 佐藤千史 教授
 東京医科歯科大学・消化器内科 渡辺 守 教授
 武蔵野赤十字病院・消化器科 泉 並木 部長

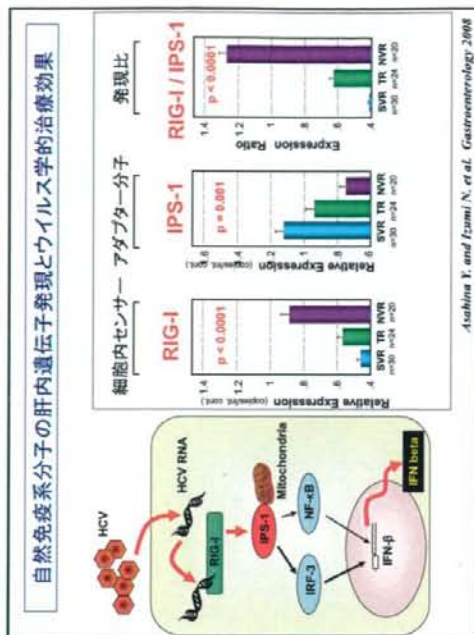
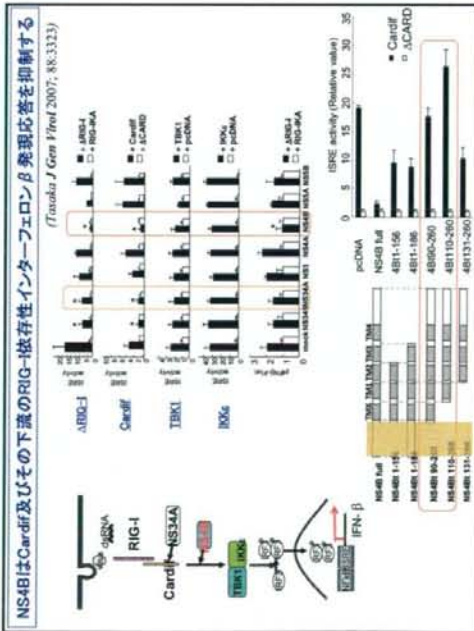
・主な研究課題

1. HCVにおける治療反応性を決定するウイルスおよび宿主因子の解明
2. HBV 遺伝子変異と病態
3. HCV 培養細胞モデルによる HCV 増殖機構、薬剤の抗ウイルス作用について分子生物学的研究
4. 消化器癌における発癌機序について網羅的遺伝子解析
5. アルコール代謝酵素 ALDH2 の多型とアルコール肝疾患病態との関連の解明

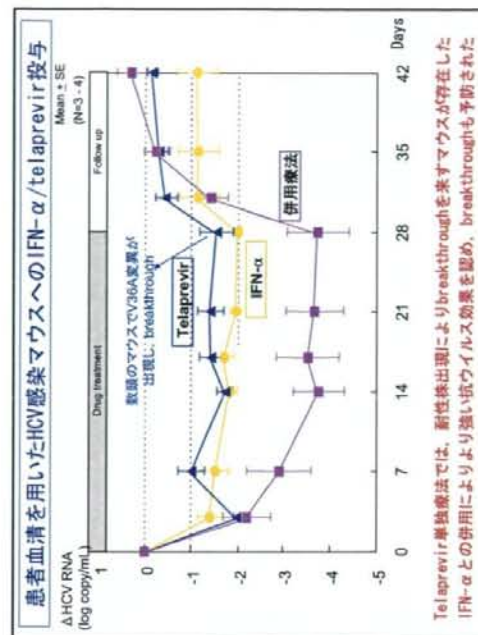
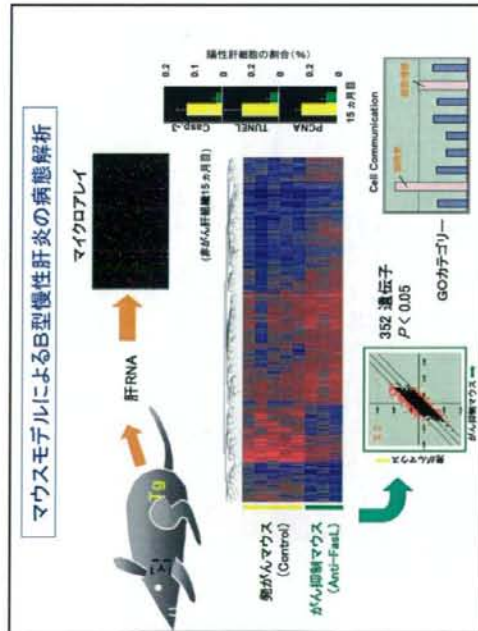
・これまでの研究実績

1. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008 Feb 1;197(3):361-70.
2. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology.* 2008 May;134(5):1396-405. Epub 2008 Feb 1
3. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. *J Hepatol.* 2008 May;48(5):736-42. Epub 2008 Feb 26.
4. Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology* 2008 Feb 5;371(1):71-85.
5. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Sep;23(9):1437-47.
6. HCV nonstructural proteins responsible for suppression of RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol* 2007 Dec;88(Pt 12):3323-33.
7. Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J Viral Hepatitis* 2006 Oct;13(10):690-700.
8. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepatitis* 2006 Sep;13(9):582-90.
9. Viral load change and sequential evolution of entire hepatitis C virus genome in Irish recipients of single source-contaminated anti-E immunoglobulin. *J Viral Hepatitis* 2005 Nov;12(6):594-603.
10. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2005 Oct;43(4):623-9.
11. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2005 Oct;42(4):962-73.
12. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology.* 2005 Sep;129(3):1031-41.
13. Characteristic sequence changes of hepatitis C virus genotype 2b associated with sustained biochemical response to IFN therapy. *J Viral Hepat.* 2005 May;12(3):251-61.
14. Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV replicon derived from chimpanzee-infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in Huh-7 cells. *J Viral Hepat.* 2004 Sep;11(5):394-403.
15. Quantitation of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction--and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. *J Infect Dis.* 2004 Apr 1;189(7):1151-7. Epub 2004 Mar 12.
16. Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. *J Virol.* 2004 Sep;78(18):9713-20.
17. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *J Infect Dis.* 2004 Apr 1;189(7):1129-39. Epub 2004 Mar 16.
18. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan 2;313(1):42-7.
19. Chronic HDV Infection with Genotype IIb Variant is Correlated with Progressive Liver Disease. *J Gen Virol* 2003 Dec;84(Pt 12):3275-89.
20. Hepatitis C Virus NS5A Protein Inhibits TNF-alpha Mediated Apoptosis in Huh7 Cells. *J Infect Dis* 2003 Nov 15;188(10):1537-44.
21. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003 Jun;4(6):602-8.
22. Sequence element correlating with circulating viral load in genotype 1b hepatitis C virus infection. *Virology* 311:376-83, 2003. 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.

- 特許番号2939171および3629372:ジェノタイプ1bのC型肝炎ウイルスに対する治療の有効性の判定方法及びそのためのプライマー
- 特許公開番号 2004-305140:C型肝炎ウイルスのタンパク質合成及び/又はC型肝炎ウイルスの複製を抑制することができる二本鎖オリゴヌクレオチド



Asahina Y. and Izumi N. et al. *Gastroenterology*, 2008



Telaprevir単独療法では、新性株出現によりbreakthroughを来すマウスが存在した。IFN-αとの併用によりより強い抗ウイルス効果を認め、breakthroughも予防された。

平成20年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究

課題番号：H19-肝炎一般-003

研究代表者：山口 一成

I. 研究の意義

血液製剤(輸血含む)を介する肝炎ウイルス(HBV、HCV、HEV)感染症は、日本赤十字血液センター、血液製剤メーカーの対策にもかかわらず、いまだ解決していない。本研究課題では、簡便性と経済性を重視した新規の肝炎ウイルス検出法の開発、院内肝炎感染または医療行為に伴う肝炎ウイルス再活性化の実態解析、および全国規模の輸血副作用のサーベイランスシステム構築を実現し、総合的な肝炎ウイルス感染防止体制の確立を行なう。

II. 研究の目的、期待される成果

日赤中央血液研究所、国立感染症研究所、及び全国大学病院輸血部、細胞治療部と連携し緊密な研究体制を進めることで総合的な肝炎ウイルス感染防止体制を確立したい。本研究では、1) 肝炎ウイルスと院内感染及び潜伏肝炎ウイルス再活性化において、院内感染、潜伏肝炎ウイルス再活性化の実態を明らかにし、有効な対策についても検討する。2) 輸血・細胞療法のウイルス安全性において、RNA増幅およびマイクロアレイなどの新しい技術を駆使し、HCV、HBVおよびHIVウイルスの安全性を担保できる検出システムの構築を目指す。3) 安全な血液を確保するための総合戦略を確立においては、「安全な血液製剤の安定供給の確保」および「安全で適正な輸血医療」を実現するための必要な方策について、輸血副作用に関するサーベイランスシステム構築を行ない総合的に検討する。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者

1) 共通 Motif 集合 primer 予測アルゴリズム(CoCoMo)を用いた HIV、HCV および HBV 用 degenerate primer の設計 (山口一成、協力研究者：遠藤大二 (酪農学園大獣医))

ウイルスの実際の塩基置換は、完全にランダムではなく、ある傾向を持つことが予想されており、ゲノムの塩基配列そのものについても一定の志向性があること知られている。6-10塩基程度のパターン(motif)の頻度を調べた場合、動物種ごとに出現頻度の傾向が存在している。また6-12塩基程度の短い配列の出現頻度の傾向は、HIV、HCV および HBV においても認められた。本研究では、ウイルス内の6-12塩基の塩基配列パターンの傾向を primer 設計に応用するプログラム群を開発し、HIV、HCV および HBV での degenerate primer の設計への適用を試みた。

2) 安全な血液を確保するための総合戦略の一環として年2回、全国規模での厚労科研輸血関連合同班会議、シンポジウムを主催している(毎回約100名の参加)。

・研究分担者

3) 肝炎ウイルスと院内感染及び潜伏肝炎ウイルス再活性化の研究(分担研究者:紀野修一(旭川医科大病院 臨床検査・輸血部)、大戸 斉(福島県医大医大病院 輸血・移植免疫部)、高橋孝喜(東京大医大病院 輸血部)、高松純樹(名古屋大医大病院 輸血部))

血液製剤が原因であると考えられていた輸血後の肝炎が、遡及調査の結果、必ずしも製剤のためではないことが明らかになってきている。全国の代表的医療機関の協力を受け、院内感染、潜伏肝炎ウイルス再活性化の実態を明らかにし、有効な対策についても検討している。日本輸血・細胞治療学会が平成16年度から行っている輸血業務に関する総合的アンケート調査の結果から輸血前後の感染症検査実施状況を後方視的に解析し、①輸血前検体保存率は約90%の施設で行われている、②輸血前感染症検査は約70%の施設で実施されているが、厚生労働省通知に記載されている感染症マーカーのすべてが検査されていない、③輸血後感染症検査の実施率は40%以下であることが明らかとなった。平成19年度のアンケート調査ではより詳細な設問を作成し、データを収集した。次年度には効率的な輸血後感染症検査実施体制を構築するための方法論を考案し実地検証を行う予定である。輸血後感染症検査結果を監視することで、ウイルスの再活性化や院内感染の実態を調査する。

4) ウイルス遺伝子の非特異的増幅方法の確立(分担研究者:水谷哲也(国立感染症研究所ウイルス第一部)、協力研究者:遠藤大二(酪農学園大獣医)、江下優樹(大分大医)、佐藤朝光(福岡大医))

血液検査において、複数のウイルス遺伝子を同時に非特異的に増幅することにより操作の簡便化と、安価なDNA chipを用いて検出するシステムの構築をおこなった。RNAからcDNAを合成し、cDNAを互いに連結することで長いcDNAを作成した。さらにPhi29酵素を用いて核酸を増幅する方法を確立し、RDV-RD法と名付けた。アルブミンmRNAでは約100分子を効率よく増幅できることが明らかとなった。一方、80コピーのHBV DNAでは約300倍増幅した。本法はRNAウイルスもDNAウイルスも同時に増幅することが可能である。本法では数十から数百分子の遺伝子を網羅的に増幅できる。

5) ウイルス核酸検出のためのDNAチップ作製と検出反応条件の検討(分担研究者:浜口功(国立感染症研究所・血液・安全性研究部)、半田誠(慶応義塾大医 輸血・細胞療法部) 研究協力者:水上拓郎、滝沢和也(国立感染症研究所))

肝炎以外のウイルスについても今後チェックの必要が求められる。ウイルス核酸に特異的なプライマーを用いてウイルス核酸を増幅し、増幅領域を付着させたDNAチップを用いて、核酸検出を行った。これまでのところ、RNAウイルスであるHCV、およびDNAウイルスのHBVをそれぞれ100分子/mL以上を出発点とした試料に関してDNAチップにより検出できた。

6) 国内技術を基盤としたウイルス検出用新規核酸増幅法の開発(分担研究者:古田里佳(大阪赤十字血液センター・研究部)、田所憲治(日本赤十字中央血液研究所))

輸血用検査の主要部分を海外の検査試薬に依存している現状はリスクマネジメントおよび国内医療

経済の観点から問題があると言わざるを得ない。国内のウイルス感染状況に即時に対応し得る国産技術を基盤としたウイルス核酸増幅検査を開発するために、タカラバイオ独自開発の核酸増幅システムである一定温度核酸増幅法 (ICAN[®]法)を用いた血液ウイルス NAT 開発を試みた。HCV ICAN NAT の構築を行い、1 反応あたり 10 IU の HCV genotype 1b を 82.5%、genotype 2a を 100%検出可能であり、輸血用 NAT として十分な感度が得られた。HCV ICAN NAT 特異性の検証ならびに全自動化への対応を検討する。

IV. 21 年度の課題

- 1) 肝炎ウイルスと院内感染及び潜伏肝炎ウイルス再活性化の研究
- 2) 輸血・細胞療法の肝炎ウイルス安全性の研究
- 3) 安全な血液を確保するための総合戦略

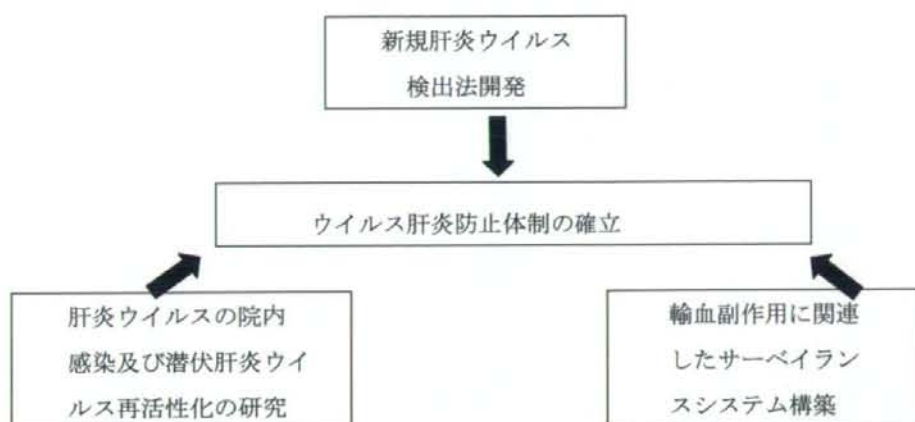
V. 行政施策への貢献の可能性

血液(輸血を含む)を介した肝炎ウイルス感染症の研究は国内外で行なわれているが、医療体制、献血体制の背景が各国で異なっており、独自の研究が求められる。しかしながら血液を介した肝炎対策は実態調査を含めてその基本とならなければならない。日本赤十字血液センター及び全国の血液・輸血関係者を網羅した研究は不可欠である。また新しい検出システムの開発も求められる。本研究課題では、これらの研究者が3つの課題で共同研究を行い、大きな成果が期待される。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

1. Mizukami T, Imai J, Hamaguchi I, Momose H, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K. : Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety. *Vaccine* 26, 2270-2283, 2008
2. Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Limn CK, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H. Rapid Genome Sequencing of RNA Viruses. *Emerging Infectious Diseases*. 13. 322-324. 2007.
3. Matsukura K, Shibata S, Tani T, Shibata H, Furuta RA. Persistent infection by human parvovirus B19 in qualified blood donors. *Transfusion* 2009. *In press*
4. 大坪寛子, 浜口功, 山口一成, ヘモビジランスシステムと輸血安全管理 *臨床検査* 52; 157-161, 2008
5. 紀野修一: 当院における輸血前・輸血後感染症検査実施のための取り組みと日本の現状. *医学のあゆみ* 225(7):610-611, 2008

VII. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等



○研究代表者の研究歴等 山口 一成

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和 49 年-平成 16 年 熊本大学医学部文部教官

平成 16 年- 国立感染症研究所 血液・安全性研究部部長 現在に至る

平成 18 年- 東京大学医科学研究所非常勤講師 (血液内科)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

岸本 進、高月 清 (熊本大学医学部内科教授)

・主な研究課題

血液学、輸血学、腫瘍ウイルス学、ワクチン、品質管理学

・これまでの研究実績

研究実績：(英文論文 192、和文論文 270)、受賞数：3、特許の取得数：5

昭和 49 年より熊本大学医学部において岸本進、高月清教授らとともに血液学、ウイルス学の研究を行なった。この間レトロウイルス (HTLV-1) により発症する成人 T 細胞白血病の臨床像の確立、発症予防、治療発症のメカニズムの解析などを行なっている。平成 16 年度から国立感染症研究所 血液・安全性研究部部長として、ワクチン血液製剤を含む生物学的製剤の安全性の研究に従事している。

1. Hamaguchi I, Imai J, Momose H, Mizukami T, Kawamura M, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K.: Application of quantitative gene expression analysis for pertussis vaccine safety control. *Vaccine* 26(36):4686-96, 2008.

2. Mizukami T, Yamaguchi K. et al: Application of DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation. *Vaccine* 26(18):2270-83, 2008

3. Tsukasaki K, Yamaguchi K, et al.: VCAP-AMP-VECP versus biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study, JCOG9801. *J Clin Oncol* 25(34):5458-64, 2007

厚生労働科学研究費補助金肝炎等克服緊急研究事業
「ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究」

研究組織

主任研究者
山口一成 国立感染症研究所・血液・安全性研究部
分担研究者
高橋孝喜 東京大学・医付属病院・輸血部
半田 誠 慶応義塾大学・医・輸血・細胞療法部
高松純樹 名古屋大学・医付属病院・輸血部
大戸 杏 福島医大・医病院・輸血・移植免疫部
紀野修一 旭川医科大学・臨床検査・輸血部
田所憲治 日本赤十字中央血液研究所
古田里佳 大阪赤十字血液センター・研究部
浜口 功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部
水谷哲也 国立感染症研究所・ウイルス一部

総合的な肝炎ウイルス感染防止体制の確立



「肝炎ウイルスと院内感染及び潜伏肝炎ウイルス再活性化の研究」グループ
大戸杏、紀野修一、高松純樹、高橋孝喜

ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究

2008年度研究内容

1. 輸血前後の感染症検査・輸血前検体保管の実施状況調査
平成16年度～19年度の「輸血業務」に関する総合的アンケート調査の中から、輸血前後の感染症検査、輸血前検体保管についての項目を抜き出し、経年変化をまとめた。また、輸血と感染（HBV、HCV、HIV）に関する詳細調査を行った。
2. 輸血後感染症陽性例に対する個別調査（解析中）
「輸血業務に関する総合的アンケート調査」中の「輸血と感染」の詳細調査で、輸血後感染症陽性患者が存在した施設に症例調査を行った。
3. 輸血後感染症検査の実施状況全国調査（現在実施中）
「輸血業務に関する総合的アンケート調査」で、輸血後一定期間を経過した患者に、輸血後検査の実施時期であることを通知している施設の協力で、輸血後検査実施率調査をおこなう。

1. 輸血前後の感染症検査・輸血前検体保管の実施状況調査

- ・ 輸血前検査
 - 70%以上の施設で定期的に行っている輸血前患者に検査を行っている。
 - 輸血前検査の大半は入院時検査や術前検査として実施。
 - HbAが原因、HCV抗体は、ほぼすべての施設で実施、しかし、HbS抗体、HbE抗体、HCVコア抗体は半数以下、HIV抗体は90%程度の施設であった。
 - 厚生労働省がすべての項目の検査実施率が50%を下回る施設は46%以上。
- ・ 輸血前検体保管
 - 90%以上の施設で、輸血前検体の凍結保存が行われ、凍結保存期間は24ヶ月が最多。
 - 約90%で、血液検査や文書記録の凍結検体を保存、37%でNATに耐える採血管で保存、15%の施設で凍結保存専用の採血管。
- ・ 輸血後検査
 - 全国に輸血後検査を行っている施設は23～40%にすぎず、症例によって行方施設をきめても70%程度。
 - HIV-JANA HCVコア抗体は約70%、HIV抗体は約85%の施設で実施されていた。
 - 検査項目の検査実施率は20%を下回る施設が70%以上を占めた。
 - 検査実施のため、様々なタイミングで様々な取り組みが行われていた。取り回しのタイムリゲンドと検査実施率の関係をみると、適切な検査時期の取り組みが、検査実施率向上に役立つ可能性がある。
- ・ 成果報告
 - 第43回日本輸血・細胞治療学会報告
 - 39th International Congress of International Society of Blood Transfusion (Macau)
 - 日本輸血・細胞治療学会ホームページ <http://www.jskt.or.jp/11st/2008keylines.pdf>

2-1. 輸血後感染症検査陽性例に対する個別調査: HBV

【HIVアンケート】過去1年間(2007年1月~2007年12月)に輸血後感染症検査でHBV-DNA又はHBs抗原が陽性であった症例はありますか

なし: 215名
 把握していない: 103
 無回答: 20
あり: 37 (79例)

(1例: 26歳, 3例: 3, 5例: 1, 33例: 1, 回答なし: 6)

- HBV抗原陽性: 14例
- 輸血による感染例: 4
- 再活性化: 15
- 上記の鑑別不能: 6

予備調査では24/37施設が個別調査に協力と回答

【個別調査】実際には、19/24施設が個別調査に回答: 全37症例

- HCV抗体陽性: 19例
- 輸血による感染例: 4例(も血液センターに報告済)
- 再活性化: 0
- 鑑別不能: 0
- 性交別による感染: 0
- 上記の鑑別不能: 0
- 輸血前後検査未又は輸血前後検査なし: 2例
- 判定不能: 2
- 輸血による感染の可能性あり: 4

【脚注】上記の脚注も同様です。輸血前後検査で陽性、血液センターには報告しているが、輸血による感染と判断されていないもの、院内感染や性交渉による感染などが考えられるが、原因は特定できない。

2-2. 輸血後感染症検査陽性例に対する個別調査: HCV

【HIVアンケート】過去1年間(2007年1月~2007年12月)に輸血後感染症検査でHCVコア抗体又はHCV抗体又はHCV-RNAが陽性であった症例はありますか

なし: 210名
 把握していない: 115
 無回答: 21
あり: 79 (133例)

(1例: 15歳, 2例: 4, 3例: 2, 4例: 1, 5例: 1, 7例: 1, 19例: 1, 72例: 1, 回答なし: 3)

- HCV抗体陽性: 114例
- 輸血による感染例: 1
- 上記の鑑別不能: 21

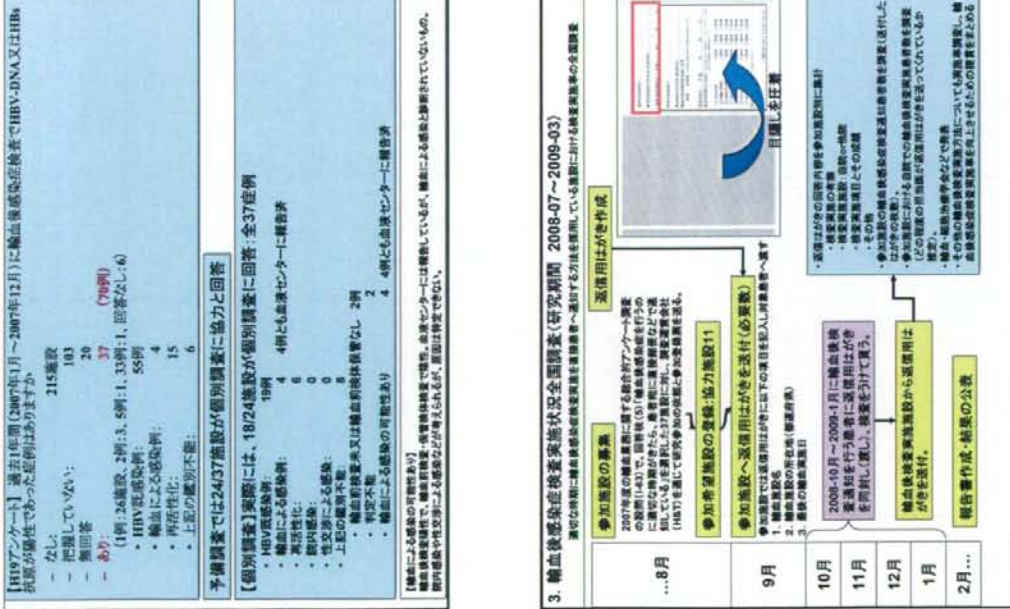
予備調査では19/29施設が個別調査に協力と回答

【個別調査】実際には、11/19施設が個別調査に回答: 全93症例

- HCV抗体陽性: 76例
- 輸血による感染例: 0
- 再活性化: 0
- 鑑別不能: 0
- 性交別による感染: 17
- 上記の鑑別不能: 4
- 輸血前後検査未又は輸血前後検査なし: 4例
- 判定不能: 7
- 輸血による感染の可能性あり: 6

【脚注】上記の脚注も同様です。輸血前後検査で陽性、血液センターには報告しているが、輸血による感染と判断されていないもの、院内感染や性交渉による感染などが考えられるが、原因は特定できない。

3. 輸血後感染症検査実施状況全国調査(研究期間 2008-07~2009-03)



「ウイルス肝炎感染症防止体制の確立に関する総合研究」(山口班)

輸血・細胞治療の肝炎ウイルス安全性の研究

新規ウイルス検出システムの開発

- 分科研究者 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 高口 功
 協力研究者 酪農学園大学 獣医学部 遠藤 大二
 国立感染症研究所 ウイルス1部 水谷 哲也
 大阪府赤十字血液センター 古田 直佳
 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 水上 拓郎
 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 滝澤 和也
 (株)ベーカーライジング広島工場 中嶋 昭生

