

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：ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発課題番号：H19-肝炎一般-010研究代表者：金子 周一**I. 研究の意義**

- (1) ウイルス性慢性肝炎に対する治療法は、高額で長期にわたり、また副作用も大きいにもかかわらず、治療効果や副作用の発生を予測する検査法がない。
- (2) ウイルス性慢性肝炎に対する治療効果は患者により大きく異なる。しかし、個々の患者に適した治療法を選択する検査法がない。
- (3) 従来の治療法の限界は明らかである。その治療効果を補完する、あるいはまったく新規の治療法の開発が望まれている。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 治療効果の正確な予測を行うためのジェノミクスを用いた診断法の研究開発を行う。
- (2) 最適の治療法を選択するためのジェノミクスを用いた診断法の研究開発を行う。
- (3) 分子を用いた新たな治療法の研究開発を行う。

III. 2年間の研究成果

・研究代表者

- (1) B型およびC型肝炎の違いを構成するRNA, micro-RNA分子から診断の候補マーカーを抽出した。
- (2) 末梢血を用いて、インターフェロン反応性予測、および肝がん診断が可能であることを示した。

・研究分担者(竹原徹郎)

- (1) C型肝炎では樹状細胞からT細胞への刺激が低下していることを示した。
- (2) C型慢性肝炎ではNK細胞においてインターフェロン反応性が低下していることを示し、治療効果の予測マーカーを探索した。

・研究分担者(宇都浩文)

- (1) SELDIプロテインチップを用いた肝細胞がんの早期診断の可能性を示した。
- (2) MALDI-TOF/MS解析によって血清MnSOD測定が肝病変の進展マーカーである可能性を示した。

・研究分担者(前川伸哉、花田賢太郎)

- (1) HCV全塩基配列解析により、NS5Aおよびcore領域の重要性を明らかにした。
- (2) 脂質関連遺伝子とウイルス増殖の関連を検討した。

・研究分担者(田中靖人)

(1) HBV/C がキメラマウスの肝細胞に障害を来すことを示した。線維化にかかわる HBV 責任領域を明らかにしつつある。

・研究分担者 (堀本勝久、菅 裕明)

(1) 肝がん にいたるネットワーク解析から特殊な条件下で活性化される分子の特定を行っている。

(2) NS3 および NS5 領域を対象とした RaPID 探索を行っている。

IV. 21 年度の課題

(1) C 型慢性肝炎に対する治療法を選択する方法、及び治療効果を予測する方法を開発する。

(2) 肝炎進展の診断、及び肝がんの診断における蛋白マーカーと発現遺伝子マーカーの有用性を検証する。

(3) ネットワーク情報から特定条件下で働く分子を同定する方法を確立する。

(4) HCV 粒子の産生に影響を与える脂質関連分子、および HCV 複製の標的候補、B 型慢性肝炎の線維化に寄与する治療標的分子を明らかにする。

V. 行政施策への貢献の可能性

(1) 治療法を決定するアルゴリズムを作成し、不要な治療を抑制、医療費の削減に貢献する。

(2) 新たな治療法の開発により、患者数の減少および医療費の削減に貢献する。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- 1) Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunagozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential miRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to HCC. *Hepatology* (in press)
- 2) Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S. Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Research* 68(24):10267-12079, 2008.
- 3) Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, Ishida Y, Hasuike S, Nagata K, Hayashi K, Ido A, Stuver SO, Tsubouchi H. Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology* 45:948-956, 2007
- 4) Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Hino K, Sakaida I, Mizokami M. Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in Severe Combined Immunodeficiency Transgenic With Urokinase-Type Plasminogen Activator Mouse With Human Hepatocytes. *Gastroenterology* 2008 Oct 29. Epub ahead of print

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等



ウイルス性慢性肝炎・肝がんの血液および組織



ジェノミクス技術を用いた解析

先端ゲノム情報ネットワークから活性化される分子を特定する方法を開発した



新しい診断法

診断に用いる分子の抽出の成果

1. インターフェロン投与前後の血液・肝臓における RNA, micro-RNAから診断に用いるマーカーを抽出した
2. 血液を対象にSELDIチップを用いた早期肝がんの可能性を示した
3. 樹状細胞、NK細胞の機能低下を示す診断マーカーを抽出した

治療に用いる分子の抽出の成果

1. HBVキメラマウスの解析から線維化にかかわるHBVを探索した
2. 脂質代謝関連遺伝子とウイルス増殖の関連解析を行った

ジェノミクス情報処理および薬剤索の成果

1. ゲノム情報のネットワークから活性化される分子を特定する方法を開発した
2. RaPID法を用いてHCVIに対する薬物探索を行った



新しい治療法

○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～平成元年	米国国立衛生研究所(NIH)客員研究員
平成5年～平成7年	米国南カリフォルニア大学客員教授
平成8年～平成16年	金沢大学医学部第一内科 講師・助教授
平成16年～現在	金沢大学大学院医学系研究科恒常性制御学(消化器内科)教授 金沢大学医学部長(平成18年より併任)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

昭和58年～昭和61年	金沢大学 服部 信教授、吉川 寛教授、村上清史助教授
昭和62年～平成元年	米国国立衛生研究所(NIH) Robert H Purcell
平成5年～平成7年	米国南カリフォルニア大学 French Anderson
平成8年～平成15年	金沢大学 小林健一教授

・主な研究課題

- ・肝炎ウイルスによる肝炎発症機構の解明と、その制御、治療に関する研究
- ・肝発癌の解析と、肝臓診断および治療に関する研究
- ・Genomics 技術を用いた肝臓病学、および血液を用いた診断学の研究

・これまでの研究実績

1. M Uno, S Kurita, H Misu, H Ando, T Ota, N Matsuzawa-Nagata, Y Kita, S Nabemoto, H Akahori, Y Zen, Y Nakanuma, S Kaneko, and T Takamura. Tranilast, an antifibrogenic agent, ameliorates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48(1):109-118, 2008.
2. BK Popivanova, K Kitamura, Y Wu, T Kondo, T Kagaya, S Kaneko, M Oshima, C Fujii, and N Mukaida. Blocking TNF- α in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest* 118(2):560-570, 2008.
3. N Matsuzawa, T Takamura, S Kurita, H Misu, T Ota, H Ando, M Yokoyama, M Honda, Y Zen, Y Nakanuma, K Miyamoto, and S Kaneko. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 46(5):1392-1403, 2007.
4. N Oishi, K Shilagardi, Y Nakamoto, M Honda, S Kaneko, and S Murakami. Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells. *Cancer Sci* 98(10):1540-1548, 2007.
5. T Tsuchiyama, Y Nakamoto, Y Sakai, Y Marukawa, M Kitahara, N Mukaida, and S Kaneko. Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *J Immunol* 178(1):574-583, 2007.
6. T Ota, T Takamura, S Kurita, N Matsuzawa, Y Kita, M Uno, H Akahori, H Misu, M Sakurai, Y Zen, Y Nakanuma, and S Kaneko. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 132(1):282-293, 2007.

政策提言：肝炎研究7カ年戦略（平成20年6月20日）、肝がん診療ガイドライン（2005年版）

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

研究課題:

ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎
に対する新規診断・治療法の開発
(H19-肝炎一般-010)

研究代表者 金子周一

研究課題:
ジェノミクス技術を用いたウイルス性肝炎に対する新規診断・治療法の開発

研究組織および研究概要



ジェノミクス技術を用いた新規診断法:
インターフェロン反応性を予測する肝組織を用いた診断法
(金子周一 金沢大学)



BBRC 2004 JIS 1088-96
Clin. Gastrointestinal Hepatol 2005 3: 1253-8

ジェミクス技術を用いた新規診断法:
ウイルス性肝炎に対する血液を用いた診断法
(金子周一 金沢大学)

2011年
日本科学振興会

BBRC 2004 315: 1068-66
Clin Gastroenterol Hepatol 2005 3: 1232-9

診断

治療前の末梢血を解析してIFN反応性が予測出来るか?
肝細胞、浸潤リンパ球と末梢血単核球における発現遺伝子の解析

● 肝細胞およびリンパ球におけるIFN投与前後の遺伝子発現変化とIFN反応性

● 末梢血単核球

予測値	SVR	NR
陽性	16	2
陰性	6	33

● 末梢血遺伝子発現を用いた治療予測 (n=57)

正解率=86%

● 末梢血を用いたIFN反応性の診断には、さらなる研究開発が必要

末梢血を解析して肝臓の病態が把握出来るか?
肝細胞癌、浸潤細胞と末梢血単核球における発現遺伝子の解析

肝癌合併C型肝炎患者における肝臓および非癌肝臓の局所浸潤リンパ球を Laser Capture Microdissection (LCM) を用いて選択的に分離、RNAを回収し、DNA マイクロアレイを用いて包括的に遺伝子発現を解析比較した。

また、C型肝炎慢性患者における末梢血単核球細胞(PBMC)を分離し、包括的に遺伝子発現を解析した。

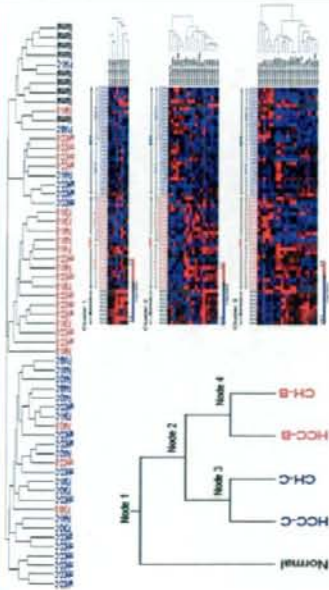
これらの解析によって得られた、肝臓局所浸潤リンパ球と肝癌患者PBMCの遺伝子発現の関連を検討した。

末梢血液中の単核球における発現遺伝子プロファイルは
肝細胞癌局所における浸潤リンパ球の発現プロファイルを反映している

● 診断用チップのデザインを開始
Cancer Res 2005

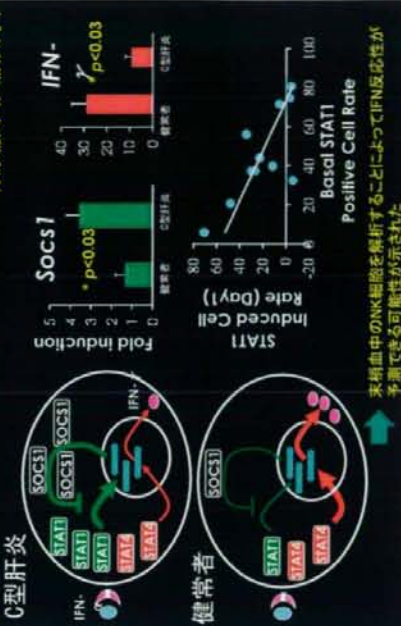
● 血液を用いた肝細胞癌の存在診断、病期診断法開発の可能性

肝臓におけるmicro RNAの発現はCHB, CHC, HCC
で異なり、各組織における遺伝子発現と相関している



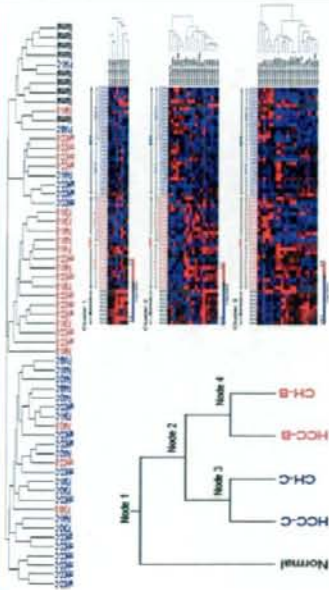
Micro RNAは新規診断法開発、および治療標的の良好候補となりうる
Hepatology 2009

C型慢性肝炎においてNK細胞内IFNシグナルは障害されている
竹原徹郎 (大阪大学)



末梢血中のNK細胞を解析することによってIFN反応性が予測できる可能性が示された

プロテオミクスを用いてウイルス性肝疾患のバイオマーカーを探索した (宇部浩文 鹿児島大学)



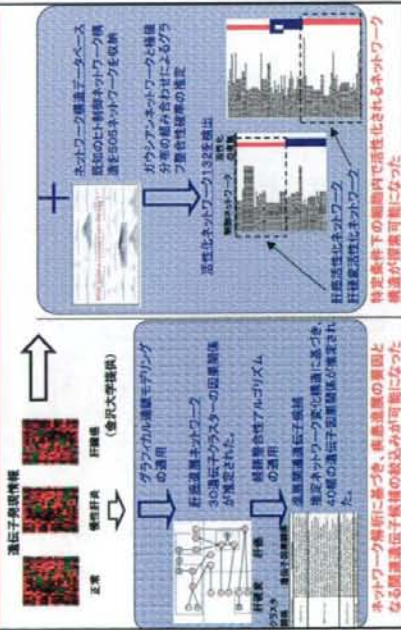
肝臓の組織成分
肝臓の組織成分
肝臓の組織成分
肝臓の組織成分

ヒト肝細胞置換キメラマウスを用いてHBVの遺伝子
線維化の違いを解析した (田中靖人 名古屋市立大学)

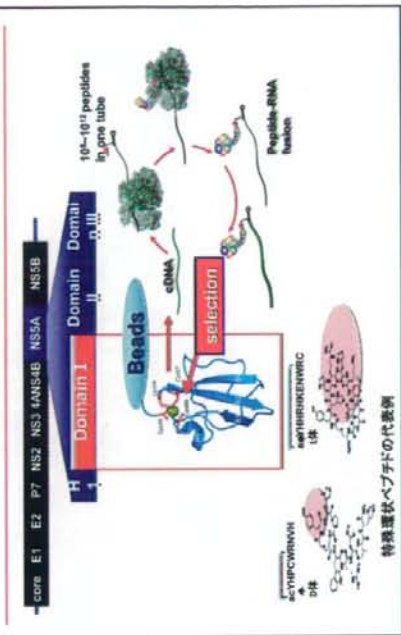


肝臓の組織成分
肝臓の組織成分
肝臓の組織成分
肝臓の組織成分

ウイルス性慢性肝炎のトランスクリプトーム情報を用いて、疾患進展にかかわる遺伝子およびネットワーク候補の絞り込みを行った 堀本勝久 産総研



RAPIDディスプレイ法を用いて非還元型チオエーテル結合で環状化させた特殊ペプチドのライブラリーを探索し候補を得た 菅 裕明 東京大学



研究成果のまとめ

1. トランスクリプトーム解析から、肝組織浸潤細胞および末梢血単核球は密接に関連しており、末梢血を解析することによって肝組織における病態を知ることが可能であり、血液は新規の診断法開発の良い材料と考えられた。
2. Micro RNAを用いて新たな診断法開発、薬物開発が出来る可能性が示された。
5. 末梢血NK細胞を解析することによって、IFN反応性の予測が可能であることが示された。
6. 慢性肝炎および肝癌の診断に有用と考えられる新たな血液中蛋白が見出された。
7. ケモラマウスを用いて、慢性肝炎の繊維化に関連する遺伝子の候補がリストアップされた。
8. トランスクリプトーム情報の処理によって、慢性肝炎を進展させる遺伝子、および遺伝子ネットワークを抽出することが可能であった。
9. 新規薬物探索法によって、HCVIに対する薬物候補が明らかとなった。

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：HCV 感染における宿主応答の分子機構の解析と新規創薬標的の探索

課題番号：H19-肝炎一般-011

主任研究者：松浦 善治

I. 研究の意義

- (1) 全世界には 2 億人もの HCV 感染者が存在する。
- (2) HCV 感染は、慢性肝炎、肝硬変、そして肝細胞癌の主要な原因である。
- (3) 現行の治療法の著効率は 50%ほどであり新規治療法の開発が急務である。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HCV の宿主免疫回避機構を解明する。
- (2) HCV の持続感染機構を解明する。
- (3) 現行の慢性 C 型肝炎療法を補完する新しい免疫制御療法の開発が期待される。

III. 2 年間の研究成果

・主任研究者 (松浦)

- (1) NS3 がプロテアーゼ活性非依存的に TLR シグナルを抑制することを見いだした。
- (2) NS5A が TLR シグナル伝達系で重要な MyD88 に結合して抑制的に作用することを見いだした。
- (3) レプリコン細胞では、TLR2 ガンド刺激に伴う IP-10 の発現が促進された。また、HCV 感染による IP-10 の産生は、MyD88 依存的な経路を介していることが明らかとなった。

・分担研究者 (考藤)

- (1) C 型肝炎患者の樹状細胞 (DC) は IFN- α に対する Th1 誘導能が低下しており、リバビリンによって Th1 誘導能が改善する症例では治療効果が高いことを示した。
- (2) C 型肝炎患者の DC 数と機能がベグ IFN- α とリバビリンの治療効果に関与していた。
- (3) C 型肝炎患者のミエロイド DC では TLR や RIG-I の発現亢進にも関わらず、サイトカイン産生能の低下がみられたことから、HCV によるシグナル伝達抑制機構の存在が示唆された。

・分担研究者 (藤田)

- (1) RIG-I の C 末端に活性抑制領域が存在することを明らかにした。
- (2) RIG-I の C 末端はウイルス RNA と宿主の RNA の識別を行なうことを明らかにした。
- (3) RIG-I の非自己 RNA 認識ドメインの立体構造を明らかにした。これを基にして、ウイルス認識に伴って露出すると考えられる RIG-I のエピトープを予測し、それに対する抗体を作製した。

・分担研究者 (竹内)

- (1) IFN- α 6 の産生をモニターできるマウスを作製し、RNA ウイルスの呼吸器感染においては肺胞マクロファージが IFN- α 産生細胞であることを明らかにした。
- (2) LCMV に対する細胞傷害性 T 細胞応答に、TLR を介した IFN 産生が重要であることを示した。
- (3) Lgp2 が RIG-I/MDA5 を介した RNA ウイルスの認識を正に制御していることを明らかにした。
- (4) RIG-I、MDA5 により認識される二本鎖 RNA 構造に関し検討を行い、それぞれ短鎖、長鎖二本鎖 RNA を認識することを明らかにした。また、RIG-I により認識されるウイルス感染細胞においても二本鎖 RNA が生成されることを見いだした。

・分担研究者 (土方)

- (1) ヒト血清由来 HCV が効率良く感染し増殖する新規不死化ヒト肝細胞を樹立した。
- (2) 感染性ウイルス粒子の産生に細胞の脂肪滴が重要な役割を果たすことを示した。
- (3) HCV 遺伝子複製にエストロゲン受容体が機能していることを示した。
- (4) ヒト初代培養肝細胞に IRF-7 の高い発現を確認し、ヒト IRF7 遺伝子プロモーターに肝臓特異的転写因子応答配列を見いだした。さらに、中空系を用いた不死化肝細胞による患者血液由来 HCV 感染実験系を用いて、HCV の感染により IFN の産生とウイルス増殖の抑制を検討した。

・分担研究者 (池田)

- (1) ヒト不死化 PH5CH8 肝細胞は 2 本鎖 RNA に応答し、IFN β 産生機構の解析に有用である。
- (2) 病態の異なる患者由来 NS3/4A は IPS-1 を切断するが、TRIF は切断しないことを示した。
- (3) NS5B を発現させた不死化肝細胞では 2 本鎖 RNA が合成され、それが認識されることにより IFN β が産生誘導されることを明らかにした。

・分担研究者(小原)

- (1) 自然免疫活性化剤の投与により、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスから HCV が排除された。
- (2) ウイルスを排除されたキメラマウスには 1 型 IFN の産生は認められなかった。
- (3) 任意の時期に HCV 遺伝子をスイッチング発現するトランスジェニックマウスを作製し、本マウスの肝臓における HCV 蛋白の定量と、形態学および免疫学的検索を行った。

IV. 21 年度の課題

- (1) 臨床材料から病原性を保持した HCV の分離可能な培養系の構築を試みる。
- (2) RIG-I とウイルス複合体の局在を検討する。
- (3) NS5B による IFN 産生誘導の相乗効果を解析する。
- (4) 患者血清由来 HCV の感染による IRF7 活性化機構を解析する。
- (6) トランスジェニックマウスを用いて肝炎の増悪化に関与する免疫担当細胞を同定する。
- (7) 免疫細胞における HCV 標的分子を同定する。

V. 行政施策への貢献の可能性

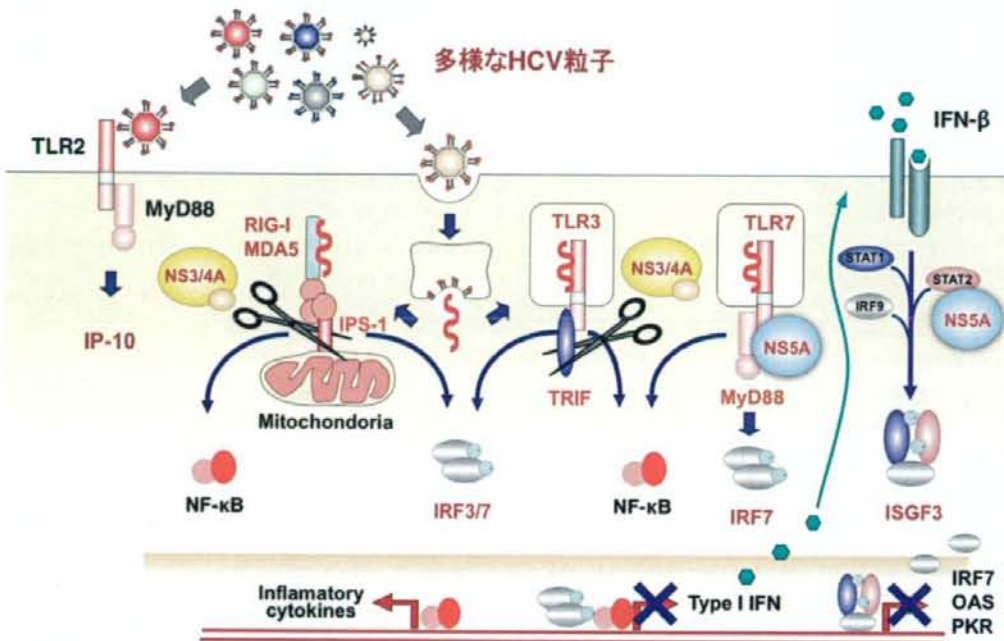
- (1) HCV の免疫回避機構が解明され、その責任分子を標的とした免疫制御療法は、従来の治療効果を改善することが期待される。
- (2) 保健、医療、福祉の向上に直結するとともに、高齢者医療費の低減に貢献する。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

1. Moriishi K., Mochizuki R., Moriya K., Miyamoto H., Mori Y., Abe T., Murata S., Tanaka K., Miyamura T., Suzuki T., Koike K., and Matsuura Y. Critical role of PA28 γ in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *PNAS*, 2007, 104, 1661-1666.
2. Abe T., Kaname Y., Hamamoto I., Tsuda Y., Wen X., Taguwa S., Moriishi K., Takeuchi O., Kawai T., Kanto T., Hayashi N., Akira S., and Matsuura Y. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Modulates TLR-MyD88-Dependent Signaling Pathway in the Macrophage Cell Lines. *J. Virol.*, 2007, 81, 8953-8966.
3. Yusuke Miyanari, Kimic Atsuzawa, Nobuteru Usuda, Koichi Watashi, Takayuki Hishiki, Margarita Zayas, Ralf Bartenschlager, Takaji Wakita, Makoto Hijikata, Kunitada Shimotohno. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* 9 (9), 1089-1097, 2007.
4. Hussein H. Aly, Koichi Watashi, Makoto Hijikata, Hiroyasu Kaneko, Yasutugu Takada, Hiroto Egawa, Shinji Uemoto, Kunitada Shimotohno Serum-derived hepatitis C virus infectivity in interferon regulatory factor-7-suppressed human primary hepatocytes. *J. Hepatol.*, 46(1), 26-36, 2007.
5. Onoguchi, K., Yoneyama, M., Takemura, A., Akira, S., Taniguchi, T., Namiki, H., and Fujita, T. : Viral Infections Activate Types I and II Interferon Genes through a Common Mechanism. *J. Biol. Chem.* 282, 7576-7581 (2007)
6. Saito, T., Hirai, R., Loo, Yueh-Ming., D. Owen., C. L. Johnson., S., C. Shinha., Akira, S., Fujita T. and Gale Jr., M. : Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 582-7 (2007)
7. Jung A, Kato H, Kumagai Y, Kumar H, Kawai T, Takeuchi O, Akira, S. Lymphocytoid choriomeningitis virus activates plasmacytoid dendritic cells and induces cytotoxic T cell response via MyD88. *J Virol.* Oct 17, 2007.
8. Kumagai Y, Takeuchi O, Kato H, Kumar H, Matsui K, Morii E, Aozasa K, Kawai T, Akira, S. Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* 27:240-52. 2007
9. Miyatake, H., Kanto, T., Inoue, M., Sakakibara, M., Kaimori, A., Yakushijin, T., Itose, I., Miyazaki, M., Kuzushita, N., Hiramatsu, N., Takehara, T., Kasahara, A. and Hayashi, N., Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepatol.*, 2007. 14: 404-412.
10. Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Yamaguchi, S., Sakamori, R., Hiramatsu, N., Kanto, T., Ohkawa, K. and Hayashi, N., Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4 CD25 T cells with PD-1-dependent regulatory activities. *Immunology* 2007. 120: 73-82.
11. Dansako H, Ikedo M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *FEBS J* (2007) 274: 4161-4176.
12. Abe K, Ikedo M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res* (2007) 125:88-97. Ikedo M, Abe K, Yamada M, Dansako H, Naka K, Kato N. Different Anti-HCV profiles of statins and their potential for combination therapy with interferon. *Hepatology* (2007) 44: 117-125.
13. Tsunamasa Watanabe, Takuya Umehara, Fumihiko Yasui, Shin-ichiro Nakagawa, Junichi Yano, Tadaaki Ohgi, Satoru Sonoke, Kazuaki Inoue, Makoto Yoshida and Michinori Kohara. Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome. *J. Hepatology* 47: 744-750 (2007).
14. Kazuaki Inoue, Takuya Umehara, Urs T. Ruegg, Fumihiko Yasui, Tsunamasa Watanabe, Hiroshi Yasuda, Makoto Yoshida, Jean-Maurice Dumont, Pietro Scalfaro, Michinori Kohara. Non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 with interferon shows synergistic anti-HCV effect in chimeric mouse. *Hepatology* 45: 921-928 (2007).

VI. III (2年間の研究成果)の概要図等

HCV感染における宿主応答の分子機構の解析と新規創薬標的の探索



臨床材料からのHCV分離培養系の樹立

ヒト血清由来HCVが効率良く感染し増殖する新規不死化ヒト肝細胞を樹立し、中空系を用いた培養により、患者血液由来HCVの細胞培養系を樹立した(土方)

HCV感染は自然免疫の誘導を阻害する

C型慢性肝炎患者の骨髄由来樹状細胞ではTLRやRIG-Iの発現亢進にも関わらず、サイトカイン産生能が低下する(考藤)

NS3/4AはIPS-1を切断するだけでなく、TLRシグナルを制御する(池田)

NS5AはMyD88と結合してTLRのシグナル伝達を阻害する(松浦)

HCV感染細胞ではTLR2/MyD88依存的な経路でIP-10が産生される(松浦)

細胞質RNAセンサーの解析

RIG-Iの非自己RNA認識ドメインの立体構造を解明した(藤田)

RIG-IとMDA5がそれぞれ短鎖と長鎖二本鎖RNAを認識することを明らかにした(竹内)

自然免疫と獲得免疫

細胞傷害性T細胞応答にはTLRを介したIFN産生が重要であることを明らかにした(竹内)

HCV感染キメラマウスからのウイルス排除

自然免疫活性化剤の投与によりHCV感染キメラマウスからIFN非依存的にHCVが排除された(小原)

○主任研究者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

所 属	職 名	在職期間
第一製薬株式会社中央研究所	研究員	昭和55年4月-昭和57年7月
厚生省国立予防衛生研究所	研究員	昭和57年8月-平成4年8月
オックスフォード大ウイルス学研究所	研究員	昭和59年9月-昭和61年9月
厚生労働省国立感染症研究所ウイルス第二部	室長	平成4年8月-平成12年3月
大阪大学微生物病研究所	教授	平成12年4月-現在に至る

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

第一製薬株式会社中央研究所	大谷 剛 主幹研究員
厚生省国立予防衛生研究所	森田千春 室長
オックスフォード大ウイルス学研究所	David H. L. Bishop 所長
厚生労働省国立感染症研究所ウイルス第二部	宮村達男 部長(現所長)
大阪大学微生物病研究所	森石恒司 准教授

・主な研究課題

- 1 HCVの感染増殖機構、インスリン抵抗性、脂肪肝および肝癌の発症機構の解析。
- 2 慢性C型肝炎の新しい治療法の開発。
- 3 遺伝子治療用新規ウイルスベクターの開発。

・これまでの研究実績

1. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 8349-8361 (2008).
2. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 3480-3489 (2008).
3. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. Tagawa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 82, 2631-2641 (2008).
4. Processing of capsid protein by cathepsin L plays a crucial role in replication of the Japanese encephalitis virus in neural and macrophage cells. Mori Y., Yamashita T., Tanaka Y., Tsuda Y., Abe T., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8477-8487 (2007).
5. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. Tani H., Komoda Y., Matsuo E., Suzuki K., Hamamoto I., Yamashita T., Moriishi K., Fujiyama K., Kanto T., Hayashi N., Owsianka A., Patel A.H., Whitt M.A., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 8601-8612 (2007).
6. Involvement of PA28 γ -dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. Miyamoto H., Moriishi K., Moriya K., Murata S., Tanaka K., Suzuki T., Miyamura T., Koike K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 81, 1727-1735 (2007).
7. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. Yamamoto M., Uematsu S., Okamoto T., Matsuura Y., Sato S., Kumar H., Satoh T., Saitoh T., Takeda K., Ishii K.J., Takeuchi O., Kawai T., and Akira S. *J. Exp. Med.*, 204, 2233-2239 (2007).
8. Oligomerization of Hepatitis C Virus Core Protein Is Crucial for Interaction with Cytoplasmic Domain of E1 Envelope Protein. Nakai K., Okamoto T., Kimura-Someya T., Ishii K., Lim C-K., Tani H., Matsuo E., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Miyamura T., Nunberg J.H., Moriishi K., and Matsuura Y. *J. Virol.*, 80, 11265-11273 (2006).
9. Hepatitis C virus RNA replication is regulated by FKBP8 and Hsp90. Okamoto T., Nishimura Y., Ichimura T., Suzuki K., Miyamura T., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. *EMBO J.*, 25, 5015-5025 (2006).
10. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K. J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.-S., Sousa C. R., Matsuura Y., Fujita T., and Akira S. *Nature*, 441, 101-105 (2006).

HCV感染における宿主応答の分子機構の解析 と新規創薬標的の探索

松浦善治	大阪大学微生物病研究所
竹内理	大阪大学微生物病研究所
考藤達哉	大阪大学大学院医学系研究所
藤田尚志	京都大学ウイルス研究所
土方 誠	京都大学ウイルス研究所
池田正徳	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
小原道法	東京都臨床医学総合研究所

慢性C型肝炎対策の問題点

- ✓ HCVは自然免疫の誘導を巧妙に回避する
 - HCV蛋白質が自然免疫の誘導シグナルを遮断してIFNの誘導を抑制している
- ✓ HCVの複製酵素を標的とした薬剤に対しては容易に耐性株が出現する
 - もともとヘテロウイルス集団であるが、さらに複製酵素の精度が低いために、ゲノムに変異が導入され、薬剤耐性変異株が選択される



HCV研究の問題点

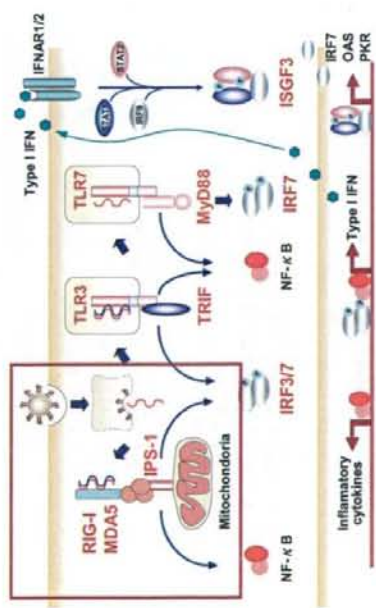
- ✓ 細胞培養系が存在しない
 - 培養細胞で増殖可能な実験菌株が樹立されたが、未だ血清由来の野生型HCVを分離培養できない
- ✓ 感受性を示す小型動物が存在しない
 - チンパンジー・・・倫理的な障害
 - キメラマウス・・・免疫不全
- ✓ 限られたクローンに由来するアッセイ系
 - ポリクローナルな患者体内のHCV粒子による感染様式を反映しているとは限らない



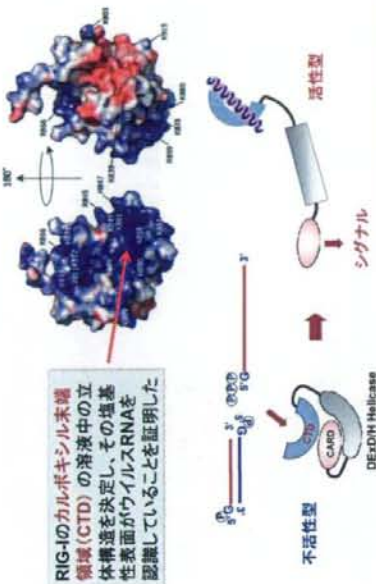
HCV感染における宿主応答の分子機構の解析 と新規創薬標的の探索



RNAウイルス感染によるIFNの誘導経路



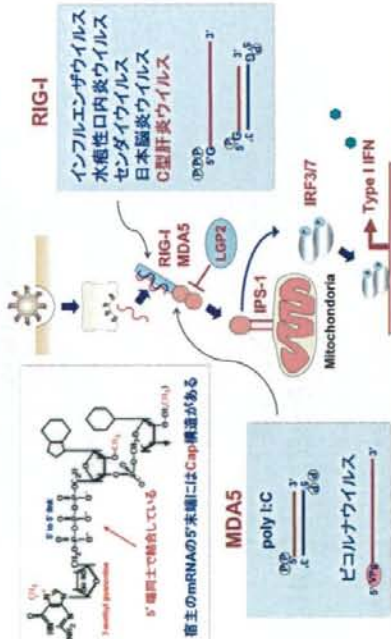
RIG-Iの構造解析



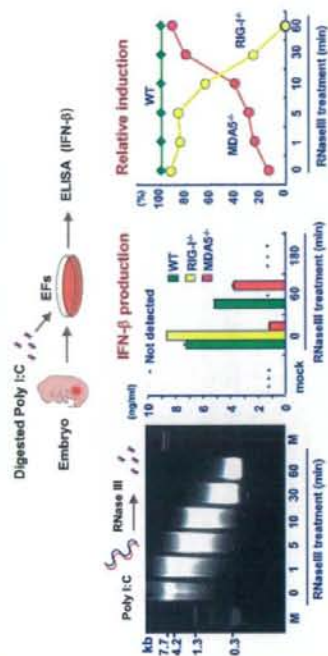
RIG-Iのカルボキシル末端領域(CTD)の溶液中の立体構造を決定し、その塩基性表面がウイルスRNAを認識していることを証明した

Takahashi K., Fujita T. et al., Mol. Cell, 2008

RIG-IとMDA5が認識するRNA

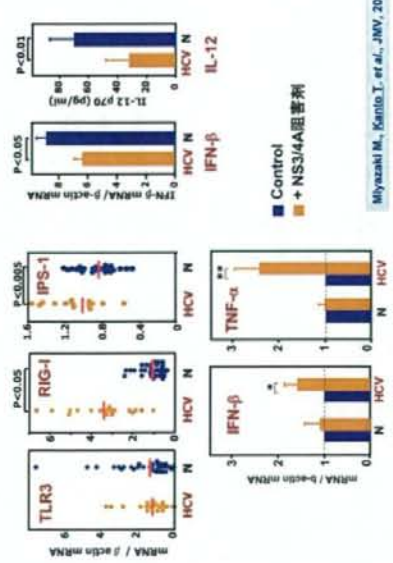


RIG-Iは短鎖 (<1 kb)、MDA5は長鎖 (>2 kb)の二本鎖RNAを認識してIFN-β産生を誘導する

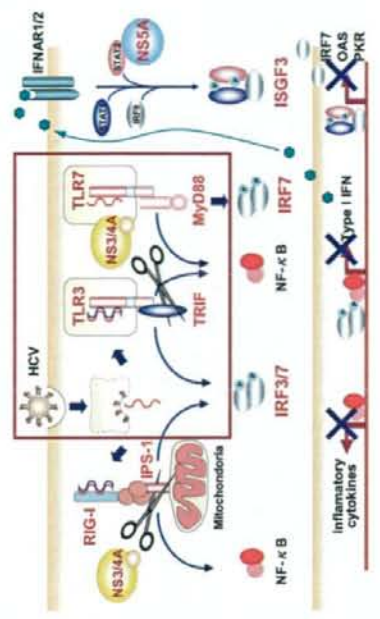


Kato H., Takeshichi O. et al., JEM, 2008

C型肝炎患者の樹状細胞におけるRIG-Iの発現と機能



HCVは自然免疫の誘導を巧妙に阻害する

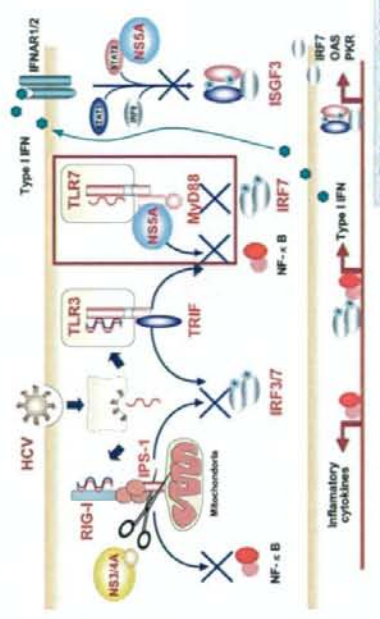


NS3/4AプロテアーゼはIPS-1を切断するがTRIFは切断しない



Iweda M. et al., unpublished

NS5AはMyD88に結合してTLRシグナルを阻害する



Abe T., Matsuzawa Y. et al., JVI, 2007

HCV感染細胞ではTLR/MyD88を介してIP-10が過剰に産生される

慢性C型肝炎患者の血中や肝臓組織では、IP-10、MIG、I-TACなどの炎症性ケモカインの発現が亢進している

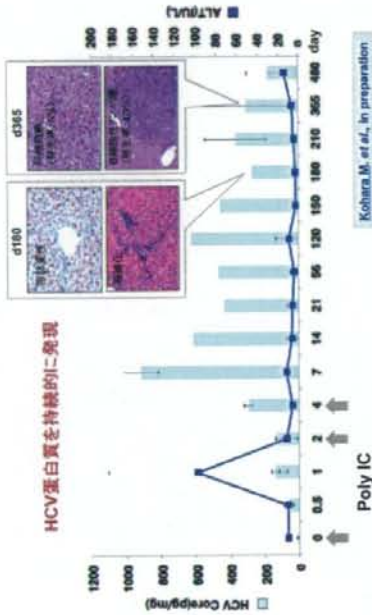
これら炎症性ケモカインによって活性化されたリンパ球やマクロファージの浸潤が肝障害の一因と考えられている



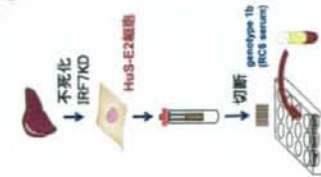
TLR2/MyD88を介してIP-10の発現が促進される

Abe T., Matsuzawa Y. et al., in preparation

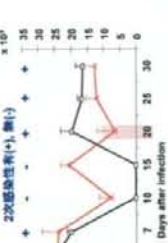
Poly I:CでHCV蛋白質を発現誘導できるマウス



HuS-E/2細胞の中系培養による血清由来HCVの培養



HCV RNA copies in culture (Ag input RNA) × 10⁶



Genotype	Day 3	Day 5	Day 7	Day 10	Day 15	Day 20	Day 25	Day 30
RCS-1	~1	~2	~3	~4	~5	~6	~7	~8
RCS-2	~1	~2	~3	~4	~5	~6	~7	~8
RCS-3	~1	~2	~3	~4	~5	~6	~7	~8
RCS-4	~1	~2	~3	~4	~5	~6	~7	~8
RCS-5	~1	~2	~3	~4	~5	~6	~7	~8
RCS-6	~1	~2	~3	~4	~5	~6	~7	~8
RCS-7	~1	~2	~3	~4	~5	~6	~7	~8
RCS-8	~1	~2	~3	~4	~5	~6	~7	~8
RCS-9	~1	~2	~3	~4	~5	~6	~7	~8
RCS-10	~1	~2	~3	~4	~5	~6	~7	~8

Aly H.H., Hijikata M. et al., BBRC, 2000

まとめ

- ✓細胞内のRNAセンサーであるRIG-IとMDA5による、二本鎖RNAの認識機構を解明した
- ✓慢性C型肝炎患者の樹状細胞ではRIG-Iの発現が更新していた
- ✓NSSAがTLRシグナルの主要なアダプターであるMyD88に結合して、シグナル伝達を遮断することを明らかにした
- ✓HCV蛋白質を誘導発現できる遺伝子改変マウスを作製した
- ✓患者血清由来のHCVを培養可能な細胞培養系を樹立した

H21年度

- ✓RIG-IのHelicaseを不活化した遺伝子改変マウスを用いて、HCVのゲノムに対するIFN応答を詳細に解析する
- ✓HCVの免疫回避と慢性化のメカニズムをさらに解析する
- ✓血清由来HCVの細胞培養系の改良を試みる

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：肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究

課題番号：H19-肝炎一般-012

研究代表者：熊田博光

I. 研究の意義

- (1) C型肝硬変でウイルス陰性化を目指した治療法がない。
- (2) C型慢性肝硬変症例での肝細胞脂肪化・インスリン抵抗性の面から発癌の阻止を目的とした研究がない。
- (3) C型慢性肝疾患症例で治癒（ウイルスの陰性化）が可能な症例と不可能な症例の指標を明確にしたガイドラインがない。
- (4) B型慢性肝疾患で日本・アジアに多いHBV genotype B, Cに最適な治療法のガイドラインがない。
- (5) B型慢性肝疾患で核酸アナログ製剤を中止してもその効果が持続するような基準がない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) C型慢性肝炎1b・高ウイルス量症例に対する72週投与法の有用性が確立しガイドラインに盛り込み行政に反映されることとなった。
- (2) C型慢性肝炎のPeg-IFN+Ribavirin併用療法とB型慢性肝炎のIFN自己注射のクリティカルパスを作成し入院から外来へのスムーズに移行した治療法の確立を行い医療費の抑制となる。
- (3) C型慢性肝炎のガイドラインにウイルス側因子(ISDR・Core aa70,aa91置換・Real-time PCR法におけるウイルス量)を盛り込みさらに治療適応の基準を絞り込み治療適応症例が明確となる。
- (4) B型慢性肝炎をHBV Genotype別に治療法を考えHBV genotype A, BはIFN、Genotype Cは核酸アナログ製剤により早期にHBe抗原・HBV DNA陰性化を得ることで肝線維化の進行を防ぎ肝硬変への進行・肝細胞癌の発生を減少させることとなる。また、HBV Core関連抗原値から核酸アナログ製剤投与中止可能症例を明確にすることにより中止後に起きる肝炎の重症化を防ぎ安全に治療を中止できる。

III. 2年間の研究成果

研究代表者

- (1) 平成19年度は、B型・C型慢性肝疾患症例の最適な治療法を年齢別、初回投与例、再治療例別に肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化（ガイドライン）を作成した。
- (2) 平成20年度は、C型肝炎はPEG-IFNとRBV併用療法の48週と72週投与の治療効果の比較、肝硬変のPEG-IFNとRBV併用療法とIFN単独療法の治療効果、PEG-IFNとRBV併用療法のクリティカルパスの作成を行った。B型肝炎は、肝硬変の各種核酸アナログ製剤使用中の発癌の有無、核酸アナログ製剤中止例の予後、de novo型急性肝炎につき研究した。これらの研究データより平成20年度のガイドラインを作成し広く全国へ浸透させた。
- (3) 新規にウイルス側因子からみたC型慢性肝炎のガイドラインの作成及びウイルス性肝硬変の包括的治療の

ガイドラインの充実を行った。(下記絵図参照)

研究分担者(岡上武)

(1)C型慢性肝炎409例の治癒(ウイルス陰性化)を目指したPEG-IFN+Ribavirin併用48週治療法の検討を行ったところ寄与するウイルス側因子は、HCV Core aa70,aa91の置換とISDRの変異数が2以上である。ことを多変量解析にて判明させた。

IV. 21年度の課題

- (1) C型慢性肝炎の Peg-IFN+Ribavirin 併用療法の無効例に対するプロテアーゼ阻害剤の治療成績を検討する。
- (2) C型肝硬変でウイルス陰性化を目指した IFN を含めた治療法を詳細に提示する。
- (3) 肝細胞脂肪化・インスリン抵抗性の面から発癌の阻止を目的とした治療法の確立をする。
- (4) B型慢性肝炎・肝硬変における核酸アナログ製剤の併用療法による肝発癌阻止を目指した治療法の確立をする。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) C型慢性肝炎 1b・高ウイルス量症例のウイルス陰性化率が50%から80%へ向上する。
- (2) C型肝硬変の 1b・高ウイルス量症例でウイルス陰性化率が30%、2a,2bで50%へ向上する。
- (3) B型肝細胞癌で死亡する人数を減少させる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

研究代表者

- (1) Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Hirakawa M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Sustained virological response reduces incidence of onset of type 2 diabetes in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008 in press
- (2) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 2007; 46: 1357-64
- (3) 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

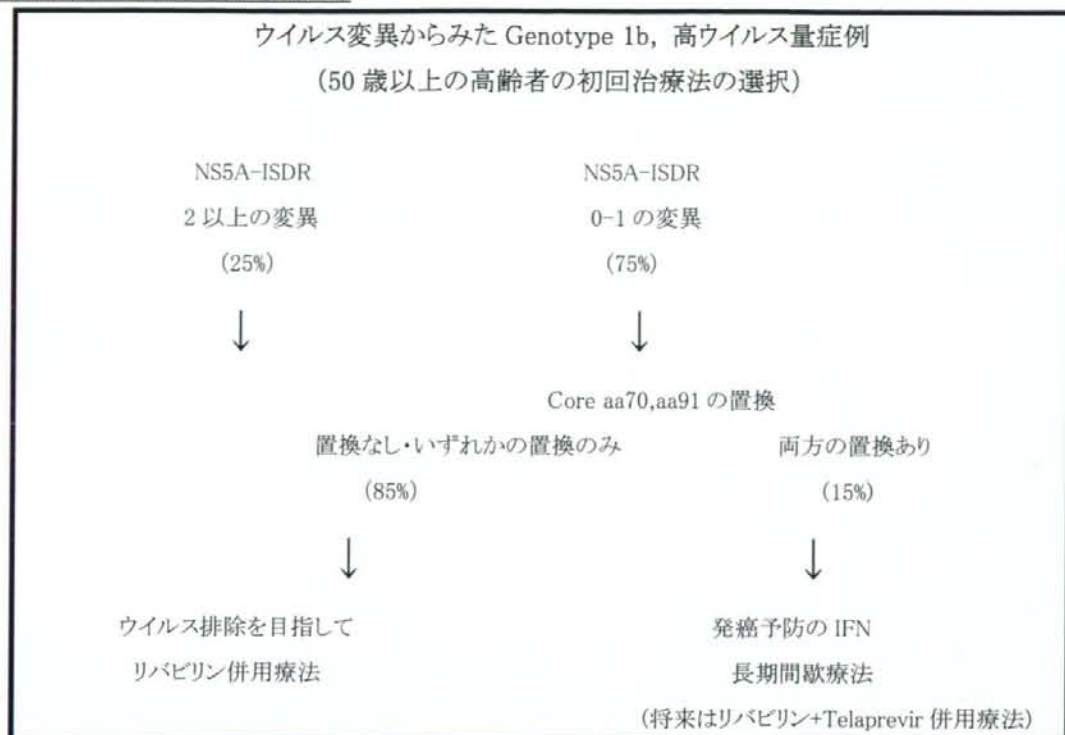
研究分担者

岡上(1)Okano T, Itoh Y, Minami M, Hashimoto H, Yasui K, Yotsuyanagi H, Takehara T, Kumada T, Tanaka E, Nishiguchi S, Izumi N, Sata M, Onji M, Yamada G, Okita K, Kumada H. Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum aminotransferase based on platelet counts. *Hepatology Research* 2008; 38:27-36

茶山(1)Tsukada H, Ochi H, Makeawa T, Abe H, Fujimoto Y, Tsuge M, Kumada H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. Polymorphism in the MAPKAPK3 gene affects interferon therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2008 in press

田中(1)Shirakawa H, Matsumoto A, Joshita S, Komatsu M, Tanaka N, Umemura T, Ichijo T, Yoshizawa K, Kiyosawa K, Tanaka E. Nagano Interferon Treatment Research Group. Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors. *Hepatology* 2008 in press

VII. III(2年間の研究成果)の概要図等



ウイルス性肝硬変に対する包括的治療のガイドライン(平成20年度案)

代償性肝硬変は、IFNを主体とした治療でウイルス排除を目指す。

非代償性肝硬変は、代償性肝硬変への転換を目標とし発癌予防を目指した治療法の選択。

1.原因ウイルスの排除及びウイルス量の減少によりALT値の正常化を目指す。

a) C型代償性肝硬変

1b・高ウイルス量

α-IFN:Smiferon

1b・高ウイルス量以外

β-IFN:Feron, α-IFN:Sumiferon

b) B型肝炎硬変

Entecavir

2.肝機能の維持(ALT値・アルブミン値を改善)し肝発癌の抑制を目指す。

a) 肝底護剤

SNMC・UDCA など

b) 分岐アミノ酸製剤

Livact

c) 瀉血療法

3.栄養療法(非代償性肝硬変)補助により肝機能の安定化を目指す。

○研究代表者の研究歴等

- ・過去に所属した研究機関の履歴 なし
- ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者) なし
- ・主な研究課題

B型及びC型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究
肝硬変を含めたウイルス性肝疾患の治療の標準化に関する研究

・これまでの研究実績

1. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Substitution of Amino Acid 70 in the Hepatitis C Virus Core Region of Genotype 1b Is an Important Predictor of Elevated Alpha-Fetoprotein in Patients Without Hepatocellular Carcinoma. *J Med Virol* 2008;80: 1354-1362
 2. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Efficacy of Low-Dose Intermittent Interferon-Alpha Monotherapy in Patients Infected With Hepatitis C Virus Genotype 1b Who Were Predicted or Failed to Respond to Pegylated Interferon Plus Ribavirin Combination Therapy. *J Med Virol* 2008; 80:1363-1369
 3. 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. *J Hepatol* 2008; 48:923-931
 4. Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Ikeda K, Kumada H. Prolonged Efficacy of Bisphosphonate in Postmenopausal Women With Osteoporosis and Chronic Liver Disease. *J Med Virol* 2008; 80:1302-1307
 5. Arase Y, Suzuki F, Sezaki H, Kawamura Y, Suzuki Y, Kobayashi M, Akuta N, Hosaka T, Yatsuji H, Hirakawa M, Kobayashi M, Ikeda K, Kumada H. Efficacy in Patients with Dose Reduction in Combination Therapy of Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C. *Intervirology* 2008; 51:1-6
 6. Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang D, Camargo A, Gupta S, Moore J, Wrobel M, Lerner J, Reich M, Chan J, Glickman J, Ikeda K, Hashimoto M, Watanabe G, Daidone M, Roayaie S, Schwartz M, Thung S, Salvesen H, Gabriel S, Mazzaferro V, Bruix J, Friedman S, Kumada H, Llovet J, Golub T. Gene Expression in Fixed tissues Outcome in Hepatocellular Carcinoma. *New Engl J Med* 2008; 359(19): 1995-2004
 7. Kobayashi M, Ikeda K, Arase Y, Suzuki F, Akuta N, Hosaka T, Sezaki H, Yatsuji H, Kobayashi M, Suzuki Y, Watahiki S, Mineta R, Iwasaki S, Miyakawa Y, Kumada H. Resurgence of Acute and Consequent Chronic Infections with Hepatitis B Virus in Japan. *J Med Virol* 2008; 80:1880-1888
 8. Kawamura Y, Arase K, Ikeda K, Suzuki F, Suzuki Y, Kobayashi M, Akuta N, Hosaka T, Sezaki H, Yatsuji H, Kobayashi M, Kumada H. The Efficacy of Short-term Interferon-beta Therapy for Chronic Hepatitis C Patients with Low Virus Load. *Internal Medicine* 2008; 47:355-360
 9. Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Yatsuji H, Sezaki H, Arase Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Kumada H. Changes in viral loads of lamivudine-resistant mutants during entecavir therapy. *Hepatol Res* 2008; 38:132-140
 10. Suzuki F, Toyoda J, Katano Y, Sata M, Moriyama M, Imazaki F, Kage M, Seriu T, Omata M, Kumada H. Efficacy and safety of entecavir in lamivudine-refractory patients with chronic hepatitis B: Randomized controlled trial in Japanese patients. *J Gastrl Hepatol* 2008; 29(9):1-7
 11. Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Hirakawa M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Sustained virological response reduces incidence of onset of type 2 diabetes in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008 in press
 12. Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. A matched case-control study of 48 and 72 weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1b in Japan: Amino acid substitutions in HCV core region as predictor of sustained virological response. *J Med Virol* 2008 in press
 13. Sezaki H, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H. Poor Response to Pegylated Interferon and Ribavirin in Aged Women Infected with Hepatitis C Virus of Genotype 1b in High Viral Loads. *Dig Dis Sci* 2008 in press
- 知的財産権の取得及び申請状況:なし