

前後の replicon 細胞における HSP90 タンパク発現の変化について、western blot 法で確認をした。その結果、Ritonavir 処理後の HSP90 タンパクの減少が見られた。

D. 考察

1). In silico screening system を用いた NS3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物

In silico screening のヒット化合物 2 種の共通構造を基に、再度の In silico screening および In silico による化合物のデザインに行った。その結果、HCV71_con_CG1 と名付けた化合物は、1 回目の In silico screening のヒット化合物 2 種より、高い HCV 増殖抑制効果が得られた。しかし、selectivity index が 11~18 と治療薬候補となるまでの数値には達していなかった。現在、更なる最適化を行うための情報を得るため、化合物と NS3 protease の共結晶構造解析を行っている。

2). AIDS 治療薬 Ritonavir による HCV 増殖抑制効果

HIV protease 阻害剤の抗 HCV 効果について検討したところ、Ritonavir が HCV 増殖抑制効果が高かった。いくつかの 1b 型の replicon 細胞における EC₅₀ は、実際臨床で使われている投与量における、血液中の濃度と同程度のものであった。

その作用機序であるが、今回の実験から、Ritonavir 処理により、replicon 細胞の HSP90 タンパクの減少。その結果、HCV 複製複合体が不安定となり、ウイルス RNA の複製・増殖が低下することによるものと考えられる。現在、さらなる解析を行っている。

E. 結論

- 1). In silico screening のヒット化合物 2 種の共通構造を基に、デザインされた化合物 HCV71_con_CG1 は、基となった 2 つの化合物より、高い抗 HCV 効果を有した。
- 2). HIV protease 阻害剤 Ritonavir が抗 HCV 活性を有することを見出した。その作用機序は、Ritonavir による HSP90 タンパクの発現抑制によるものと示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ogawa Y, Kawamura T, Kimura T, Ito M, Blauvelt A, Shimada S.

Gram-positive bacteria enhance HIV-1 susceptibility in Langerhans cells, but not in dendritic cells, via Toll-like receptor activation

Blood. 2009 113 :5157-66

2. 学会発表

山下篤哉、高柳覚、何麗敏、松本武久、上條加寿恵、前川伸哉、坂本直哉、山本直樹、榎本信幸、伊藤正彦

HIV-1 Protease inhibitor Ritonavir による C 型肝炎ウイルスの増殖抑制効果とその機序の解明

第 19 回抗ウイルス療法研究会、東京、平成 21 年 6 月

山下篤哉、松本武久、高谷大輔、上條加寿恵、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、池田正徳、加藤宣之、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦

In silico screening による HCV NS3 プロテアーゼ阻害化合物の検索(第 2 報)

第 57 回日本ウイルス学会、東京、平成 21 年
10 月

松田泰嘉、谷英典、藤田統、古田篤史、常田
聡、秋光信佳、田中淳一、前川信哉、
榎本信幸、山下篤哉、伊藤 正彦、関口 勇地、
野田 尚宏

海洋生物抽出液ライブラリーからのC型肝炎ウ
イルス NS3 helicase 活性阻害物質の探索

第 57 回日本ウイルス学会、東京、平成 21 年
10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 抗 NS3 Protease 阻害剤 候補化合物の抑制効果のまとめ

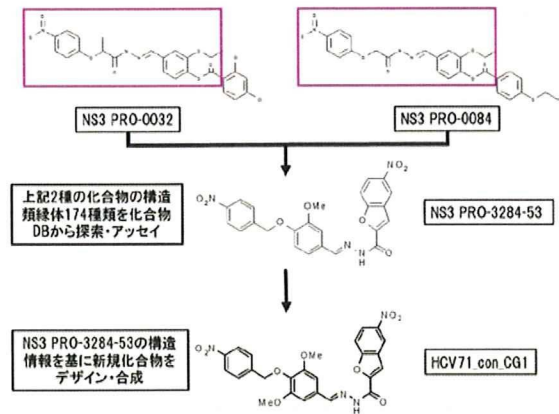
	EC ₅₀	CC ₅₀	SI (CC ₅₀ /EC ₅₀)	NS3 protease activity at 100μM (% of control)
NS3 PRO 0020	3 _μ M	15 _μ M	5	11
NS3 PRO 0027	18 _μ M	101 _μ M	5.6	54
NS3 PRO 0028	3 _μ M	41 _μ M	13	24
NS3 PRO 0032	13 _μ M	116 _μ M	9	38
NS3 PRO 0034	25 _μ M	60 _μ M	2.5	38
NS3 PRO 0048	0.7 _μ M	3 _μ M	4.3	23
NS3 PRO 0050	4.6 _μ M	15 _μ M	3.3	31
NS3 PRO 0067	14 _μ M	28 _μ M	2	9
NS3 PRO 0071	14 _μ M	37 _μ M	3	41
NS3 PRO 0078	2.7 _μ M	233 _μ M	86	56
NS3 PRO 0084	23 _μ M	149 _μ M	6.5	43

EC₅₀ : 50% effective concentration CC₅₀ : 50% cytotoxicity concentration
SI : Selectivity Index (CC₅₀/ EC₅₀)

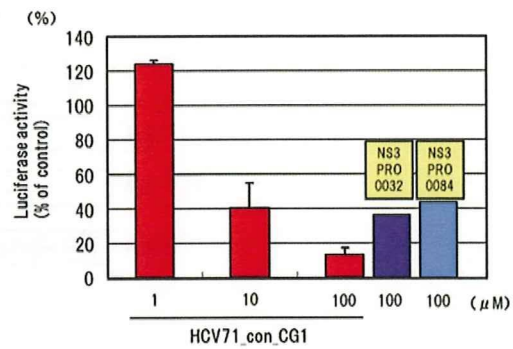
表2 Subgenome replicon細胞 及びFull genome replicon細胞における
化合物HCV71_con CG1のHCV複製・増殖抑制効果

HCV strain (1b)	Replicon cells	EC ₅₀ (_μ M)	CC ₅₀ (_μ M)	Selectivity Index
Subgenome replicon				
HCV-N	HCV/Rep Feo	8.4±0.6	150.5±6.3	18
Con1	Huh7 Lunet/ Con1 LUN Sb #28	5.8±2.1	81.2±2.3	14
HCV-O	Huh7#94/ ORN 3-5B #24	4.4±0.3	44.0±6.8	11
Full genome replicon				
HCV-O	OR6	3.6±0.4	61.0±4	17
.....				
HCV-N	HCV/Rep Feo			
	NS3 PRO 0032	13	116	9
	NS3 PRO 0084	23	149	6.5

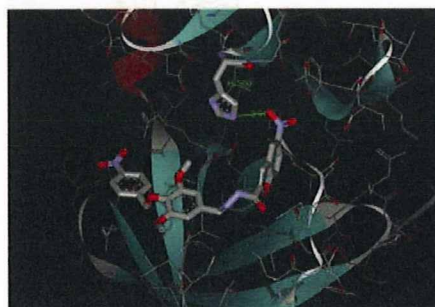
I-図1
誘導体作製の流れ



I-図2
In vitro NS3 protease assay
における化合物 HCV71_con.CG1
の抑制効果



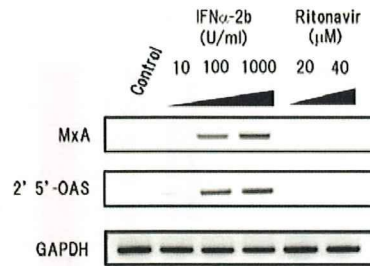
I-図3
HCV NS3 protease に対する化合物 HCV71_con.CG1 の結合状態の予想



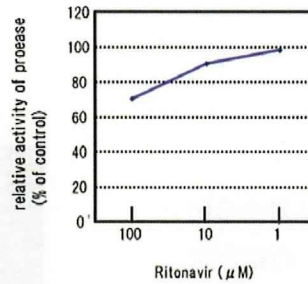
II-表1 Subgenome replicon細胞 及びFull genome replicon細胞における RitonavirのHCV複製・増殖抑制効果

HCV strain (1b)	Replicon cells	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	SI
Subgenome replicon		AIDS治療の際の血液濃度 (5 μM~15 μM 最大48 μM)		
HCV-N	Huh7/Rep-Feo (Huh7)	15.97 ± 2.36	63.02 ± 4.61	3.9
Con1	Huh7 Lunet/ Con1 LUN Sb #15 (Huh7 Lunet)	7.75 ± 0.83	57.28 ± 2.48	7.4
HCV-O	Huh7#94/ ORN 3-5B #24 (Huh7 #94)	6.86 ± 0.25	54.14 ± 3.65	7.9
Full genome replicon				
HCV-O	OR6 (Huh7 Oc)	9.59 ± 0.22	28.13 ± 0.30	3.0

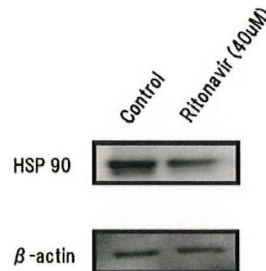
II-図1 Ritonavir の Interferon の誘導能の有無



II-図2 Ritonavir の HCV NS3 protease の抑制効果の有無



II-図2 Ritonavir 処理による replicon 細胞の HSP90 タンパク発現の変化



厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策事業)

分担研究報告書

薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態解明と対策に関する研究

分担研究者 松本 武久

独立行政法人理化学研究所

生命分子システム基盤研究領域システム研究チーム上級研究員

研究要旨

HCV の NS2/3 プロテアーゼを薬剤標的にして、その活性ポケット部位の立体構造情報に基づいて、コンピューター上 (in silico) でプロテアーゼ活性部位に結合する化合物を探索した。NS2/3 プロテアーゼタンパク質は大腸菌で大量に発現するが、封入体を形成し不溶化するため、その巻き戻し条件を複数検討したが、好条件を発見することはできなかった。細胞レベルでの阻害剤アッセイ系を確立するため、NS2/NS3/NS4A 下流に GAL4 結合ドメインと VP-16 との融合タンパク質を発現する遺伝子を導入した細胞を現在、製作中である。

A. 研究目的

既存の治療に耐性の HCV に対しても有効な新規薬剤で、且つ C 型肝炎患者に経済的負担を強いる高価なインターフェロンに代わる安価な低分子化合物薬を開発する。

B. 研究方法

HCV の NS2/3 プロテアーゼを薬剤標的にして、その活性ポケット(触媒部位)の立体構造情報(PDB ID: 2HD0)に基づいて、コンピューター上 (in silico) で触媒部位に結合する化合物を探索した。触媒部位 C 末端の Leu217 の誘導適合を仮定し、Leu217 をフィンガープリントとすることに加え、疎水ポケットをみたす医薬品(セリンプロテアーゼ subtilisin の阻害剤である Eglin-C、等)をフィンガープリントとすることで、前年度の in silico スクリーニングで探索してきた 56 種類の化合物の NS2/3 プロテアーゼ活性ポケットへのバーチャルドッキングを実施

し、化合物の阻害剤としての妥当性を評価した。

N 端の膜貫通ドメインを欠如した NS2 と NS3 プロテアーゼドメインとの融合タンパク質(904-1206 a.a.)を大腸菌で封入体を形成させたまま発現させ、一旦、塩酸グアニジンでアンフォールディング状態で可溶化して精製した後、NS2/3 プロテアーゼの活性化体構造を得るため、複数の巻き戻し条件を検討した。巻き戻し条件には、界面活性剤と高重合度シクロアミロースを用いる方法、還元剤 DTT 存在下でのグルタチオン酸化還元システムを用いる方法、高濃度尿素でアンフォールディング状態のまま可溶化した後、DTT 存在下で尿素を除去する方法を試行した。また、大腸菌抽出液あるいは小麦胚芽抽出液を利用したセルフリータンパク質発現系で、NS2 と NS3 プロテアーゼドメインとの融合タンパク質の合成条件を検討した。

また細胞レベルでの阻害剤アッセイ系を確立するため、NS2/NS3/NS4A 下流に GAL4 結合ドメインと VP-16 との融合タンパク質を発現させるためのコンストラクトを作製した。

C. 研究結果

NS2/3 プロテアーゼの活性ポケットに水素結合し、またその近傍の 2 箇所の疎水ポケットと相互作用すると予測される化合物のドッキング結果を基に前年度に入手した 56 種類の化合物が、触媒部位 C 端の Leu217 をフィンガープリントに、また疎水ポケットをみたく医薬品をフィンガープリントにした探索法でも、NS2/3 プロテアーゼ阻害剤として有望であることを確認した。

大腸菌で発現させ、封入体からアンフォールディング状態で可溶化した NS2/3 プロテアーゼタンパク質が、プロテアーゼ活性を示すような巻き戻し条件を得ることはできなかった。また大腸菌抽出液あるいは小麦胚芽抽出液を利用したいずれのセルフリータンパク質発現系でも、目的とするタンパク質の発現を観察することはできなかった。

NS2/NS3/NS4A 下流に GAL4 結合ドメインと VP-16 との融合タンパク質を発現するコンストラクトを作製したので、Huh-7 細胞に導入し、細胞レベルでの阻害剤アッセイ系を完成させる予定である。

D. 考察

NS2/3 プロテアーゼタンパク質の巻き戻し条件を決定できなかったこと、またセルフリータンパク質発現系でも NS2/3 プロテアーゼタンパク質を発現する条件を得られなかったことから *in silico* で探索してきた化合物の NS2/3 プロテアーゼ阻害活性の評価には細胞レベルでのアッ

セイ系を利用することが不可欠と考えられる。今後、NS2/NS3/NS4A 下流に GAL4 結合ドメインと VP-16 との融合タンパク質を発現する遺伝子を Huh-7 細胞に導入し、細胞レベルでの阻害剤アッセイ系を完成させる予定である。

E. 結論

大腸菌で発現させた NS2/3 プロテアーゼタンパク質の巻き戻し条件を得ることはできなかった。またセルフリータンパク質発現系でも NS2/3 プロテアーゼタンパク質を発現できなかった。

in silico で探索してきた化合物の NS2/3 プロテアーゼ阻害活性の評価には細胞レベルでのアッセイ系が不可欠である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

山下篤哉、松本武久、高谷大輔、上條加寿恵、前川伸哉、雨宮史武、坂本直哉、池田正徳、加藤宣之、梅山秀明、横山茂之、榎本信幸、伊藤正彦「*In silico* screening による HCV NS3 プロテアーゼ阻害化合物の検索 (第 2 報)」第 57 回日本ウイルス学会学術集会 / 東京. 2009 年 10 月. 発表形式:ポスター

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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事業)

分担研究報告書

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

分担研究者 朝比奈 靖浩

武蔵野赤十字病院 消化器科 部長

研究要旨

【目的】PEG-IFN/ribavirin(RBV)併用療法の約20%は治療中HCVが減衰しない不応例(NVR)であるが、この機序は不明で治療前予測も困難である。HCV 排除には細胞内ウイルスセンサー RIG-I とアダプター分子 IPS-1 を介する自然免疫が重要であり、HCV は IPS-1 を標的として自然免疫から逃避することが in vitro で示されている。しかし RIG-I/IPS-1 系およびその調節因子と、治療効果さらに HCV 変異との関連は不明であり、臨床的意義は未解明である。今回臨床検体を用いこれらを検討した。【方法】PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した C 型慢性肝炎例を対象とし、治療直前の生検肝組織における RIG-I、IPS-1、MDA5、LGP-2、特異的 ubiquitin-E3 ligase (RNF125)、ubiquitin 様修飾蛋白(ISG15)やその解離分子(USP18)の mRNA 発現を RTD-PCR 法により定量し、HCV 変異および治療効果との関連を検討し、さらに治療中の末梢血単核球(PBMC)中の遺伝子発現を経時的に解析した。【成績】C 型慢性肝炎における IPS-1 以外の肝内発現量は、非 HCV 肝疾患に比し 2-8 倍高値で、PEG-IFN/RBV 投与により 6 から 102 倍の PBMC 中の誘導を認めた。RIG-I、MDA5、LGP-2、ISG15 および USP18 は、NVR 群で SVR 群に比し有意に 1.5-4 倍高発現していたが、IPS-1 と RNF125 は NVR 群で有意に低発現で、特に RIG-I/IPS-1 比または RNF125 比は NVR と関連を認めた(NVR: SVR=1.3:0.4, 2.3:0.8)。一方、HCV コア変異(R70Q、L91M)も NVR に関与していたが、多変量解析では ISG15 または USP18 発現および RIG-I/IPS-1 比と血小板数が NVR に関与する有意因子であった。ROC 解析では ISG15、USP18 発現および RIG-I/IPS-1 比の Az は 0.9 以上で、治療効果予測に有用であった。PBMC 中の RIG-I、ISG15 の PEG-IFN/RBV 投与中の発現誘導は NVR 例に比し SVR 例で高かった。【結論】PEG-IFN/RBV 療法 NVR では治療前の肝内 RIG-I、ISG15、USP18 発現が亢進していたが、IPS-1 および RNF125 発現は低値であった。RIG-I/IPS-1 系の遺伝子発現は HCV 抵抗性と密接に関与しており、これらの解析は治療効果予測に有用と考えられた。

A. 研究目的

(1) HCV 1b 型における PEG-interferon (IFN) /ribavirin(RBV)併用療法の約 20%は null responder で抵抗性を示す。しかし、本治療開始前における効果予測は困難で、また治療抵抗性の機序も不明である。

(2) これまでの in vitro の検討から HCV 排除には自然免疫系、特に RIG-I/IPS-1 系の関与が重要と考えられていたが、臨床的意義は明らかでなかった。

(3) 難治例に対する対策を講じるために、これら自然免疫系の要因とウイルス学的要因の関連を解明する。

B. 研究方法

(1) PEG-IFN/RBV 治療例において自然免疫系遺伝子の肝内発現と治療効果を解析する。

(2) PEG-IFN/RBV 治療例において自然免疫系遺伝子の抹消血単核球 (PBMC) 中における経時的発現動態と治療効果を解析する。

(3) これら自然免疫要因と HCV genotype や変異などウイルス要因との関連を解明する。

(倫理面への配慮)

所属施設の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

(1) 実際に治療を行っている genotype 1b の臨床例での RIG-I 系および IFN 誘導遺伝子の肝内発現は難治例で有意に高かった。

(2) この肝内発現を解析することで難治例の治療前予測が可能となった。

(3) PEG-IFN/RBV 投与中の RIG-I などの IFN 誘導遺伝子の末梢血単核球中における発現動態は著効例で強く誘導され、難治例では PEG-IFN/RBV による発現誘導が低かった。

(4) これら genotype 1b で見出された結果は、

genotype 2 の難治例でも同様であった。

(5) これら難治例における RIG-I 系および IFN 誘導遺伝子の肝内高発現は、HCV コア変異とは独立して NVR に関与していた。

D. 考察

PEG-IFN/RBV 併用療法の難治例では、治療前の肝内自然免疫系発現が亢進していた。これは内因性 IFN による IFN 誘導遺伝子の発現誘導が、難治例では高いためと考えられた。一方、外因性 IFN によるこれらの遺伝子誘導は、難治例では低く外因性 IFN への遺伝子発現段階における不応性が難治要因に関与していると考えられた。

そして、これら自然免疫系遺伝子や IFN 誘導遺伝子の不応性は難治要因を規定する HCV 変異とは独立して関与していることが分かった。従って、難治性 C 型肝炎を克服するためには、IFN 誘導の不応性に対する対策と、ウイルス変異によりもたらされる難治要因への対策が別個に必要と考えられた。

E. 結論

宿主自然免疫系は C 型慢性肝炎における難治要因に関連しており、宿主自然免疫系の解析は難治例の予測と難治性の機序の解明に有用で、同病態を標的とした新規治療の開発や難治例の克服に重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

朝比奈靖浩「ペグインターフェロン・リバビリン併用療法の難治要因」医学のあゆみ 229、77、2009

朝比奈靖浩、泉並木「C型慢性肝炎に対するペグインターフェロンとリバビリン併用療法における治療成績と難治例に対する対策」消化器科、49、91、2009

2. 学会発表

第45回日本肝臓学会総会 コンセンサスマーケティング(肝臓 50・A41・2009)

第13回日本肝臓学会大会 シンポジウム(肝臓 50・A420・2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

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21年度)

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班

分担研究者 今村 道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 助教

研究要旨： ヒト肝細胞キメラマウスにC型肝炎ウイルス(HCV)陽性患者血清を投与し、HCV感染マウスを作製した。HCV感染マウスにprotease 阻害剤 (telaprevir, 200 mg/kg, 1日2回)あるいはRNA polymerase 阻害剤(MK-0609, 3 mg/kg, 1日2回)を単独あるいは併用投与した。両薬剤とも単独投与にて著明にマウス血中HCV RNAを低下させたが、投与中、それぞれに耐性ウイルス(NS3領域のV36A変異ウイルス, NS5B領域のS282T変異ウイルス)が出現し、HCV RNA値の再上昇を認めた。両薬剤を併用投与したところ、投与2週後にはHCV RNAは感度以下まで低下し、投与中の耐性ウイルスの出現が予防された。Telaprevirに高用量のMK-0609(50 mg/kg)を4週間併用投与したところ、投与1週後にHCV RNAは感度以下に低下し、観察した投与終了18週後まで再上昇を認めず、おそらく完全排除されたものと思われた。これらの結果から異なるHCV蛋白を標的とした薬剤を組み合わせることにより、インターフェロン製剤を使用せずともHCVを感染排除することが可能であることが示唆された。

A. 研究目的

近年、HCV蛋白を標的とした治療薬の開発および臨床試験が進行している。これらの薬剤は強力な抗ウイルス作用を有する反面、単独治療では短期間に耐性ウイルスが出現しやすいという問題点がある。本研究において、HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いてprotease阻害剤およびRN polymerase阻害剤の単独および併用投与における抗ウイルス効果、耐性株出現を検討した。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスにgenotype 1b型HCV患者血清を静脈内投与し、HCV感染を惹起した。これらHCV感染マウスに28日間、telaprevir(200 mg/kg, 1日2回, 連日経口投与:), MK-0609(3 mg/kg, 1日2回, 連日経口投与:)単独および両者を併用投与し、マウス血中HCV RNA量の測定およびNS3, NS5B領域のアミノ酸配列を解析した。

C. 結果

血中HCV RNAは、telaprevir単独投与群(n=4)では、投与3日後に 2 ± 0.6 log低下

したが、1頭のマウスで投与中、HCV RNAの再上昇を認め、NS3領域にtelaprevir耐性であるV36A変異が検出された。MK-0609単独投与(3 mg/kg, 1日2回)群(n=4)では投与3日後に 2.4 ± 0.8 log低下したが、2頭のマウスで投与中HCV RNAの再上昇を認め、NS5B領域にMK-0609耐性であるS282T変異が検出された。Telaprevir/MK-0609併用投与群(n=3)では投与3日後にHCV RNAは 4.8 ± 0.2 log, 14日後には検出限界以下まで低下し、単独療法に比べ、より強力な抗ウイルス効果を認めた。また併用投与群では、投与中、HCV RNAの再上昇は認めなかった。

さらにtelaprevirと高用量のMK-0609(50 mg/kg)を4週間併用投与したところ(n=5), すべてのマウスにおいてHCV RNAは投与1週後に検出感度以下に低下し、観察した投与終了18週後まで再上昇を認めず、おそらく完全排除されたものと思われた。

D. 考察

TelaprevirおよびMK-0609とも単独投与では耐性ウイルスの出現を認めたが、標的の異なるこれら2剤を併用することにより、耐性ウイルスの出現が予防され、より強い抗ウイルス効果を認めた。さらにはHCVの完全排除も可能であった。今後、各種抗ウイルス薬を併用投与することで更なる治療効果の向上が期待される。

E. 結論

HCV蛋白を標的とした抗ウイルス剤を

併用投与することにより、IFNを使用せずともHCVの排除が可能であることが示された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Mori N, Imamura M, Kawakami Y, Saneto H, Kawaoka T, Takaki S, Aikata H, Takahashi S, Chayama K. A randomized trial of high-dose interferon- α -2b combined with ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 81:640-9, 2009
- Noguchi C, Imamura M, Tsuge M, Hiraga N, Mori N, Miki D, Kimura T, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. G to A hypermutation in hepatitis B virus and clinical course of patients with chronic hepatitis B. *J Infect Dis* 199:1599-607, 2009
- Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hatakeyama T, Tsuge M, Kitamura S, Kimura T, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Fujimoto Y, Takahashi S, Nakamura Y, Kumada H, Chayama K. Effects of structural variations of APOBEC3A and APOBEC3B genes in

- chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 23, 1159-68, 2009
- Matsumura T, Hu Z, Kato T, Dreux M, Zhang YY, Imamura M, Hiraga N, Juteau JM, Cosset FL, Chayama K, Vaillant A, Liang TJ. Amphipathic DNA Polymers Inhibit Hepatitis C Virus Infection by Blocking Viral Entry. *Gastroenterology* 137:673-81, 2009
 - Ohira M, Ishiyama K, Tanaka Y, Doskali M, Igarashi Y, Tashiro H, Hiraga N, Imamura M, Sakamoto N, Asahara T, Chayama K, Ohdan H. Adoptive immunotherapy with liver allograft-derived lymphocytes induces anti-HCV activity after liver transplantation in humans and humanized mice. *J Clin Invest* 119:3226-35, 2009
 - Hiraga N, Imamura M, Hatakeyama T, Kitamura S, Mitsui F, Tanaka S, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tatenno C, Yoshizato K, Wakita T, Chayama K. Absence of viral interference and different susceptibility to interferon between hepatitis B virus and hepatitis C virus in human hepatocyte chimeric mice. *J Hepatol* 51:1046-54, 2009
- ## 2. 学会発表
- 今村道雄, 平賀伸彦, 茶山一彰. HCV Core, ISDR のアミノ酸変異と PEG-IFN+リバビリン療法の治療成績および HCV 感染モデルマウスを用いたウイルス学的検討. 第 45 回日本肝臓学会総会 神戸 平成 21 年 6 月 4 日.
 - 今村道雄, 平賀信彦, 茶山一彰. HCV の Core 領域および ISDR 変異からみた治療戦略. 第 13 回日本肝臓学会大会 京都 平成 21 年 10 月 14 日.
 - Michio Imamura, Nobuhiko Hiraga, Eiji Iwao, et al. Telaprevir treatment to a human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus infection. 10th AASLD, Boston, 平成 21 年 10 月 30 日.
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- 今回の研究内容については特になし

厚生労働科学研究費補助金(肝炎等克服緊急対策研究事業)
分担研究報告書

マウスモデルによるB型慢性肝炎の病態解析
分担研究者 中本 安成 金沢大学附属病院消化器内科 講師

研究要旨： 慢性肝炎から発がんに至るB型肝炎マウスモデルを用いて、慢性炎症およびがん化過程のそれぞれに関わる宿主因子の相互関係について検討した。慢性炎症の誘導はCD8陽性細胞障害性Tリンパ球（CTL）が直接関与していた。経時的観察において、慢性肝炎の前期には炎症反応や細胞障害・再生に関与する遺伝子群の変動が観察された。後期になると遺伝子の転写に関わる一群が有意に変動した。さらに、発がん期には腫瘍組織特有な遺伝子群が検出されたが、約60%は肝炎の前期と共通していた。これより、CTLが誘導する慢性肝炎に伴って宿主因子の相互作用が惹起され、がん化への分子病態が構築されていく過程が示された。

A. 研究目的

薬剤耐性HCV・HBV持続感染において発がんを抑制する新規の標的治療を開発する目的で、B型慢性肝炎モデルを用いて慢性炎症が誘導する発がん関連因子を同定した。特に、慢性炎症および発がん過程のそれぞれに関わる宿主因子の相互関係について検討した。

B. 研究方法

B型肝炎ウイルス（HBV）トランスジェニックマウスモデル（Nakamoto et al. ; J. Exp. Med. 196:1105, 2002; Cancer Res. 64:3326, 2004 & J. Exp. Clin. Cancer Res. 25:55, 2006）において、慢性肝炎を誘導するCTLの作用について経時的に得られた肝組織中の炎症細胞をフローサイトメトリー法にて定量した。

肝組織の包括的遺伝子発現プロファイルをDNAチップ、Real-time 定量的RT-PCR法にて解析した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物愛護と動物福祉の観点から適切な配慮を行うため、各法令に基づき当該研究を実施する。また、本学の倫理委員会あるいは実験動物委員会の審査と承認を得て行う。

C. 研究結果

1)慢性肝炎の全経過において、HBV特異的な細胞障害性Tリンパ球(CTL)が検出された。

2)モデルでの慢性肝炎の前期(～6ヵ月)、後期(9～12ヵ月)、発がん期(15～18ヵ月)において包括的に発現遺伝子を解析した。

3)前期には、炎症反応や細胞障害・再生に

関与する遺伝子群の変動が観察された。

4) 後期には、組織学的に前がん結節が出現するとともに、リボゾームやRNAポリメラーゼなどの遺伝子の転写に関わる一群が有意に変動した。

5) 発がん期には、腫瘍組織で有意な変化を示す遺伝子群が検出されたが、約60%は肝炎の前期と共通していた。さらに、炎症と相関しないがん組織にユニークな遺伝子群が同定された。

D. 考察

本モデルにおける慢性肝炎は、HBV特異的なCTLを移入することによって発症する。発症後の経過における検討から、がん化に至る全過程でCTLが検出されることが明らかとなり継続的に関与していることが示唆された。

慢性肝炎の遺伝子発現プロファイルを経時的に観察することによって、慢性炎症の単純な持続ではなく時間の経過とともに分子病態の特徴が変化していく様子が観察された。さらに、その結果として構築される発がん病態の特徴が示された。

発がんの分子病態においては、がん組織に特異的な遺伝子が検出された。その上、慢性肝炎の経過と併せて検討することによって、炎症と相関する遺伝子群に加えて、炎症と相関しないがん組織にユニークな遺伝子群が同定され、新たな概念に基づく標的分子が含まれる可能性が示唆された。

E. 結論

薬剤耐性の肝炎において、ウイルス特異的な慢性炎症が一連の宿主因子の変動を惹起し、がん化の分子病態が構築されていくことが示された。

F. 健康危機情報

特になし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 2009 (in press).

2. Wu Y, Wang YY, Nakamoto Y, Li YY, Baba T, Kaneko S, Fujii C, Mukaida N: Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in liver. *Oncogene* 2009 (in press).

3. Baba T, Nakamoto Y, Mukaida N: Crucial contribution of thymic Sirp α^+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J.*

Immunol. 183: 3053-3063, 2009.

3. その他： なし

2. 学会発表

1. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: #1725; Immunological factors associated with prolonged recurrence-free survival following transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; 第 60 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 50 (4, Suppl.) 1103A; 一般; poster: Nov. 3, 2009

2. Shugo H, Ohmura M, Naka K, Nakamoto Y, Kaneko S, Hirao A: #1280; Identification of hepatic stem cells by monitoring of nucleostemin promoter activity.; 第 60 回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 50 (4, Suppl.) 896A; 一般; poster: Nov. 1, 2009

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

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

C型肝炎ウイルスのインターフェロン耐性及びリバビリン耐性の分子機構、
とくに NS5A 機能と耐性機構の研究

分担研究者 堀田 博 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野

研究要旨: 我々はこれまでに、C型肝炎ウイルスサブタイプ 1b(HCV-1b)の非構造タンパク質 NS5A の IRRDR(aa 362~407)と名付けた領域のアミノ酸配列の多様性がペグインターフェロン(Peg-IFN)/リバビリン併用療法に対する感受性または抵抗性と相関することを報告してきた。本研究では、HCV-1b 以外のサブタイプ、とくに HCV-2a や HCV-2b について、IRRDR を含む NS5A の多様性と IFN 感受性/抵抗性との相関について比較検討した。

HCV-2a では、IRRDR の変異数が 2 以上($IRRDR[2a] \geq 2$)のウイルスは、治療終了後 24 週間の経過観察後もウイルス陰性である症例(sustained virological response; SVR)の 94%(17/18)に、また、Non-SVR の 6%(1/18)に見出された。一方、 $IRRDR[2a] \leq 1$ は SVR の 40%(2/5)、Non-SVR の 60%(3/5)に見られ、 $IRRDR[2a] \geq 2$ と $IRRDR[2a] \leq 1$ の間の差異は統計学的に有意であった。また、ISDR の C 末端部分と PKR 結合領域の一部を含む領域($ISDR+C[2a]$)の変異数を指標に解析すると、 $ISDR+C[2a] \geq 1$ の症例はすべて SVR(14/14)であった。一方、変異の見られない症例($ISDR+C[2a]=0$)は SVR の 56%(5/9)、Non-SVR の 44%(4/9)に見られ、 $ISDR+C[2a] \geq 1$ と $ISDR+C[2a]=0$ の間の差異は統計学的に有意であった。多変量解析により、 $IRRDR[2a] \geq 2$ が SVR の独立予測因子であることが示された。HCV-2b においては、IRRDR の N 末端領域($IRRDR/N[2b]$)の変異数を指標に解析すると、 $IRRDR/N[2b] \geq 2$ の症例では全例(10/10)で治療開始後 4 週間以内にウイルス消失(rapid virological response; RVR)が見られた。一方、 $IRRDR/N[2b] \leq 1$ は RVR の 45%(5/11)、Non-RVR の 55%(6/11)に見られ、 $IRRDR/N[2b] \geq 2$ と $IRRDR/N[2b] \leq 1$ の間の違いは統計学的に有意であった。しかし、 $IRRDR/N[2b] \geq 2$ と SVR の有意の相関は認められなかった。以上の結果より、HCV-2a や HCV-2b においても、IRRDR 相当領域($IRRDR[2a] \geq 2$ 、 $IRRDR/N[2b] \geq 2$)や ISDR 近傍領域($ISDR+C[2a] \geq 1$)等の NS5A アミノ酸配列の多様性が Peg-IFN/リバビリンの治療効果と相関し、とくに $IRRDR[2a] \geq 2$ は SVR 予測因子として有用であると考えられた。また、 $IRRDR[2a] \leq 1$ や $IRRDR/N[2b] \leq 1$ の症例では、HCV-2a/2b の標準治療期間である 24 週間より長期間の Peg-IFN/リバビリン投与を推奨する必要があると考えられた。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) による慢性肝炎の標準的治療法としてペグインターフェロン (Peg-IFN) とリバビリンの併用療法が用いられており、かなりの症例でウイルスの完全排除 (SVR) が得られるようになってきた。しかし、HCV サブタイプ 1b (HCV-1b) 高ウイルス血症の症例では、なお半数近い症例でウイルスの完全排除が望めない (Non-SVR)。また、比較的 IFN 治療に感受性が高いといわれる HCV-2a や HCV-2b の症例でも、20%~30%の症例が Non-SVR であると報告されている。治療抵抗性を規定する因子は患者側とウイルス側の双方にあると考えられるが、その具体的な指標の全容は未だ明確ではない。

我々はこれまでに、Peg-IFN/リバビルン併用療法によるウイルス排除と関連するウイルス側の因子として、HCV-1b 非構造タンパク質 NS5A の特定領域 (IRRDR; IFN/ribavirin resistance-determining region; aa 362~407) のアミノ酸配列の多様性が関与することを報告してきた^{1,2)}。同様に、NS5A の中央部に ISDR (IFN sensitivity-determining region; aa 237~276) とよばれる IFN 感受性と関連するアミノ酸配列が存在すること³⁾や、コアタンパク質の 70 位及び 91 位のアミノ酸残基の多様性が Peg-IFN/リバビルン治療応答性と関連する可能性があることも報告されている⁴⁾。一方、HCV-1b 慢性肝炎患者の Peg-IFN/リバビルン併用療法の不応答性を規定する宿主側因子として、

IL28B 遺伝子の single nucleotide polymorphisms (SNPs) の重要性が最近報告された⁵⁻⁷⁾。

このように、HCV-1b については治療応答性や不応答性と関連する因子が明らかにされつつあるが、HCV-2a や HCV-2b については、そのような解析は未だ十分にはなされていない。

本研究では、HCV-2a や HCV-2b について、Peg-IFN/リバビルン併用療法に対する感受性または抵抗性を規定するウイルス側の因子、とくに NS5A の IRRDR や ISDR の多様性について検討した。

B. 研究方法

1) 患者 : HCV-2a 及び HCV-2b 感染慢性肝炎の治療のため、24 週間の Peg-IFN/リバビルン併用療法を受け、その後 24 週間の経過観察により治療効果を判定できた患者 40 名。Peg-IFN/リバビルン併用療法後 24 週間の経過観察により、ウイルス陰性者 (SVR) と陽性者 (Non-SVR) に分類した。同様に、治療開始後 4 週間でウイルス消失が見られた rapid virological response (RVR) と Non-RVR に分類した。RVR と Non-RVR の比較検討には上記の 40 名を含む 48 名を対象とした。

2) HCV 遺伝子の解析 : RT-PCR 法により、治療開始前の血清中 HCV の NS5A 遺伝子領域を増幅し、その塩基配列と推定アミノ酸配列を求め、コンセンサス配列と比較して変異の有無を調べた。

3) 血中 HCV ウイルス量の測定 : HCV RNA 量は市販の定量 RT-PCR 法により、また、

HCV コアタンパク質量は市販の ELISA 法により測定した。

(倫理面への配慮)

患者からの血清の採取はインフォームドコンセントを得て行った。すべての実験はバイオセーフティー指針に準拠して行った。

C. 研究結果

1) HCV-2a の IRRDR 多様性と Peg-IFN/リバビリン治療応答性の相関：

HCV-2a 感染慢性肝炎患者においては、SVR は 83% (19/23)、Non-SVR は 17% (4/23)であった。また、RVR は 74% (20/27)、Non-RVR は 26% (7/27)であった。

まず、RVR と Non-RVR の間で塩基配列が有意に異なる NS5A 遺伝子領域について、sliding window 法により解析した。その結果、IRRDR に相当する領域 (IRRDR[2a]) と ISDR の C 末端部分と PKR 結合領域の一部を含む領域 (ISDR+C[2a]) の変異数の多寡により、RVR と Non-RVR が有意に区別されることがわかった。receiver operating characteristic curve (ROC) 解析により、IRRDR 変異数が 3 以上 (≥ 3) と 2 以下 (≤ 2) に分けるのが最適であると考えられた。IRRDR 高変異 (IRRDR[2a] ≥ 3) は RVR の 90% (18/20)、Non-RVR の 10% (2/20)に見られた。一方、IRRDR[2a] ≤ 2 は RVR の 29% (2/7)、Non-RVR の 71% (5/7)に見られ、IRRDR[2a] ≥ 3 と IRRDR[2a] ≤ 2 の間の差異は統計学的に有意であった ($p=0.005$)。

また、IRRDR[2a] ≥ 3 症例の治療前、治療開始 1 日後及び 1 週間後の血中 HCV コア抗原量は、IRRDR[2a] ≤ 2 に比べて、有意に低値であった。

SVR と Non-SVR の間で比較した場合には、ROC 解析により、IRRDR ≥ 2 と IRRDR ≤ 1 に分けるのが最適であると考えられた。IRRDR[2a] ≥ 2 は SVR の 94% (17/18)、Non-SVR の 6% (1/18)に見られた。一方、IRRDR[2a] ≤ 1 は SVR の 40% (2/5)、Non-SVR の 60% (3/5)に見られ、IRRDR[2a] ≥ 2 と IRRDR[2a] ≤ 1 の間の差異は統計学的に有意であった ($p=0.02$)。

2) HCV-2a の ISDR+C[2a] の多様性と Peg-IFN/リバビリン治療応答性の相関：

SVR と Non-SVR との比較では、ROC 解析により、ISDR+C[2a] ≥ 1 と ISDR+C[2a]=0 (変異なし) に分けるのが最適であると考えられた。ISDR+C[2a] ≥ 1 症例はすべて SVR (14/14)であった。一方、ISDR+C[2a]=0 は SVR の 56% (5/9)、Non-SVR の 44% (4/9)に見られ、ISDR+C[2a] ≥ 1 と ISDR+C[2a]=0 の間の差異は統計学的に有意であった ($p=0.01$)。

多変量解析により、IRRDR ≥ 2 が SVR の独立予測因子であることが示された。

3) HCV-2b の IRRDR 多様性と Peg-IFN/リバビリン治療応答性の相関：

HCV-2b 感染慢性肝炎患者においては、SVR は 65% (11/17)、Non-SVR は 35% (6/17)であった。また、RVR は 71% (15/21)、Non-RVR は 29% (6/21)であった。

RVR と Non-RVR の間で塩基配列が有意に異なる NS5A 遺伝子領域について、sliding window 法により解析した。その結果、IRRDR の N 末端領域 (IRRDR/N[2b]) のみが RVR と Non-RVR の間で有意に異なることがわかった。そして ROC 解析により、IRRDR/N[2b] ≥ 2 と IRRDR/N[2b] ≤ 1 に分けるのが最適であると考えられた。IRRDR/N[2b] ≥ 2 の症例はすべて RVR (10/10) であった。一方、IRRDR/N[2b] ≤ 1 は RVR の 45% (5/11)、Non-RVR の 55% (6/11) に見られ、IRRDR/N[2b] ≥ 2 と IRRDR/N[2b] ≤ 1 の間の差異は統計学的に有意であった ($p=0.01$)。一方、IRRDR/N[2b] ≥ 2 と SVR の有意の相関は認められなかった。

D. 考察

本研究により、HCV-2a、HCV-2b いずれにおいても、NS5A の IRRDR (あるいはその一部領域) の多様性が Peg-IFN/リバビリン治療応答性と有意に相関することが明らかになった。そして、IRRDR[2a] ≥ 2 は HCV-2a 感染症例の SVR の予測因子として有用であることが示された。ISDR+C[2a] ≥ 1 も SVR と相関することが明らかになった。一方、IRRDR/N[2b] は RVR と有意の相関を示すが、SVR との有意の相関は認められなかった。しかし、さらに症例数を増やして検討すれば、有意の相関が見られる可能性は十分に残されていると考えられた。

HCV-2a、HCV-2b など、セロタイプ 2 の

HCV は一般に IFN 感受性で、Peg-IFN/リバビリン併用療法における治療期間は通常 24 週間とされている。しかしながら、本研究結果より、IRRDR[2a] ≤ 1 や IRRDR/N[2b] ≤ 1 の症例では、Peg-IFN/リバビリンの投薬期間は通常 24 週間より長期間を推奨する必要があると考えられた。その点も含めて、今後のより詳細な解析が必要と考えられた。

E. 結論

HCV-2a 及び HCV-2b による慢性 C 型肝炎患者の Peg-IFN/リバビリン併用療法において、IRRDR[2a] ≥ 2 は SVR の、また、IRRDR/N[2b] ≥ 2 は RVR の予測因子として、それぞれ利用できる可能性が示唆された。また、IRRDR[2a] ≤ 1 や IRRDR/N[2b] ≤ 1 の症例では、通常セロタイプ 2 の HCV の標準治療期間である 24 週間より長期間の薬剤投与を推奨する必要があると考えられた。

[参考文献]

- 1) 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*, 48:38-47, 2008.
- 2) El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim S-R, Hotta H. Prediction of efficient