

- virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of hepatitis C virus and anti-NS5A antibodies in pretreatment sera. *Microbiol Immunol*, 2007; 51:471-482, 2007.
- 3) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. 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.
- 4) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: Amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol*, 46:403-410, 2007.
- 5) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461:399-401, 2009.
- 6) Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy. *Nat Genet*, 41:1100-1104, 2009.
- 7) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*, 41:1105-1109, 2009.

#### F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kim S R, Imoto S, Mita K, Taniguchi M, Sasase N, Muramatsu A, Kudo M, Kitai S, El-Shamy A, Hotta H, Hayashi Y. Pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C with high viral load of serum HCV RNA, genotype 1b, discontinued on attaining sustained virological response in week 16 after onset of acute pancreatitis. *Digestion*, 79(1):36-39, 2009.
2. Kasai D, Adachi T, Deng L, Nagano-Fujii M, Sada K, Ikeda M, Kato N, Ide Y, Shoji I, Hotta H. HCV replication suppresses cellular glucose uptake through down-regulation of cell surface expression of glucose transporters. *J Hepatol*, 50:883-894, 2009
3. Bungyoku Y, Shoji I, Makine T, Adachi T, Hayashida K, Nagano-Fujii M, Ide Y, Deng L, Hotta H. Efficient production of infectious hepatitis C virus with adaptive mutations in cultured hepatoma. *J Gen Virol*, 90(7), 1681-1691, 2009.
4. Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J 3rd, Siddiqui A. Role of Oxysterol Binding Protein in Hepatitis C Virus infection. *J Virol*, 83(18): 9237-9246, 2009.
5. Mohd-Ismail NK, Deng L, Sukumaran SK, Yu VC, Hotta H, Tan YJ. The hepatitis C virus core protein contains a BH3 domain that regulates apoptosis through specific interaction with human MCL-1. *J Virol*, 83(19):9993-10006, 2009.
6. Kim SR, Imoto S, Kudo M, Mita K, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Shoji I, Nagano-Fujii M, El-Shamy A, Hotta H, Nagai T, Nagata Y, Hayashi Y. Double-filtration plasmapheresis plus IFN for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy: early viral dynamics. *Intervirology*, 53(1):44-48, 2010.
7. Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H. Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 53(1):49-54, 2010.
8. 金守良, 井本勉, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. 1b 型高ウイルス C 型慢性肝炎の PEG-IFN+リバビリン併用療法(併用療法)無効例に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFN- $\beta$  4 週間連続投与の試み 早期ウイルス dynamics を中心

に. 肝臓 50(8) :470-472, 2009.

都.

## 2. 学会発表

1. 斎藤貴史, 三條麻衣, 石井里佳, 宇賀神智, 佐藤智佳子, 芳賀弘明, 奥本和夫, 西瀬雄子, 伊藤純一, 渡辺久剛, 齋藤孝治, 富樫整, 堀田博, 河田純男. HCV NS3 蛋白質二次構造の多型性と HCV RNA 量およびペグインターフェロン・リバビリン併用療法の効果予測の検討. 第 45 回日本肝臓学会総会, 2009. 神戸.
2. 金守良, 井本勉, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. 1b 型高ウイルス量 C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN $\alpha$ -2b+RBV 併用療法(併用療法)における治療効果とウイルス dynamics との関係及びウイルス陰性化時期予測式についての検討. 第 13 回日本肝臓学会大会, 2009. 京都.
3. 金守良, 井本勉, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. セロタイプ 2 型 C 型慢性肝炎に対する IFN+リバビリン併用療法(併用療法)の背景因子及び早期ウイルス dynamics の検討. 第 13 回日本肝臓学会大会, 2009. 京都.
4. 金守良, 井本勉, 堀田博. 1b 型高ウイルス C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN+リバビリン併用療法(併用療法)無効例に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)の試み ウイルス dynamics を中心に. 第 13 回日本肝臓学会大会, 2009. 京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

培養細胞系による薬剤耐性肝炎ウイルスの解析

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部室長

研究要旨 昨年度、C型肝炎ウイルス（HCV） JFH-1 株持続感染細胞を NS3 セリンプロテアーゼ阻害剤 BILN2061 存在下で長期間培養することにより、NS3 領域に 2 カ所の耐性変異（V71A、K122R）が同定された。今回、この薬剤耐性ウイルスについてさらに解析を進め、この耐性変異は HCV の複製効率に影響を与えないこと、BILN2061 非存在下での 1 ヶ月間の培養後も両変異は完全に維持されることを見出した。また、この変異ウイルスは、別のプロテアーゼ阻害剤 VX-950 には耐性でないことなどから薬剤選択性の高い耐性変異である可能性が示された。

A. 研究目的

抗ウイルス薬に対する耐性ウイルスの出現は、多くのウイルス感染症の治療において問題となっている。C型肝炎治療においても抗C型肝炎ウイルス（HCV）薬の長期間投与に伴う耐性ウイルスの出現が懸念されているものの、各治療薬に対する耐性 HCV の特徴は十分には明らかにされていない。本研究では、現行の治療薬、開発中のウイルス酵素阻害剤、また今後、創薬化の可能性のある化合物に対する耐性 HCV を HCV 複製細胞系または感染増殖系を用いて同定し、薬剤耐性獲得の分子機構を解析する。昨年度、HCV プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 に対して耐性の遺伝子型 2a HCV を同定した。本年度は、その耐性獲得に必要な遺伝子変異が HCV ゲノム複製効率に及ぼす影響、同変異が他の抗 HCV 剤に対する感受性に影響を与えるか、などを解析した。

B. 研究方法

HCV 遺伝子型 2a JFH-1 株のゲノム cDNA プラスミド（pJFH1）を XbaI 切断により直鎖化し精製後、これを鋳型として試験管内にて RNA 合成を行った。得られた RNA をエレクトロポレーション法により Huh7 細胞へ導入し HCV 粒子を産生

させた。細胞内外の HCV Core 蛋白質及び RNA を ELISA 法、リアルタイム RT-PCR 法でそれぞれ定量した。

HCV NS3 変異ゲノム（pJFH1-V71A, -K122R, -V71AK122R）は PCR を利用した部位特異的変異導入法によって作製した。

C. 研究結果

昨年度、HCV 持続感染細胞を BILN2061 存在下で約 3 ヶ月間培養することにより BILN2061 に対して耐性化することを見出した。耐性細胞中の HCV 遺伝子配列を解析した結果、NS3 領域に 2 カ所のアミノ酸変化を伴う特徴的な変異—71 番目バリンからアラニンへ置換（V71A）、122 番目リジンからアルギニンへ置換（K122R）—が見出された。各変異を導入した HCV ゲノム（JFH1V71A、JFH1K122R、JFH1V71AK122R）から変異ウイルスを作製し、BILN2061 の抗 HCV 作用を調べたところ、V71A、K122R 両変異が耐性獲得に重要であることが示された。

今回、これら 3 種類の変異 HCV についてさらに解析を進め、まず各変異体の複製増殖能を野生型と比較したところ、少なくとも細胞へのゲノム RNA 導入後 72 時間までは JFH1V71A、

JFH1K122R、JFH1V71AK122Rとも野生型と有意な増殖効率の違いは認められなかった。また、阻害剤無添加培養において耐性変異からリバータントが出現するかを明らかにするため、JFH1V71AK122Rを感染させたHuh7細胞をBILN2061非存在下で1ヶ月間培養した後、感染細胞内のHCV遺伝子を解析したところ、両変異は完全に維持されていた。V71A、K122RともHCV複製を低下させることがないため、BILN2061の有無に関わらず安定的に保持されるものと考えられた。

また、同定した耐性変異がBILN2061以外の抗HCV剤に対しても同様に耐性を示すかを解析した。JFH1V71AK122R感染細胞に、インターフェロンalpha、リバビリン、シクロスポリンまた別のHCVプロテアーゼ阻害剤であるVX-950を種々の濃度で添加し、3日間培養後に細胞内HCV RNAを定量したところ、各薬剤の阻害活性は野生型JFH-1感染細胞の場合と有意な差は認められなかった。VX-950を含めた各薬剤は、V71A、K122Rによって感受性を低下させることはなかった。両変異は薬剤選択性の高い耐性変異である可能性が示された。

#### D. 考察

HCVプロテアーゼ阻害剤は新たなC型肝炎治療法STAT-Cとして開発が進んでおり、現行のインターフェロン・リバビリン療法との併用療法により奏効率の有意な上昇が臨床試験で示されている。

我々は、HCV JFH-1が安定的に持続感染増殖するHuh7細胞系を作製し、プロテアーゼ阻害剤BILN2061を長期間添加した結果、耐性ウイルスを取得し、その責任変異V71A、K122Rを同定した。この変異による薬剤耐性獲得のメカニズムを考察するため、理研横浜研究所 松本先生と共同で、これまでに報告された立体構造情報を基に、変異NS3-BILN2061のドッキングシミュレーションを行った。その結果、71番目アラニン、122番目リジンともBILN2061の予想結合部位から10Å以上離れていると推定され、通常、二者間の相互作用が期待される3Å以下に比べ離れ

ている可能性が高いことが示された。耐性獲得機構の予測には至らなかった。これらの変異に伴い、実際にどのような構造変化が生じるかは変異蛋白の単離、結晶化、構造解析の結果を待たねばならない。

BILN2061、VX950ともNS3蛋白のセリンプロテアーゼ活性中心の近傍に結合するものと推定されているが、両化合物の構造の違いにより、結合に伴うプロテアーゼ活性への影響が異なる可能性が考えられた。

#### E. 結論

HCV持続感染細胞系を利用して同定したHCVプロテアーゼ阻害剤BILN-2061耐性変異は、ウイルス複製効率に影響を与えないこと、化合物選択性の高い変異であることが示された。

#### 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 MMC, 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* 5137-5147 5137-5147, 2009.
2. 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.
3. Kukihara H, Moriishi K, Tagawa S, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Fukuhara T, Taketomi A, Maehara Y, Matsuura Y:

- Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J Virol* 83: 7959-7969, 2009.
4. Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, Moriya K, Miyoshi H, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Miyamura T, Suzuki T, Koike K: Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperone, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 50: 378-386, 2009.
  5. Taguwa S, Kambara H, Omori H, Tani H, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. Cochaperone activity of human butyrate-induced transcript 1 facilitates hepatitis C virus replication through an Hsp90-dependent pathway. *J Virol* 83: 10427-10436, 2009.
  6. 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 E6AP-mediated ubiquitylation. *J Cell Biochem* 16: 1123-1135, 2009.
  7. Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, Suzuki T, Wakita T, Fukasawa H: Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res* 83: 112-117, 2009.
  8. Moriya K, Miyoshi H, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Moriishi K, Matsuura Y, Suzuki T, Miyamura T, Koike K: Tacrolimus ameliorates metabolic disturbance and oxidative stress caused by hepatitis C virus core protein: analysis using mouse model and cultured cells. *Am J Pathol.* 175: 1515-241, 2009.
  9. 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: 319-27, 2009.
  10. Saeed M, Suzuki R, Kondo M, Aizaki H, Kato T, Mizuochi T, Wakita T, Watanabe H, Suzuki T: Evaluation of hepatitis C virus core antigen assays in detecting recombinant viral antigens of various genotypes. *J Clin Microbiol.* 47: 4141-4143, 2009.
  11. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T: Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* (in press).
- 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。

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

薬剤耐性に関する HBV, HCV 遺伝子の研究とその対策

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。とくに多剤耐性ウイルスの出現は、今後の治療に大きな問題点となる。現在までの耐性ウイルスの頻度と種類について検討した。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。過去に核酸アナログ製剤を使用していないエンテカビル投与症例 (naïve) 371 例からは 2 例にエンテカビル耐性ウイルスの出現を認めた。ラミブジン単独投与中に YMDD motif mutation の出現が疑われた 390 例からのアデフォビルまたはエンテカビル耐性ウイルスの出現は 8 例 (2%) であった。さらにラミブジン耐性ウイルスに対してエンテカビルを投与した 66 症例からのエンテカビル耐性出現は 10 例 (15%) であった。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 380 例では、SVR, NVR に寄与する因子として Core aa70 のアミノ酸置換の有無が重要な因子であった。Telaprevir (MP-424) と PEG-IFN+RBV 12 週間併用療法を施行した 20 例では、SVR 率は 70% であり naïve 例では Core aa70 が wild である症例で SVR 率が高かった。現在 Telaprevir (MP-424) と PEG-IFN+RBV 併用療法は最も効果が期待される治療薬であり、今後ウイルス学的因子、生体側因子 (遺伝子多型など) を含め、総合的に治療効果を予測し、テーラーメイドの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。このうちラミンジンの単独投与は高率に耐性ウイルスの変異を認めるが、ラミブジン単独投与中にアデフォビルまたはエンテカビルの耐性ウイルスが出現する症例がある。さらに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中に両剤耐性ウイルスが出現する症例がある。一方ラミブジン耐性ウイルスに対してエンテカビル使用例でのエンテカビル耐性ウイルス出現も問題と

なっている。このような多剤耐性ウイルス出現例の頻度とその経過について検討した。

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、十分な治療効果を得ていない。最近ウイルス量の測定系に高感度の Real-time PCR 法が導入されている。また効果に関するウイルス側因子として Core のアミノ酸変異、ISDR 変異数が重要である。これらの因子を含め PEG-IFN+RBV 併用療法の効果予測因子を検討した。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

虎の門病院にて過去に核酸アナログ製剤を使用してい

ない(naïve)症例 371 例に対するエンテカビル耐性ウイルスの出現例を検討した。次にラミブジン単独投与中の症例でポリメラーゼ領域の YMDD motif mutation が疑われた症例においてアデフォビルまたはエンテカビル耐性ウイルスの出現率を390例で検討した。さらにラミブジン耐性ウイルスに対してエンテカビルを投与した 66 症例からのエンテカビル耐性ウイルス出現についても検討した。

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 380 例を対象とした。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(T12PR12)を施行した 20 例と24週間投与(T12PR24; Telaprevir (MP-424) と PEG-IFN+RBV 併用療法 12 週間投与しその後 PEG-IFN+RBV 併用療法 12 週間を継続)を施行中の症例も含めた 71 例において効果とウイルス側因子について検討した。

(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) エンテカビル治療による naïve 例からのエンテカビル耐性ウイルスの出現

現在投与期間は中央値で 1.3 年であるが、エンテカビル耐性ウイルス出現を 371 例中2例で認めている。1例は 28 歳男性、genotype A, HBeAg 陽性、開始時 HBV DNA 量 8.7 LGE/mL 以上、HBV ポリメラーゼ領域内の reverse transcriptase(rt)領域の rtT184I, rtS202G と rtL180M, rtM204V の変異が出現した。もう1例は、40 歳男性、genotype H, HBeAg 陽性、開始時 HBV DNA 量 8.7 LGE/mL 以上、HBV ポリメラーゼ領域内の rt 領域の rtS202G と rtL180M, rtM204V の変異が出現した。

### (2) ラミブジン単独投与中にアデフォビルまたはエンテカビル耐性ウイルスの出現した症例

ラミブジン単独投与中の症例でポリメラーゼ領域の YMDD motif mutation が疑われた症例において YMDD motif 以外の rt 領域のアミノ酸変異を検討した。390 例中

8 例(2%)に YMDD motif 以外でアデフォビルまたはエンテカビルに耐性であると報告されている領域にアミノ酸変異を認めた。その内訳は、rtA181T が4例、rtA181T+rtM204I が1例、rtA181S が1例、rtL180M+rtS202G+rtM204V が2例であった。これら8例のうち7例でラミブジンとアデフォビルの併用療法を施行した。rtA181T+rtM204I の1例と rtL180M+rtS202G+rtM204V の1例は2年目までに HBV DNA が陰性化(Amplicor 法)したが、rtA181T/S の症例5例では HBV DNA の陰性化は得られていなかった。

### (3) 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

併用療法を施行した 316 例中 4 例(1.2%)に両剤に対する耐性ウイルスが認められた。rtA181T/S/V がそれぞれ 1 例ずつと rtA181T+rtN236T が 1 例で rtA181T+rtN236T の症例は Tenofovir の投与を施行し DNA 量の改善を認めた。

### (4) ラミブジン耐性ウイルスに対するエンテカビル投与における耐性ウイルスの検討

66例の症例中 10 例(15%)でエンテカビル耐性ウイルスの出現を認めた。ラミブジン投与期間が 3 年未満では切り替え時ウイルス量が 5.1 Log copies/mL 以上の症例 17例中6例(35%)、3年以上の症例では切り替え時ウイルス量 2.6-5.0 で 15 例中1例(7%)、5.1 以上で 8 例中 3 例(38%)に認められた。

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

ウイルス量を Real-time PCR 法にて測定した 380 例で全体での SVR に寄与する因子を多変量解析すると、性別(男性;  $P<0.001$ )、ISDR 変異数(2 以上;  $P<0.001$ )、血小板数(15 万以上;  $P=0.006$ )、AFP (<11;  $P<0.001$ )、ISDR(>2;  $P<0.001$ )、Core 領域 aa70 のアミノ酸置換(wild type;  $P=0.025$ )、HCV RNA 量 (<6 Log IU/mL ;  $P=0.0033$ )、であった。NVR に寄与する因子を多変量解析すると、Core 領域アミノ酸置換(non-double-wild type;  $P=0.021$ )、性別(女性;  $P=0.003$ )、 $\gamma$  GTP(>35;  $P=0.032$ )、であった。

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

T12PR12 の治療例の内訳は、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。投与終了後の効果判定では、naïve 例 10 例中 7 例で SVR、IFN 無効例 6 例中 2 例が SVR となった。Naïve 例だけでみると Core aa70 wild type では 6 例中 5 例、mutant type で 4 例中 2 例の SVR 率であった。また T12PR24 例を含めた 71 例で開始後 2 週間の HCV RNA 量の低下を検討すると Core aa70 が wild の症例で有意にウイルスの減少量が多かった。

#### 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主体となっている。naïve 例に対する当院の成績では 371 例中 2 例にのみエンテカビル耐性ウイルスが検出されている。今後より長期の成績が検討される必要がある。一方ラミブジンは、YMDD motif 以外の rt 領域にも種々の変異を起こす。今回の我々の検討では、頻度は少ないもののアデフォビルまたはエンテカビル耐性と関係する変異が認められた。このような症例では、アデフォビルまたはエンテカビルの効果が少ない。従ってラミブジン耐性ウイルスが疑われ、アデフォビルを投与した症例で抗ウイルス効果が少ない症例では、HBV の遺伝子配列を検討する必要がある。

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、遺伝子多型など) 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非常に高く特に naïve 例では 70% の SVR 率であった。また Core 領域のアミノ酸置換と

の関係でも aa70 が wild の方が SVR 率が高かった。

#### E. 結論

B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤の長期投与では、多剤耐性ウイルスが出現する症例がある。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。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

Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, et al.. Rapid loss of hepatitis C virus genotype 1b from serum in patients receiving a triple treatment with telaprevir (MP-424), pegylated interferon and ribavirin for 12 weeks. *Hepatology Res.* 2009;39:1056-63.

Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, et al. A matched case-controlled 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.* 2009 ;81:452-8.

##### 2. 学会発表

鈴木 文孝、熊田 博光。

パネルディスカッション 5: B 型慢性肝炎に対する抗ウイルス療法の治療成績、第 95 回日本消化器病学会総会、札幌、2009.5.7.

鈴木 文孝、八辻 寛美、熊田 博光。

ワークショップ 4: B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ製剤使用により出現する耐性ウイルスの遺伝子学的検討、第 45 回日本肝臓学会総会、神戸、2008.6.4.

鈴木 文孝、鈴木 義之、熊田 博光。

パネルディスカッション 13: C 型肝炎に対する

Telaprevir(MP-424)の治療効果とウイルス側因子の検討、  
JDDW、京都、2008.10.15.

#### 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

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：  
インターフェロン誘導遺伝子 GBP-1 の抗ウイルス機構と HCV 蛋白との  
クロストーク

分担研究者 中川 美奈 東京医科歯科大学・分子肝炎制御学講座・助教

研究要旨： C型肝炎ウイルス感染におけるインターフェロン関連蛋白とウイルスの相互作用を解析し、抗ウイルス療法のあらたな標的宿主蛋白を同定することを目的に研究を行い、以下の結果を得た。1) HCV 培養系において IFN 誘導遺伝子である GBP-1, IFI27, IFI6-16 が HCV 増殖を特異的に抑制することを新たに見出し、GBP1 と NS5B 蛋白が特異的に結合すること、またその結合エピトープを含むドメインを特定した。2) NS5B が GBP-1 のもつ GTPase 活性を阻害すること、さらに NS5B 自体が GBP-1 蛋白発現を抑制することを見だし、報告した(Itsui et al, Hepatology 2009)。

引き続き 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は、今後インターフェロン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。

#### A. 研究目的

インターフェロン誘導遺伝子 (ISG) の抗ウイルス効果の解析および HCV 蛋白との相互作用の解析を介して、インターフェロン (IFN) 抵抗性に関与する機構の解析、抗ウイルス療法の新たな標的宿主蛋白同定を目指す。

#### B. 研究方法

(1) HCV 増殖抑制効果が認められた ISG である GBP-1, IFI-27, IFI6-16 と相互作用する HCV 蛋白を免疫沈降法・two-hybrid 法で同定する。

(2) HCV-NS5B と相互作用することが確認

された GBP-1 に関して、結合エピトープ解析を行う。

(3) HCV 増殖抑制に GBP-1 のもつ GTPase 活性の関与が示唆されたため、GTPase 活性を持たない変異型 GBP-1 を用いて抗ウイルス効果への影響を検討、さらに OD 測定による経時的な GTPase 活性の測定を行い、NS5B 存在下での GTPase 活性の変化について解析を行う。

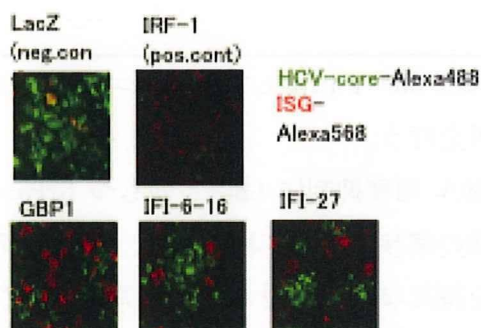
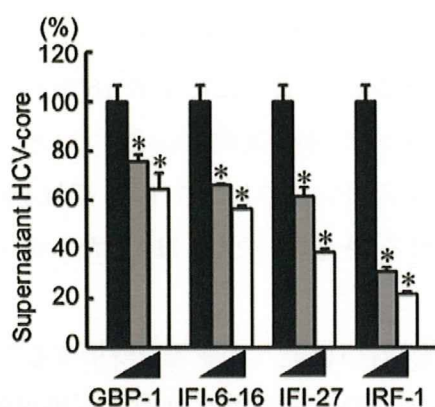
なお本研究は東京医科歯科大学組み換え DNA 実験安全管理規定に準拠して行われる。また、ヒトの細胞および組織を用いた研究にあたっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に準じて当該

施設倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得た上で、人権及び利益の確保を行うよう配慮する。

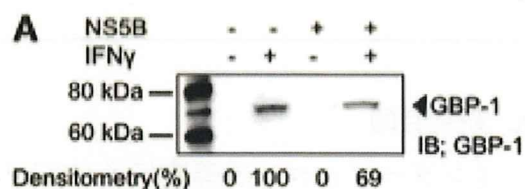
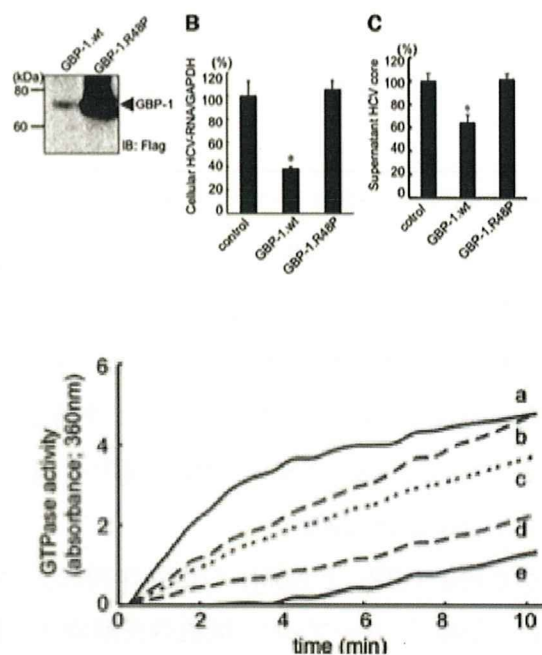
害すること、さらに NS5B 存在下では GBP-1 蛋白発現が抑制されることが確認された。(Itsui et al, Hepatology 2009)

### C. 研究結果

1) HCV 培養系で ISG である GBP-1, IFI-27, IFI6-16 が HCV 増殖を特異的に抑制することを新たに見出した。



- 2) 免疫沈降法・two-hybrid 法により、GBP1 と NS5B 蛋白が特異的に結合することを確認し、その結合エピトープを含むドメインが、NS5B-finger domain、GBP-1-GTPase domainであることを特定し、さらに GBP-1 の抗ウイルス効果に GTPase 活性が必要であることを見いだした。
- 3) NS5B が GBP-1 のもつ GTPase 活性を阻



### D. 考察

生体内の防御機構と HCV ウイルス蛋白の相互作用がウイルス排除あるいは持続感染に関与していることが報告されている。昨年 IL28B 宿主遺伝子多型が IFN 治療応答性や HCV 感染における自然経過に強く関連することが相次いで報告され (Tanaka, Nature Genet. 2009, Thomas, Nature 2009 ほか)、IL28B と ISG 発現に強い相関があるという報告もなされてい

る。本研究の結果も両者のクロストークが IFN 抵抗性に関与していることを示唆する結果となったが、本研究をすすめることで HCV に限らず、広汎なウイルスへの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となる可能性がある。

#### E. 結論

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。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yasuhito Tanaka, Nao Nishida, Masaya Sugiyama, Masayuki Kurosaki, Kentaro Matsuura, Naoya Sakamoto, Mina Nakagawa, Masaaki Korenaga, Keisuke Hino, Shuhei Hige, Yoshito Ito, Eiji Mita, Eiji Tanaka, Satoshi Mochida, Yoshikazu Murawaki, Masao Honda, Akito Sakai, Yoichi Hiasa, Shuhei Nishiguchi, Asako Koike, Isao Sakaida, Masatoshi Imamura, Kiyooki

Ito, Koji Yano, Naohiko Masaki, Fuminaka Sugauchi, Namiki Izumi, Katsushi Tokunaga & Masashi Mizokami: Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics*, 2009; 41(10): 1105-1109

2. Yasuhiro Itsui, Naoya Sakamoto, Sei Kakinuma, Mina Nakagawa, Yuko Sekine-Osajima, Megumi Tasaka-Fujita, Yuki Nishimura-Sakurai, Gouki Suda, Yuko Karakama, Kako Mishima, Machi Yamamoto, Takako Watanabe, Mayumi Ueyama, Yusuke Funaoka, Cheng-Hsin Chen and Mamoru Watanabe: Antiviral effects of the interferon-induced protein GBP-1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein *Hepatology*, 2009 ;50: 1727-37
3. 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. 学会発表

1. 第 95 回日本消化器病学会総会パネルディスカッション PD6-4、HCV コアおよび NS5A 変異からみた難治性 C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療の効果予測、2009 年 5 月 7 日
2. 第 44 回日本肝臓学会総会シンポジウム、C 型慢性肝炎のインターフェロン治療における男女差とウイルス側因子の関係、2009 年 6 月 4 日
3. 第 13 回日本肝臓学会大会シンポジウム (JDDW)、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 2009 年 10 月 14 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし

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. 組込由来 Fusion HBx による新たな肝発癌メカニズムを検討した。
2. C 型肝炎における肝発癌要因としてのコア蛋白変異につき検討した。
3. 治療抵抗性 C 型肝炎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 real-time PCR 法による高感度定量法を開発し、ペグインターフェロン、リバビリン併用療法を行った患者での野生型および変異型 HCV の個別の dynamics を検討した。

A. 研究目的

1. B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus: HBV) による発癌メカニズムとして、① HBx の寄与、② HBV DNA の組込みなどが報告されている。しかしながら、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。また、HBV DNA の宿主遺伝子への組込みはランダムであり、いまだ組込み HBV DNA による発癌メカニズムも不明である。そこで、我々は、組込み 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いう仮説を立て、それを詳細に検証する。
2. C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) コア蛋白は、トランスジェニックマウスで肝癌を発症するなど、C 型肝炎における肝発癌との関連が示唆されてい

る。最近になり、ペグインターフェロン、リバビリン併用療法の治療効果と関連しているコア蛋白第 70 番目アミノ酸 (aa70) が肝発癌にも重要であるとの報告が本邦でなされている。すなわち、変異型アミノ酸 (Gln) を有する患者では、野生型アミノ酸 (Arg) を有する患者より発癌率が高い。グローバルデータベースを用いて、コアの変異と肝癌との関連につき検討し、コアと肝癌との関連を明らかにする。

3. C 型慢性肝炎の標準治療として、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。ジェノタイプ (セロタイプ) 1 型高ウイルス量症例では、その奏成功率はたかだか 50% に過ぎないが、治療抵抗性を規定するウイルス側因子として、コア蛋白 aa70 が重要であることが明らかになっている。すなわち、野生型アミノ酸 (Arg) を有する患者では、変

異型アミノ酸 (Gln) を有する患者より EVR (early virological response) や SVR (sustained virological response) 率が低い。しかしながら、野生型 HCV と変異型 HCV では本当にペグインターフェロン、リバビリン併用療法に対する感受性が異なるのであろうか？そこで、Taqman MGB (minor groove binding) probe を応用し、real-time PCR 法により、コア蛋白 aa70 変異を高感度に定量する系を確立し、同一患者内での野生型および変異型 HCV それぞれのペグインターフェロン、リバビリン併用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 の組込を有することが既に判明している HepG3 肝癌細胞株を用いて、①HBV DNA 組込部位を同定する、②組込部位より転写される Fusion mRNA を同定する、③ 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、浸潤能につき検討する、④NIH3T3 細胞に Fusion HBx を発現し、足場非依存性発育 (腫瘍原性) につき検討する、⑤Fusion HBx のトランス活性化能につき検討する、⑥Fusion HBx により発現誘導あるいは抑制される mRNA につき microarray を用いた網羅的解析を行う。
2. 4 つの Global database から、ジェノタイプ 1b HCV で肝癌の有無につき情報のある患者のコア領域のシーケンスを収集し、肝癌関連変異につき検討した。
3. HCV コア蛋白 aa70 の Arg→Gln 変異を高感度に検出する系を Taqman MGB

probe を用いた real time PCR 法にて確立する。その感度や特異度を plasmid を鋳型として検証する。まず、ペグインターフェロン、リバビリン併用療法を受けた C 型慢性肝炎患者における野生型 (Arg) および変異型 (Gln) の prevalence を明らかにし、両者を有するペグインターフェロン、リバビリン併用療法を受けた 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し、治療効果との関連につき検討する。

## C. 研究結果

1. Hep3B において①全長 2830 bp の 3' 端の欠損した X 遺伝子を含む HBV DNA 組込みを同定した、②組込み HBV DNA より転写される全長 3725 bp (3' 端には 1877 bp のヒト由来塩基配列) の Fusion mRNA を同定した、③ siRNA により Fusion mRNA 発現をノックダウンした Hep3B 細胞では、細胞増殖能が低下していたのみならず、浸潤能も低下していた、④NIH3T3 細胞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、⑤Fusion HBx のトランス活性化能は、HBx に比し、むしろ減弱しており、HBx が有するトランス活性化能が発癌機構の一つとは考えにくかった、⑥Fusion HBx のみで発現上昇あるいは低下が認められた mRNA を検討すると、特定の pathway との関連は薄く、HBx で既報の NF $\kappa$ B, AP-1, Wnt/ $\beta$ -catenin, Androgen receptor pathway などとは関係がなかった。
2. HCC 患者 70 例と非 HCC 患者 223 例の



シーケンスを比較検討した。  
aa10Lys→Gln (OR=2.912 p=0.041),  
aa70Arg→Gln (OR=0.445, p=0.001),  
aa91Met→Leu (OR=0.187, p=0.001),  
aa161Gly→Ser (OR=0.24, p=0) の4  
アミノ酸変異が HCC と関連していた。

3. HCV コア蛋白 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。ペグインターフェロン, リバビリン併用療法を行った36例のC型慢性肝炎患者において, 治療前血清を用いて野生型と変異型の prevalence を検討したところ, 実に36例中29例(80.6%)が野生型と変異型の両者を有する混在型であった。また, 36例中6例(16.7%)で変異型が野生型より有意であった。ペグインターフェロン, リバビリン併用療法の治療効果を検討したところ, 変異型の比率が50%以上の症例では, 併用療法による早期抗ウイルス効果が得られにくいことが明らかとなった。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, リバビリン併用療法により, 野生型, 変異型の両者共に減少したが, 減少率は野生型と変異型で変わりがなく, 変異型 HCV がペグインターフェロン, リバビリン併用療法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. 組込み 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. グローバルデータベースを用いた解析でもコア蛋白 aa70 は肝癌と関連しており, その機能解析が必要である。
3. 多くの C 型慢性肝炎患者では, コア蛋白 aa70 の野生型と変異型が混在していることが明らかになった。ペグインターフェロン, リバビリン併用療法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, リバビリン併用療法感受性は野生型と同等と考えられたが, これら事実から変異型コア蛋白が治療感受性に関与している可能性は高く, 治療抵抗性機序のさらなる解明が必要である。

#### E. 結論

1. 組込み由来の Fusion HBx が発癌に重要な役割を担っていた。
2. コア蛋白 aa70 置換は肝癌と関連していた。
3. Taqman MGB probe を用いた real time PCR による HCV コア aa70 の高感度定量法を開発し, 野生型および変異型 HCV の治療中の dynamics を明らかにした。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Omata M, Yoshida H, Shiina S, Kato N. Hepatocellular carcinoma “epidemics” in Japan. In: Karayiannis P, Main J, Thomas H eds. Hepatitis C virus. International Medical Press Ltd. 2009: 5.1-5.10
  - 2) Li C-Z, Kato N, Chang J-H, Muroyama R, Shao R-X, Dharel N, Sermsathanasawadi R,

- Kawabe T, Omata M. Polymorphism of OAS-1 determines liver fibrosis progression in hepatitis C by reduced ability to inhibit viral replication. *Liver Int* 2009; 29: 1413-1421
- 3) Hu Z, Muroyama R, Kowatari N, Chang J, Omata M, Kato N. Characteristic mutations in hepatitis C virus core gene related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 2465-2468
- 4) Chang J-H, Kato N, Muroyama R, Taniguchi H, Guleng B, Dharel N, Shao R-X, Tateishi K, Jazag A, Kawabe T, Omata M. Double-stranded-RNA-activated protein kinase inhibits hepatitis C virus replication but may be not essential in interferon treatment. *Liver Int* 2010; 30: 311-318
- 5) 加藤直也, 室山良介, 小俣政男. B型肝炎に対する新たな核酸アナログ療法. *肝胆膵* 2009; 58(5): 609-612.
- 6) 加藤直也, 室山良介. ウイルス肝炎の臨床像と遺伝子多型. *肝胆膵* 2009; 59(6): 1139-1145.
- 7) 室山良介, 加藤直也, 小俣政男. IRF7 多型と C 型肝炎硬変進展リスク. *肝胆膵* 2009; 59(6): 1181-1186.
2. 学会発表
- 1) Hu Z, Kato N, Muroyama R, Chang J-H, Omata M. Characteristic Mutations in HCV core gene may be related to the occurrence of hepatocellular carcinoma. 第 45 回日本肝臓学会総会. 2009/6/4-5. 神戸
- 2) Kato N. Hepatitis B topics: Nucleos(t)ide analogs and hepatocellular carcinoma. The Second Session of Heilongjiang Provincial Symposium on Hepatic Disease. 2009/7/17-18. Harbin, China
- 3) 加藤直也, 胡 中傑, 室山良介, 古渡礼恵, 五藤 忠. C 型肝炎ウイルスコア領域アミノ酸 70 の置換とインターフェロン治療. そして発癌. 第 5 回広島肝臓プロジェクト研究センターシンポジウム. 2009/7/24. 広島
- 4) Kato N. Antivirals against hepatitis B and hepatocellular carcinoma. The Symposium of Liver Diseases, Jilin Province of China. 2009/8/8. Changchung, China.
- 5) 加藤直也. 肝炎から肝癌. 第 1 回肝疾患を研鑽する会. 2009/9/2. 東京
- 6) Hu Z, Muroyama R, Goto T, Kowatari N, Chang J, Omata M, Kato N. Respective quantification of hepatitis C virus genotype 1b codon 70 wild and mutant types and their response to PEG-IFN/RBV treatment. The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2009/10/30-11/3. Boston, USA
- 7) Muroyama R, Kowatari N, Hu Z, Chang J-H, Otsuka M, Omata M, Kato N. Not HBx but fusion HBx translated from HBV integrant is associated with the development and progression of hepatocellular carcinoma The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2009/10/30-11/3. Boston, USA
- 8) Kato N, Hu Z, Muroyama R, Goto T, Kowatari N, Chang J, Omata M. Amino acid substitution at position 70 of HCV genotype 1b core region is related to the increased HCC risk and non-virological response to PEG-IFN plus RBV

combination therapy. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2009/10/3-7. Nice, France

9) 加藤直也, 室山良介, 小俣政男. C型肝炎における発癌を規定するウイルス因子と宿主因子. 第13回日本肝臓学会大会. 2009/10/15. 京都

10) 加藤直也. 肝炎から肝がんへー日常診療のポイントー. 港区医師会内科医会学術講演会. 2009/10/28. 東京

11) Kato N. Innate immunity genes and their polymorphisms associated with hepatitis C virus replication and pathogenesis of hepatitis C. 2nd Annual Congress and Expo of Molecular Diagnostics-2009. 2009/11/19-21. Beijing, China

12) Muroyama R, Kowatari N, Hu Z, Chang J-H, Otsuka M, Omata M, Kato N. Not “HBx” but “Fusion HBx” translated from HBV integrant is associated with the

development and progression of HCC. The 8th JSH Single Topic Conference. 2009/11/22. Tokyo

13) 加藤直也. 肝炎から肝がんへー最新のトピックと今後の課題ー. 大塚製薬徳島研究所講演会. 2009/12/7. 徳島

14) 室山良介, 古渡礼恵, 李 雯雯, 加藤直也. 組込み HBV-DNA 由来の Fusion HBx のみが有する肝発癌機構の検討. 第17回浜名湖シンポジウム. 2009/12/23. 浜松

15) 加藤直也. 組込み HBV DNA 由来の Fusion HBx 蛋白による新たな肝発癌メカニズム. 平成21年度北海道大学遺伝子制御研究所研究集会. 2010/1/18. 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況  
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

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細胞の IFN 感受性試験を行い以下に示すような新たな結果を得た。(1)2年間培養した全長 HCVRNA 複製細胞から得られた IFN- $\alpha$ 抵抗性細胞由来の HCV ゲノムは樹立時由来の HCV ゲノムと比較すると遺伝的系統樹において一群のクラスターを形成していることが分かった。(2)IFN- $\alpha$ 抵抗性細胞由来の Total RNA を HCV が排除された細胞(治癒細胞)に再度導入して得られた HCV RNA 複製細胞(第2世代)を用いた IFN 感受性試験により、IFN 抵抗性の獲得は HCV 側と宿主側因子の両方が関与していることが示唆された。

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 に耐性を示すかを明らかにすることを目的として、我々が近年開発した全長 HCVRNA 複製細胞(遺伝子型 1b の O 株)を用いて昨年に行き続き以下に示すような実験を行った。

B. 研究方法

(1)IFN- $\alpha$  感受性および抵抗性細胞由来の HCV ゲノムと IFN- $\alpha$  応答性の比較解析

2年間継代培養した全長 HCV RNA 複製細胞である O2 細胞を3週間 IFN- $\alpha$  (50 IU/ml) で処理することにより得られた耐性細胞(O2r)とものO2細胞からTotal RNA を調製した。得られた RNA を用いて、RT-PCR 法により5'末端からNS2領域までの 5.1 kb を増幅した。cDNA の作成には NS3~NS5B 領域までの 6 kb を増幅した昨年度と同じく、Primscript(Takara)を用い、PCR には fidelity の高い KOD-plus DNA polymerase を用いた。増幅した 5.1 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。

IFN- $\alpha$  応答性については、STAT1 のリン酸化の程度を調べるために、O2 細胞、O2r 細胞、O2c 細胞(治癒細胞:後述)および O2rc 細胞(治癒細胞:後述)(それぞれ  $5 \times 10^5$  個)を6ウェルプレートに播き、1晩培養した後に、IFN- $\alpha$  (50 IU/ml) で 30 分処理した。細胞を Lysis buffer にて回収した後、抗 STAT1 抗体および抗リン酸化