

C. 結果

HCV感染マウスへの200 mg/kgのtelaprevirの投与により、急速に血中HCV RNAは低下したが、最終投薬から翌日の投薬の約10時間の間にHCV RNAはほぼ前値にもどっていた。Teraplevir投与によってHCV RNAは、1時間あたり約0.1 - 0.15 log copy低下し、最終投与後、HCV RNAは1時間あたり約0.2 - 0.3 log copy増加していた。Telaprevir投与により、マウス血中HCV RNAは著明に低下したが、投与中、耐性株(NS3領域のV36A変異)の出現により、breakthroughを起こすマウスが存在した。TelaprevirにIFN-aを併用投与することにより、より強い抗HCV効果およびbreakthroughの予防が可能であった。MK0609も単独投与により著明にマウス血中HCV RNAを低下させたが、telaprevirと同様、投与中に耐性株(NS5B領域のS282T変異)の出現により、breakthroughを起こすマウスが存在した。TelaprevirとMK-0609を併用投与すると、さらに強力な抗HCV効果を認め、すべてのマウスにおいてウイルスは投与1週後に検出感度以下に低下し、観察した投与終了18週後までウイルスの再上昇を認めず、おそらく完全排除されたものと思われた。

野生型(KT9)あるいは変異型HCVクローン(KT9-NS3-A156S)を肝臓内注入することによりマウス血中HCV RNAは陽性となり、HCV感染が確認された。変異型クローンを投与したマウスではHCV RNAは野生型に比べ明らかに低値であり、変異型HCVは野生型に比べ複製効率が低いことが示唆された。これらの感染マウスに200～300 mg/kgのtelaprevirを投与したところ、野生型感染マウスでは血中HCV RNAは著明に低下したが、耐性株感染マウスではHCV RNAの低下はわずかであった。これらの結果からNS3領域の

A156S変異は明らかにtelaprevir耐性であり、これらのシステムを用いて、種々の変異HCVの複製能および薬剤耐性能の検討が可能になると思われた。

D. 考察

HCV感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCV蛋白を標的とした薬剤の抗ウイルス効果や耐性株出現の評価が可能であり、異なる薬剤を併用することでIFN製剤を使用せずともウイルスの排除が可能であることが見出した。構築したHCVクローンをマウスに投与するシステムにより、生体内における変異株の増殖能および薬剤耐性能の検討が可能であった。

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製剤を使用せずともHCVの排除が可能である。変異型HCVの増殖能および薬剤耐性能を検討するシステムを構築した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, Hatakeyama T, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. J Med Virol. 2007;79:1811-7.
- Chen H, Takahashi S, Imamura M, Okutani E, Zhang ZG, Chayama K, Chen BA. Earthworm fibrinolytic enzyme: anti-tumor activity on human hepatoma cells in vitro and

- in vivo. *Chin Med J*. 2007;120:898-904.
- Matsumoto A, Tanaka E, Minami M, Okanoue T, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Suzuki F, Kobayashi M, Chayama K, Imamura M, Yotsuyanagi H, Nakaoka S, Maki M, Kawata S, Kumada H, Iino S, Kiyosawa K. Low serum level of hepatitis B core-related antigen indicates unlikely reactivation of hepatitis after cessation of lamivudine therapy. *Hepatol Res*. 2007;37:661-6.
 - Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett*. 2007;581:1983-7.
 - Hatakeyama T, Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Kawakami Y, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Kawakami H, Yatsuji H, Aisaka Y, Kohno H, Aimitsu S, Chayama K. Serum HBV RNA is a predictor of early emergence of the YMDD mutant in patients treated with lamivudine. *Hepatology* 2007;45:1179-86.
 - Noguchi C, Hiraga N, Mori N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Yatsuji H, Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Chayama K. Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. *J Gen Virol*. 2007;88:432-40.
 - Yatsuji H, Hiraga N, Mori N, Hatakeyama T, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Fujimoto Y, Ochi H, Abe H, Maekawa T, Suzuki F, Kumada H, Chayama K. Successful treatment of an entecavir-resistant hepatitis B virus variant. *J Med Virol*. 2007;79:1811-7.
 - 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.
 - 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. *Hepatol Res* 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, Daskali 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, Tateno 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, 岩尾英治, 茶山一彰. HCV 感染モデルマウスを用いた VX-950 の治療効果および耐性株出現の検討. 第 44 回日本肝臓学会総会 松山 平成 20 年 6 月 5 日.
 - 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, Kazuaki Chayama, et al. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon- α . 17th APASL. Kyoto
 - 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
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包括的な発現遺伝子解析を行うとともに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。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。同時期の免疫組織学的検討において、慢性炎症に伴う酸化ストレス（iNOS, 8-ニトログアニン）が亢進していることが観察された。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。これより、ウイルス肝炎における慢性炎症に伴って酸化ストレス、宿主因子の相互作用が蓄積され、発がんの分子病態が形成されていく過程が示された。

A. 研究目的

薬剤耐性HCV・HBV持続感染から慢性肝炎の進展、発がんに至る病態を検討するための適切な実験系が存在しなかった。そこで、B型肝炎ウイルス（HBV）持続感染マウスモデルを用いて、一連の分子病態の経時的特徴について宿主因子の相互関係を含めて解析した。

B. 研究方法

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、ウイルス抗原特異的な脾細胞（リンパ球）を移植することによって肝炎を発症した。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) 本モデル系における慢性肝炎の前期（～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。
- (2) 酸化ストレスに関する免疫組織学的検討においては、慢性肝炎からがん化への進展に伴いiNOSの活性化や8-OHdGが蓄積されてくることが分かった。
- (3) 慢性肝炎の前期には、肝組織においてHBV特異的なCD8陽性細胞障害性Tリ

ンパ球（CTL）が検出され（0.05%）、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) 慢性肝炎の後期には、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。

(6) これより、ウイルスに対する免疫反応が誘導する慢性肝炎に伴って一連の宿主因子の変動、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ことが示唆された。

D. 考察

慢性肝炎から発がんに至る過程は、30年以上に及ぶために詳細な観察を行うことは困難である。そこで、本研究ではウイルス抗原に対する免疫反応が、慢性炎症から発がんを誘導する病態生理学的なマウスモデルを用いて全経過を解析した。慢性肝炎の進展とともに分子病態の特徴が変遷することが観察された。これは発がんに対する予防的治療法を考案する上で重要な所見と考えられる。

さらに、本モデルは慢性炎症と発がんの分子病態を同時に対比することができる点も独創的である。炎症と発がんに共通する遺伝子群、発がんのみに特徴的な遺伝子群が区分して同定されたことは、既成の概念に依らない新規の標的治療を推察させる知見である。

E. 結論

薬剤耐性の肝炎について、B型肝炎マウ

スモデルの検討結果から、発がん病態における宿主側因子の新たな特徴が示唆され、今後の標的治療の開発が展望された。

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 alpha+ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J. Immunol.* 183: 3053-3063, 2009.
4. Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y and Kaneko S: Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res.* 68: 10267-10279, 2008
5. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Mukaida N and Kaneko S: Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation. *Cancer Sci.* 99: 2075-2082, 2008
6. 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
7. Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y and Kaneko S: Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 49: 946-954, 2008
8. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Tsuji H, Sakai Y, Kitahara M, Arai K, Yamashita T, Yokoyama K, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O and Kaneko S: Combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with intratumoral dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma: clinical safety. *Clin. Exp. Immunol.* 251: 36-42, 2007
9. Tachibana Y, Nakamoto Y, Mukaida N and Kaneko S: Intrahepatic interleukin-8 production during disease progression of chronic hepatitis C. *Cancer Lett.* 251: 36-42, 2007
10. Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Marukawa Y, Kitahara M, Mukaida N and Kaneko S: Prolonged, NK cell-mediated antitumor effects of suicide gene therapy combined with monocyte chemoattractant protein-1 against hepatocellular carcinoma. *J. Immunol.* 178: 574-583, 2007
11. Nakamoto Y and Kaneko S: Enhanced antitumor effects of suicide gene therapy combined with adenovirally delivered monocyte chemoattractant protein-1. *Recent Dev. in Gene Ther.* 2007
12. Kaji K, Nakamoto Y and Kaneko S: Analysis of hepatitis C virus-specific CD8+ T-cells with HLA-A*24 tetramers during phlebotomy and interferon therapy for chronic hepatitis C. *Oncol. Rep.* 18: 993-998, 2007
13. Komura T, Mizukoshi E, Kita Y, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Ohta T, Shimizu K, Nakamoto Y, Honda M, Takamura T and Kaneko S: Impact of diabetes on recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical treatment in patients with viral hepatitis. *Am. J. Gastroenterol.* 102: 1939-1946, 2007
14. Oishi N, Shilagardi K, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S and Murakami S: Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells. *Cancer Sci.* 98:1540-1548, 2007
15. Kita Y, Mizukoshi E, Takamura T, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Impact of diabetes mellitus on prognosis of

patients infected with hepatitis C virus. *Metabolism* 56: 1682-1688, 2007

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
3. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: #125; Prolonged recurrence-free survival following combined therapy of transcatheter hepatic arterial embolization with OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma.; **第59回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California)**: Hepatology 48 (4, Suppl.) 361A; 一般(parallel); oral: Nov. 2, 2008
4. Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S: #82; Cellular immune responses to multidrug resistance-associated protein 3 in the patients with hepatocellular carcinoma.; ; **第25回 Internal Association for the Study of the Liver (IASL) Biennial Meeting (San Francisco, California)**: Hepatology 48 (4, Suppl.) 343A; 一般(parallel); oral: Nov. 2, 2008
5. 中本安成, 金子周一: S 1-2; B型慢性肝炎を構築する獲得免疫と病態進展の分子機構; **第43回日本肝臓学会総会**; シンポ; 口演; 平成19年5月31日; 肝臓 48巻Suppl.1 PageA6(2007.04)
6. 中本安成, 金子周一: S-1; B型肝炎と獲得免疫; **第44回日本消化器免疫学会総会**; シンポ; 口演; 平成19年7月8日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（総合）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

研究分担者：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

C型肝炎ウイルス（HCV）感染の治療にペグインターフェロン（Peg-IFN）とリバビリン（RBV）の併用療法が用いられるが、ウイルスを完全に排除して治癒に至ることができない症例も少なからず存在する。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。本研究では、Peg-IFN/RBV 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について研究することを目的とした。また、HCV タンパク質と宿主タンパク質の相互作用の解析を通して、IFN 抵抗性の分子機序を明らかにすることを目的とした。その結果、以下のことを明らかにした。IFN/RBV 併用療法を受けた HCV-1b 慢性 C 型肝炎患者において、HCV NS5A の特定領域（IRRDR; IFN/RBV resistance-determining region; aa 362~407）のアミノ酸配列の変異数が 6 またはそれ以上（IRRDR \geq 6）の症例が、ウイルスを完全に排除する sustained virological response（SVR）と有意に相関した。また、IRRDR \geq 6 と野生型コアタンパク質（Arg⁷⁰/Leu⁹¹）は IFN/RBV 治療開始後 4 週間以内の早期のウイルス量の顕著な減少と有意に相関した。HCV-2a では、IRRDR の変異数が 2 以上（IRRDR[2a] \geq 2）の症例が SVR と有意に相関した。HCV-2b においては、IRRDR の N 末端領域（IRRDR/N[2b]）の変異数が 2 以上（IRRDR/N[2b] \geq 2）の症例では治療開始後 4 週間以内にウイルスが消失する rapid virological response（RVR）と有意に相関した。以上の結果より、HCV-1b、HCV-2a、HCV-2b 症例のいずれにおいても、IRRDR のアミノ酸配列の多様性が Peg-IFN/RBV の治療効果と相関することが明らかになった。一方、NS5A 結合宿主タンパク質として、GCN2 等、複数の候補を同定した。現在、それらの宿主タンパク質と NS5A の相互作用や IFN 抵抗性への関与について検討している。

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（RBV）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 ; sustained virological

response）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/RBV 併用療法による治療効果と相関するウイルス側因子として、HCV 非構造タンパク質 NS5A の特定領域 (IRRDR; IFN/RBV 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 に ISDR (IFN sensitivity-determining region; aa 237~276) とよばれる IFN 感受性と相関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/RBV 治療応答性と相関する可能性があることも報告されている⁴⁾。さらに、これらの相関は地域によって異なる可能性も指摘されている。一方、HCV-1b 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 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⁾。

本研究では、我が国の異なる地域から収集した患者血清を用いて、HCV-1b のみならず未だ解析が十分になされていない HCV-2a や HCV-2b を含めて、Peg-IFN/RBV 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 及び HCV-1b のコアタンパク質 70 位、91 位の多様性と、IFN 感受性/抵抗性との相関について、比較検討した。さらに、HCV の IFN 抵抗性に NS5A が直接関与するか否かを実験室レベルで検証し、NS5A と宿主タンパク質の相互作用を解析して NS5A の機能及び IFN 抵抗性の分子機序を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 患者 : HCV-1b 慢性肝炎の治療のため、48 週間の Peg-IFN/RBV 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。HCV-2a 及び HCV-2b 慢性肝炎症例では 24 週間の Peg-IFN/RBV 併用療法後 24 週間の経過観察により治療効果を判定できた患者。治療効果の指標として SVR 以外に、治療開始後 4 週間以内にウイルスが消失する rapid virological response (RVR)、治療開始後 12 週間以内にウイルスが消失する early virological response (EVR)、及び Peg-IFN/RBV 投与終了時点でウイルスが消失する end-of-treatment response (ETR) についても検討した。

2) HCV 遺伝子の解析 : RT-PCR 法により、治療開始前の血清中 HCV の種々の遺伝子領域 (IRRDR、ISDR を含む全長 NS5A 及びコアタンパク質領域) 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。

4) NS5A 結合宿主タンパク質の探索と同定 : 既報の方法により、タンデムアフィニティー結合法、免疫共沈法、試験管内 GST プルダウン法及び Yeast two-hybrid 法を用いて NS5A と結合する宿主タンパク質を探索し、質量分析法あるいは免疫ブロット法により当該タンパク質を同定した。

(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。遺伝子組換え実験は神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得た。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-1b の IRRDR 及び ISDR 多様性並びにコアタンパク質変異と Peg-IFN/RBV 治療応答性の相関 :

HCV-1b 慢性肝炎患者集団においては、IRRDR 高変異(≥ 6) の 24 症例中 18 例 (75%) が SVR であり、一方、IRRDR ≤ 5 では 44 症例中 11 例 (25%) が SVR で、IRRDR ≥ 6 と SVR の間に有意の相関が認められた ($p < 0.0001$)。また、IRRDR 内の特定のアミノ酸変異について検討したところ、Ala³⁸⁸ では 18 症例中 12 例 (67%) が SVR で、Non-Ala³⁸⁸ では 50 症例中 17 例 (34%) が SVR で、Ala³⁸⁸ と SVR の相関は有意であった ($p = 0.03$)。

コアタンパク質の解析では、野生型 (Arg⁷⁰/Leu⁹¹) の 33 症例中 18 例 (55%) が SVR であり、変異型 (Non-Arg⁷⁰/Leu⁹¹) では 35 症例中 11 例 (31%) が SVR で、Arg⁷⁰/Leu⁹¹ と SVR の間に有意の相関は認められなかった ($p = 0.1$)。また、変異型コアタンパク質について調べたところ、Gln⁷⁰ の 21 症例中 16 例 (76%) が Non-SVR であり、Non-Gln⁷⁰ では 47 症例中 23 例 (49%) が Non-SVR で、Gln⁷⁰ は Non-SVR と相関する傾向が認められた ($p = 0.06$)。しかし、Met⁹¹ と Non-SVR との相関は認められなかった ($p = 0.59$)。一方、EVR や ETR の観点から解析すると、変異型コアタンパク質 (Non-Arg⁷⁰/Leu⁹¹ または Gln⁷⁰) は Non-EVR や Non-ETR と有意の相関を示した (いずれも $p = 0.009$)。

IRRDR ≥ 6 及び R⁷⁰/L⁹¹ は、Peg-IFN/RBV 併用療法開始 1 日後 (1 Log)、1 週間後 (1 Log)、2 週間後 (1.5 Log) 及び 4 週間後 (2 Log) の HCV コア抗原量の減少を示す患者に有意に多く認められた。

ISDR 多様性についても検討したが、変異数が ≥ 4 、 ≥ 2 、 ≥ 1 のいずれの場合でも、SVR との有意の相関は認められなかった。しかし、ISDR ≥ 2 と RVR の間には有意の相関が認められた ($p = 0.003$)。

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

2) HCV-2a の IRRDR 及び ISDR 多様性と

Peg-IFN/RBV 治療応答性の相関 :

HCV-2a 慢性肝炎患者において、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。

SVR と Non-SVR の間の比較では、receiver operating characteristic curve (ROC) 解析により、IRRDR[2a] ≥ 2 と IRRDR[2a] ≤ 1 に分けるのが最適であると考えられた。IRRDR[2a] ≥ 2 の 18 症例中 17 例 (94%) が SVR であり、一方、IRRDR[2a] ≤ 1 の 5 症例中 2 例 (40%) が SVR で、IRRDR[2a] ≥ 2 と SVR の相関は有意であった ($p = 0.02$)。

HCV-2a の ISDR+C[2a] の多様性に関する 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 の 14 症例のすべてが SVR で、ISDR+C[2a]=0 では 9 症例中 5 例 (56%) が SVR であり、ISDR+C[2a] ≥ 1 と SVR の相関は有意であった ($p = 0.01$)。

多変量解析により、IRRDR[2a] ≥ 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/RBV 治療応答性の相関 :

HCV-2b 慢性肝炎患者において、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 10 症例はすべて RVR で、IRRDR/N[2b] ≤ 1 では 11 症例中 5 例

(45%)がRVRでありIRRDR/N[2b]≥2とRVRの相関は有意であった ($p=0.01$)。一方、IRRDR/N[2b]≥2とSVRの有意の相関は認められなかった。

4) NS5A 結合宿主タンパク質の探索・同定:

a) タンデムアフィニティー結合法による解析: NS5A と特異的に結合する宿主タンパク質候補のバンドがポリアクリルアミドゲル上で10種類以上確認され、質量分析法で同定された。現在それらのタンパク質の機能解析を行っている。

b) 試験管内 GST プルダウン法による解析: IFN 処理 HeLa 細胞抽出液中に、GST 融合 NS5A と特異的に結合する分子量約 200 kDa のタンパク質 (IFN-induced p200) が存在することを見出した。アミノ酸解析により、eIF2 ファミリーに属する GCN2 と同定した。

D. 考察

本研究により、HCV-1b NS5A の IRRDR の多様性が Peg-IFN/RBV 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≥6 は SVR の予測因子として有用であることが示された。また、IRRDR≥6 は、Peg-IFN/RBV 併用療法開始 1 日後～4 週間後という非常に早期のウイルス量の減少と相関したことから、主に Peg-IFN による抗ウイルス効果と相関している可能性が示唆された。また、IRRDR 以外にも、コアタンパク質 70 位と 91 位の多様性及び ISDR の多様性も、RVR、EVR、ETR のように治療中の異なる時期を指標にして検討すると、Peg-IFN/RBV 治療応答性と有意に相関する傾向があることもわかった。

さらに、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/RBV 治療応答性 (SVR、RVR) 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 症例の SVR 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 と有意の相関を示した。HCV-2a や HCV-2b 症例では、Peg-IFN/RBV 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、本研究結果より、IRRDR[2a]≤1 や IRRDR/N[2b]≤1 の症例では、Peg-IFN/RBV 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。

また、本研究で同定された新規の NS5A 結合宿主タンパク質の機能と IFN 抵抗性への関与については今後詳細に検討する必要があると考えられた。

E. 結論

HCV-1b による慢性 C 型肝炎患者の Peg-IFN/RBV 併用療法において、IRRDR≥6 は SVR 予測因子として有用であることが示された。HCV-2a 及び HCV-2b による慢性 C 型肝炎の Peg-IFN/RBV 併用療法においても、IRRDR[2a]≥2 は SVR の、また、IRRDR/N[2b]≥2 は RVR の予測因子として、それぞれ有用であ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 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。

さらに、タンデムアフィニティー結合法及び試験管内 GST プルダウン法により、GCN2 を含む複数の新規 NS5A 結合宿主タンパク質を同定した。今後、それらの宿主タンパク質の機能や IFN 抵抗性への関与について詳細に検討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, and Hotta H. Prediction of efficient 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, et al. 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, et al. 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, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet*, 41:1100-1104, 2009.
 - 7) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α 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. El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Prediction of efficient virological response to pegylated interferon/ribavirin combination therapy by NS5A sequences of Hepatitis C virus and anti-NS5A antibodies in pre-treatment sera. *Microbiol Immunol* 51:471-482, 2007.
 2. El-Shamy A, Nagano-Fujii M, Sasase N, Imoto S, Kim SR, Hotta H. Sequence variation in hepatitis C virus nonstructural protein 5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Hepatology* 48:38-47, 2008.
 3. Deng L, Adachi T, Kitayama K, Bungyoku Y, Kitazawa S, Ishido S, Shoji I, Hotta H. Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase-3-dependent pathway. *J Virol* 82:10375-10385, 2008.
 4. Sasase N, Kim SR, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hotta H, Shoji I, El-Shamy A, Kawada N, Kudo M, Hayashi Y. Usefulness of new immuno-radiometric assay of HCV core antigen to predict virological response

- during PEG-IFN/RBV combination therapy for chronic hepatitis with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology* 51(Suppl 1):70-75, 2008.
5. Inubushi S, Nagano-Fujii M, Kitayama K, Tanaka M, An C, Yokozaki H, Yamamura H, Nuriya H, Kohara M, Sada K, Hotta H. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with and negatively regulates the non-receptor protein-tyrosine kinase Syk. *J Gen Virol* 89:1231-1242, 2008.
 6. 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.
 7. 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
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 金守良, 井本勉, 婦木秀一, 金啓二, 谷口美幸, 長野基子, 堀田博, 勝二郁夫, 寒原芳浩, 前川陽子, 工藤正俊, 林祥剛. 1b型高ウイルス量高齢者C型慢性肝炎に対するPEG IFN α -2b/リバビリン治療(併用療法)の検討. *肝臓* 49(4):145-152, 2008.
 14. 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(DPPP)+IFN- β
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.

2. 学会発表

1. Hotta H, El-Shamy A, Sasayama M, Nagano-Fujii M, Imoto S, Sasase N, Kim S-R. Sequence variation of interferon/ribavirin resistance-determining region (IRRDR) of HCV NS5A is a predictive marker for sustained virological response upon combination therapy with pegylated interferon and ribavirin. 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease. November 2-6, 2007. Boston, Massachusetts, USA.
2. Ahmed El-Shamy, 笹山美紀子, 長野基子, 金守良, 堀田博. C 型肝炎ウイルス NS5A V3 領域近傍のアミノ酸配列多様性: ペグインターフェロン・リバビリン併用療法における SVR 予測因子の検討. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 2007. 札幌.
3. El-Shamy A, Apichartpiyakul C, Kim SR, Adachi T, Shoji I, Hotta H. Polymorphism of HCV-1b core protein and interferon/ribavirin resistance-determining region (IRRDR) of NS5A predicts clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. 15th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. October 5-9, 2008. San Antonio, Texas, USA.
4. Hotta H. Sequence variation of the hepatitis C virus genome and its correlation with viral pathogenicity. 8th Asia Pacific Congress of Medical Virology, February 26-28, 2009. Hong Kong.
5. 堀田博, El-Shamy Ahmed, 長野基子, 勝二郁夫, 笹瀬典子, 井本勉, 金守良. ペグインターフェロン/リバビリン併用療法におけるウイルス側の SVR 予測因子の検討. 第 44 回日本肝臓学会総会, 2008. 松山.
6. 金守良, 井本勉, 婦木秀一, 堀田博, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子. PEG-IFN+リバビリン併用療法(併用療法)の治療効果予測におけるウイルス dynamics の検討. 第 44 回日本肝臓学会総会, 2008. 松山.
7. エルシャーミアームド, 足達哲也, 犬伏祥子, 勝二郁夫, 堀田博. ペグインターフェロン/リバビリン併用療法における HCV Core および NS5A の多様性による SVR 予測因子と Non-SVR 予測因子の検討. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 2008. 岡山.
8. 金守良, 井本勉, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 堀田博. ペグインターフェロン+リバビリン併用療法(併用療法)で急性膵炎を合併し、16 週で中断したが、著効となった 1b 型高ウイルス量 C 型慢性肝炎の一症例. 第 12 回日本肝臓学会大会, 2008. 東京.
9. 金守良, 井本勉, 堀田博. ペグインターフェロンを用いた慢性 C 型肝炎治療 ペグインターフェロン+リバビリン併用療法(併用療法)におけるウイルス側 SVR, Non-SVR 予測因子の検討及び早期ウイルスダイナミクスとの関係. 第 37 回日本肝臓学会東部会, 2008. 東京.
10. 金守良, 井本勉, 堀田博. 1b 型高ウイルス量高齢者 C 型慢性肝炎に対する PEG IFN α -2b/リバビリン併用療法(併用療法)の検

討：発癌抑制と中断対策を中心に. 第 37 回日本肝臓学会東部会, 2008. 東京.

11. 斎藤貴史, 堀田博, 河田純男. C 型肝炎の近未来治療：HCV NS3 蛋白質二次構造の多型性とペグインターフェロン・リバビリン併用療法の効果予測. 第 12 回日本肝臓学会大会, 2008. 東京.
12. 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.
13. 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 α -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.
14. 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.
15. 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. 京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

分担研究報告書（総合報告書用）

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 現行のC型肝炎治療薬また開発中のウイルス酵素阻害剤に対する耐性ウイルスの特徴及び耐性獲得の分子機構の解明を目的とした。

HCV サブゲノムレプリコン細胞を使って、リバビリンに対する耐性 HCV genotype 2a HCV をはじめて見出した。この耐性獲得には NS5B 領域の点変異が重要であることが示唆された。HCV 持続感染細胞系を利用して HCV プロテアーゼ阻害剤 BILN2061 に対する耐性ウイルスを取得した。HCV 遺伝子解析の結果、NS3 領域に2カ所のアミノ酸変化を伴う特徴的な変異（V71A、K122R）が見出された。両変異は耐性獲得に重要であり、相加的に働く可能性が示唆された。この2変異はHCVの複製効率に影響を与えないことを示した。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。

本研究成果は、C型慢性肝炎患者への抗ウイルス療法における薬剤耐性ウイルスの出現予測とその対策に役立つとともに、新規抗HCV薬の開発研究にとって有用な知見となり得る。

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、創薬化の可能性が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した。

B. 研究方法

HCV 遺伝子型 2a JFH-1 株のサブゲノムレプリコンプラスミド (pSGR-JFH1) 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。得られたレプリコン RNA

をエレクトロポレーション法により Huh7 細胞へ導入した。G418 存在下で4週間培養し、HCV RNA 自立複製細胞株（以下レプリコン細胞）を取得した。このレプリコン細胞に RBV を種々の濃度で添加し3日、8週間、または20週間培養後、細胞内の HCV RNA レベルをリアルタイム RT-PCR 法により定量的に測定した。

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

HCV genotype 2a JFH-1 株のサブゲノムレプリコン細胞をC型肝炎治療薬リバビリン (RBV) 存在下で長期間培養した。100 μ M RBV を8週間処理した場合、リバビリン耐性細胞の出現は観察されなかったが、200 μ M RBV 存在下で20週間培養することでレプリコン細胞がRBV耐性化することを見出した。RBV耐性レプリコン細胞中のHCV遺伝子(NS3~NS5B領域:約6 kb)の塩基配列を決定した結果、耐性細胞のHCV遺伝子には、アミノ酸変化を伴う特徴的な変異がNS3、NS4B、NS5A、NS5B領域に各1カ所(T1134S、P1969S、V2405A、Y2471H)存在することを見出した。各変異をそれぞれ導入したルシフェラーゼレプリコンプラスミドを構築し、合成RNAを細胞へ導入した。各変異体の複製細胞へRBVを添加し抗HCV活性を調べた結果、NS5B領域の点変異(Y2471H)がJFH-1クローンのRBVに対する耐性獲得に関与する可能性が示された。

HCV JFH-1株の持続感染Huh7細胞を作製し、HCVプロテアーゼ阻害剤BILN2061 100 nMをHCV持続感染細胞に添加し3ヶ月間継代培養を行った結果、BILN2061に対して耐性のHCVが出現した。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

(V71A、K122R)が見出された。各変異を導入したHCVゲノム(JFH1V71A、JFH1K122R、JFH1V71AK122R)を作製し変異ウイルスを得た。各ウイルスの感染細胞についてBILN2061によるHCV産生阻害作用を調べることにより、各1カ所の変異でBILN2061に対する感受性の低下傾向が見られ、両変異を有する場合、感受性低下は最も顕著であった。両変異が耐性獲得に重要であることが示唆された。

さらに、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、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結果、インターフェ

ロンalpha、リバビリン、シクロスポリンまたHCVプロテアーゼ阻害剤であるVX-950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

RBVに対して耐性を示すgenotype 2aのHCVが初めて見出された。さらに、この耐性獲得にはNS5B領域の点変異が重要であることが示された。NS5B蛋白はRNAポリメラーゼであり、Y2471Hの変異が、RBVによるHCV RNA複製阻害作用からのエスケープに働いているのかもしれない。本研究成果は、C型慢性肝炎患者への抗ウイルス療法における薬剤耐性ウイルスの出現予測とその対策に役立つとともに、核酸代謝拮抗剤の抗HCV薬としての開発研究にとって有用な知見となるものと期待される。

本研究で初めてHCV持続感染細胞系が薬剤耐性ウイルスの解析に有用であることが示され、プロテアーゼ阻害剤に対する耐性獲得に関与する新たなアミノ酸変異が同定された。NS3領域のアミノ酸71、122番についてデータベースに登録されているgenotype 1a、1b、2a、2bクローンを比較した。その結果、アミノ酸71番目はgenotype 1a、2a、2bでバリンが、genotype 1bではイソロイシンがそれぞれドミナントであった。またアミノ酸122番目は、genotype 1a、1bではセリンが、genotype 2aではリジンが、genotype 2bではアルギニンがそれぞれドミナントであった。K122Rはgenotype 2a選択的な変異、V71Aは他のgenotypeでも生じ得ることが示唆された。また、genotype 2bのうち8.7%のpopulationではアミノ酸71、122番はそれぞれアラニン、アルギニンであることから、genotype 2b感染者にはプロテアーゼ阻害剤に対して感受性の異なる集団が存在する可能性が示された。

E. 結論

サブゲノムレプリコン細胞系を使って、RBVに対する耐性HCV genotype 2a HCVをはじめて

見出した。この耐性獲得には NS5B 領域の点変異が重要であることが示唆された。

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. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 1200-1212 (2007).
2. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* 42: 411-23 (2007).
3. Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81:1174-1185 (2007).
4. Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1727-1735 (2007).
5. Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 1661-1666 (2007).
6. Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee YJ, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Mori K, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes Infect.* 9: 515-21 (2007).
7. Mizutani T, Endoh D, Shirato K, Shimizu H, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Kwang L, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H. Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 322-324 (2007).
8. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J. Virol.* 81: 8030-8040 (2007).
9. Inoue Y, Murakami K, Hmwe SS, Aizaki H, Suzuki T. Transcriptomic comparison of human hepatoma Huh-7 cell clones with different hepatitis C virus replication efficiencies. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 173-178 (2007).
10. Akazawa D, Date T, Morikawa K, Murayama A, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Ishii K, Suzuki T, Mizokami M, Mochizuki H, Wakita T. Characterization of infectious hepatitis C virus from liver-derived cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 747-751 (2008).
11. 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).
12. Ishii, K., Murakami, K., Hmwe, S.S., Bin, Z., Li, J., Shirakura, M., Morikawa, K., Suzuki, R., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. Trans-encapsidation of hepatitis C virus subgenomic replicon RNA with viral structure proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 446-450 (2008).
 13. Aizaki, H., Morikawa, K., Fukasawa, M., Hara, H., Inoue, Y., Tani, H., Saito, K., Nishijima, M., Hanada, K., Matsuura, Y., Lai, M.M., Miyamura, T., Wakita, T., Suzuki, T. A Critical Role of Virion-Associated Cholesterol and Sphingolipid in Hepatitis C Virus Infection. *J. Virol.* 82: 5715-5724 (2008).
 14. Okamoto K., Mori Y., Komoda Y., Okamoto T., Okochi M., Takeda M., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Intramembrane processing by signal peptide peptidase regulates the membrane localization of hepatitis C virus core protein and viral propagation. *J. Virol.* 82: 8349-8361 (2008).
 15. Okamoto T., Omori H., Kaname Y., Abe T., Nishimura Y., Suzuki T., Miyamura T., Yoshimori T., Moriishi K., and Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* 82: 3480-3489 (2008).
 16. Taguwa S., Okamoto T., Abe T., Mori Y., Suzuki T., Moriishi K., and Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* 82: 2631-2641 (2008).
 17. Omata, K., Suzuki, R., Masaki, T., Miyamura, T., Satoh, T., Suzuki, T. Identification and characterization of the human inhibitor of the caspase-activated DNase gene promoter. *Apoptosis.* 13: 929-937 (2008).
 18. Murakami, K., Kimura, T., Osaki, M., Ishii, K., Miyamura, T., Suzuki, T., Wakita, T., Shoji, I. Virological characterization of HCV JFH-1 strain in lymphocytic cell lines. *J. Gen. Virol.* 89: 1587-1592 (2008).
 19. Murakami, K., Inoue, Y., Hmwe, S.S., Omata, K., Hongo, T., Ishii, K., Yoshizaki, S., Aizaki, H., Matsuura, T., Shoji, I., Miyamura, T., Suzuki, T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *J. Virol. Methods.* 148: 174-181 (2008).
 20. 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.
 21. 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.
 22. Kukihara H, Moriishi K, Taguwa 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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
総合分担研究報告書

薬剤耐性及び治療効果に関する HBV, HCV 遺伝子の解析

分担研究者 鈴木文孝 国家公務員共済組合連合会虎の門病院 肝臓センター 医長

研究要旨; B型慢性肝疾患に使用されている核酸アナログ製剤の長期投与では、耐性ウイルスの出現が問題となっている。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。さらに耐性ウイルスを測定する新たな測定系(Invader assay)を作成し、その有用性を調べた。また C 型慢性肝炎症例(genotype 1b、高ウイルス量)に対する治療の基本である Pegylated Interferon (PEG-IFN)と Ribavirin (RBV)併用療法48週間投与の治療効果予測因子を検討した。さらに NS3-4A protease inhibitor である Telaprevir の治療成績についても検討を行った。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。エンテカビル耐性ウイルスは Invader assay にて検出され従来の測定法よりも早期に検出可能であった。一方 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+RBV12週間併用療法を施行した 20 例では、naive 例の SVR 率は 70%でありでは 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。また核酸アナログ製剤は、抗ウイルス効果が高く、副作用も少ないため多くの症例で使用されている。しかし核酸アナログ製剤の長期使用においては薬剤耐性ウイルスの出現が認められる。現在までに本邦で使用されている核酸アナログ製剤にはラミブジン、アデフォビル、エンテカビルの3種類がある。このうちラミブジン

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。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。一方エンテカビルは最も薬剤耐性ウイルスの出現が少ないと報告されている。しかし、エンテカビルにてもラミブジン耐性ウイルス出現例ではエンテカビル耐性ウイルス出現の可能性がある。また遺伝子学的にエンテカビル耐性ウイルスのパターンには3種類ありこの測定系は確立されていない。