

そこでエンテカビル耐性ウイルスの遺伝子学的パターンを調べ新たな測定系を作成した。

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、まだ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。また効果に関係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効果に関係する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。さらに Invader assay による測定を施行し、従来の測定系である PCR-direct sequence 法と比較した。

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、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 rt T184I, 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%)に併用療法施行後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) エンテカビル耐性ウイルスに関係する遺伝子変異と検出系の開発

エンテカビル耐性ウイルスは HBV ポリメラーゼ領域内の reverse transcriptase(rt)領域の rt184, rt202, rt250 に認められる。これらの変異を検出するために Invader assay による測定系を作成した。Invader assay の測定原理は rt 領域内で PCR を施行し、その後 wild type 及び mutant type 用に作成した Invader oligo と primary probe を反応させ、適合した primary probe の 5' flap が遊離したものを FRET cassette にて捕捉するものである。測定感度は 10^7 copies の wild type の plasmid 存在下で 1% の mutant を検出可能であった。この測定系を使用してエンテカビル

耐性ウイルスの出現を確認している 10 例の血清で検討した。耐性ウイルスのタイプは rtS202G が 5 例、rtT184A/L/F が 5 例であった。Invader assay にて全症例で耐性ウイルスが検出され、PCR-direct sequence での測定時期よりも平均 6.4 ヶ月早期に検出された。

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

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; $P=0.003$)、 γ GTP(>35 ; $P=0.032$)、であった。

(7) 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。naive 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。一方本邦においてはエンテカビル耐性ウイルスを簡単に検出する測定系は確立されていない。またエンテカビル耐性ウイルスの変異パターンには rtT184L/M/F/A/C/G、rtS202I/G、rtM250V/L が報告されている。従ってこれらを網羅した測定系を作成する必要がある。今回我々は Invader assay を用いた測定系を作成しエンテカビル耐性ウイルスの検出を実際の血清を用いて施行した。この結果、従来の PCR-direct sequence 法よりも高感度に測定できることが示された。今後はさらに症例数を増やし検討する予定である。

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 naive 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。ウイルス学的因子を含め、総合的に治療効果を予測し、無駄のない医療を行なう必要がある。

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り注意が必要である。またB型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤による耐性ウイルスの新たな測定系(Invader assay)の検討をおこなった。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

Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, et al. Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy: Two-year follow-up. *Journal of Hepatology*, 48; 923-931, 2008.

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. *Hepatol Res*. 2009;39:1056-63.

Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, et al.

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、鈴木 義之、熊田 博光。
シンポジウム:B型肝炎、治療。第43回日本肝臓学会総会、東京、2007.5.31.

鈴木 文孝、熊田 博光。
シンポジウム 1:C型肝炎に対するPEG-IFNとRibavirin併用療法の治療成績、第11回日本肝臓学会大会、DDW、神戸、2007.10.18.

鈴木 文孝、熊田 博光。
ワークショップ8:B型慢性肝炎の治療成績と治療戦略、第94回日本消化器病学会総会、福岡、2008.5.10.

鈴木 文孝、芥田 憲夫、熊田 博光。
シンポジウム 1:C型慢性肝炎に対するPEG-IFNとRibavirin併用療法の治療成績と難治例の解析、第44回日本肝臓学会総会、東京、2008.6.5.

鈴木 文孝、芥田 憲夫、熊田 博光。
シンポジウム 14:C型慢性肝炎に対するNS3-4A protease inhibitor (Telaprevir;MP-424)の治療成績、第12回日本肝臓学会大会、JDDW、東京、2008.10.2.

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、2009.6.4.

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、2009.10.15.

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：
HCV感染におけるインターフェロン応答を抑制する機構の宿主側因子

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) NS4BがCardif及びその下流のRIG-I依存性インターフェロンβ発現応答を抑制することを確認し、その作用エピトープがNS4BのN末端よりのドメインであることを確認した。2) 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 (*Hepatology* 2009)。引き続きIFN発現応答の抑制に関与することが新たに見出されたNS4B蛋白についてその標的蛋白・作用エピトープの特定をすすめること、また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増殖細胞におけるIFN発現応答の抑制に関与することが見出されたNS4B蛋白およびNS34A蛋白についてその標的蛋白・作用エピトープを特定する。これらの分子間相互作用を蛍光免疫顕微鏡、FRET法などで視覚化し詳細な解析を行う。
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) 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。

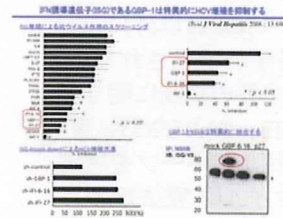
なお当研究は本学組み換えDNA実験安全管理規定に準拠して行われる。ヒトの細胞および組織を用いた研究にあたっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に準じて当該施設倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得た上で、人権及び利益の確保を

C. 研究結果

- 1) NS4BがCardif及びその下流のRIG-I依存性IFNβ発現応答を抑制することを確認し、その作用エピトープがNS4BのN末端よりのドメインであることを確認した。NS4BとRIG-I経路関連蛋白の分子間相互作用を解析し、作用する宿主蛋白、結合エピトープを検討中。



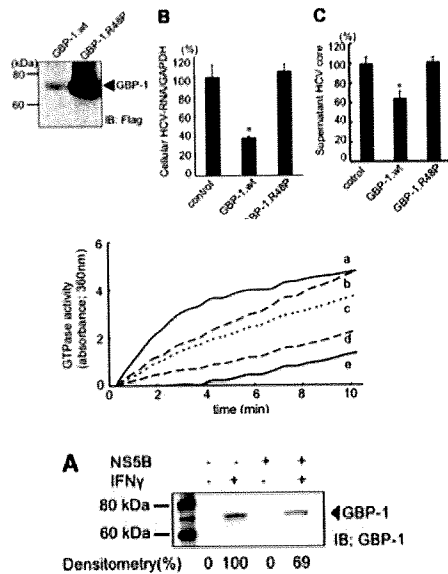
- 2) HCV培養系でISGであるGBP-1、IFI-27、IFI6-16がHCV増殖を特異的に抑制することを新たに見出した。



- 3) 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。

- 4) NS5BがGBP-1のもつGTPase活性を阻害すること、さらにNS5B存在下ではGBP-1蛋白発現が抑制されること

行うよう配慮する。



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際がある。

E. 結論

IFN 発現応答の抑制蛋白として NS34A 以外に NS4B が同定され、N 末端の関与が示唆された。HCV 増殖細胞における IFN 発現応答の抑制に関与することが見出された NS4B 蛋白、および NS34A 蛋白についてその標的蛋白・作用エピトープを特定することは新規クラスの抗ウイルス療法剤の開発につながる事が期待される。また、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。

が確認された。 (Itsui et al, *Hepatology* 2009)

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

これまでの報告で追加ありません。

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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. Real-time PCR 法による HBV 多剤耐性変異 M204I/V の高感度検出法を開発した。
2. 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。
3. C 型肝炎の病態，特に炎症と線維化を規定するインターフェロン関連分子 2,5-AS と TLR3 の多型を同定した。
4. 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。
5. 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 型肝炎の治療に用いられる核酸アナログは高率に耐性株を生じることが最大の問題となっており，高感度で迅速な耐性株検出法の開発が急務である。本研究では Taqman Minor Groove Binding (MGB) probe を応用し，real-time PCR 法により，核酸アナログ多剤耐性変異である M204V/I 耐性株を迅速かつ定量的に検出する方法を確立することを目的とした。
2. 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，①HBx の寄与，②HBV 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。

3. 慢性 C 型肝炎治療に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が，その効果を規定する宿主側因子を同定する目的で，インターフェロン関連分子の single nucleotide polymorphisms (SNPs) につき解析を行う。

4. 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、コアの変異と肝発癌との関連につき検討し、コアと肝発癌との関連を明らかにする。
5. 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) 率が高い。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 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 ポリメラーゼの逆転写酵素部位の C ドメインの M204V/I 変異を高感度に検出する real-time PCR 系を確立する。また、実際の患者血清を用いて、M204V/I 変異の高感度検出を行う。
2. 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、③siRNA 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。
3. C型肝炎患者 437 例の白血球 DNA を用いて、Toll-like receptor (TLR) 3 遺伝子の 5 か所の SNPs につき、Taqman 法を用いて遺伝子型を決定し、臨床情報との関連につき検討した。また、同様に、C型肝炎患者 409 例の白血球 DNA を用いて、2'-5'-Oligoadenylate synthetase (2,5-AS) 遺伝子の 6 か所の SNPs につき、Taqman 法を用いて遺伝子型を決定し、臨床情報との関連につき検討した。
4. 4 つの Global database から、ジェノタイプ 1b HCV で肝発癌の有無につき情報のある患者のコア領域のシークエンスを取

集し、肝癌関連変異につき検討した。

5. 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. HBV 多剤耐性変異 M204I/V の高感度検出法を樹立した。M204V の検出感度は 10 コピー、10%、また M204I の検出感度は 50 コピー、10%であった。実際にラミブジン治療を行っている患者血清を用いて検討し、高感度に少量の M204I/V 変異を検出し得た。
2. 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、③siRNA 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 NFκB, AP-1, Wnt/β-catenin, Androgen receptor pathway などとは関係がなかった。

3. C 型肝炎患者において、TLR3 の SNP C6300T は GPT 値および血小板値と関連していた。TLR3 SNP C6300T は Exon 4 に存在し、Leu412Phe アミノ酸置換により、インターフェロン β 誘導能が減弱することを明らかにした。また、2,5-AS の SNP A4119G は GPT 値および肝硬変と関連していた。2,5-AS SNP A4119G は Exon 3 に存在し、Ser162Gly アミノ酸置換により、抗 HCV subgenomic replicon 活性が減弱することを明らかにした。
4. 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。
5. 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. Taqman MGFプローブを用いてHBV多剤耐性変異 M204V/I を高感度に検出可能となったことにより、核酸アナログ耐性株の早期検出が可能となった。核酸アナログ併用療法などへの変更を迅速に判断できるようになると期待される。
2. 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。
3. C型肝炎患者においては、HCV増殖抑制効果が弱い、あるいは、インターフェロン誘導能が弱い遺伝子型を有する患者では、肝病変が進展しやすいと考えられた。
4. 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。

5. 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. Taqman MGBプローブを用いて、B型肝炎ウイルス多剤耐性変異 M204I/V の高感度検出法を開発した。
2. 組込み由来のFusion HBxが発癌に重要な役割を担っていた。
3. C型肝炎の病態、特に炎症と線維化を規定するインターフェロン関連分子 2,5-AS と TLR 3 の多型を同定した。
4. コア蛋白 aa70 置換は肝癌と関連していた。
5. 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) Sermasathanasawadi R, Kato N, Muroyama R, Dharel N, Shao R-X, Chang J-H, Li C-Z, Kawabe T, Omata M. Association of IRF-7 gene polymorphism with liver cirrhosis in chronic hepatitis C patients. *Liver Int* 2008; 28: 798-806

- 2) Hua R, Tanaka Y, Fukai K, Tada M, Seto M, Asaoka Y, Ohta M, Goto T, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M. Rapid detection of the hepatitis B virus YMDD mutant using TaqMan-minor groove binder probes. *Clinica Chimica Acta* 2008; 395: 151-154
- 3) 加藤直也, 五藤忠, 小俣政男. ウイルス性慢性肝炎: 診断と治療の進歩 III. B型慢性肝炎の抗ウイルス療法 3. 抗ウイルス薬の将来. *日本内科学会雑誌* 2008; 97 (1): 50-56
- 4) 加藤直也, 小俣政男. B型慢性肝炎の治療. *からだの科学* 2008; 258: 114-118
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 室山良介, 加藤直也, 小俣政男. IRF7多型とC型肝炎変遷進展リスク. *肝胆膵* 2009; 59(6): 1181-1186.
- 11) 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
2. 学会発表
- 1) Sermsathanasawadi R, Kato N, Muroyama R, Shao R-X, Chang J-H, Li C-Z, Kawabe T, Omata M. IRF-7 gene polymorphisms are associated with liver cirrhosis in chronic hepatitis C patients. 第43回日本肝臓学会総会. 2007/6/1. 東京
- 2) 加藤直也, 常金海, 小俣政男. C型肝炎ウイルス増殖と病態を規定するインターフェロン関連分子とその多型. 第94回日本消化器病学会総会. 2008/5/8. 福岡
- 3) 室山良介, 加藤直也, 大塚基之, 常金海, 川邊隆夫, 小俣政男. HBV-DNA組み込み由来の Fusion 蛋白は肝発癌および進展に関連する. 第44回日本肝臓学会総会. 2008/6/5. 松山
- 4) 常金海, 加藤直也, 室山良介, 川邊隆夫, 小俣政男. C型肝炎ウイルスに対する MxA の増殖抑制効果. 第44回日本肝臓学会総会. 2008/6/5. 松山
- 5) 加藤直也, 山田尚弘, 小俣政男. 創薬のターゲットとなるC型肝炎ウイルス NS5A と結合する宿主蛋白の同定. 第12回日本肝臓学会大会. 2008/10/2. 東京
- 6) 室山良介, 加藤直也, 小俣政男. 組み込みB型肝炎ウイルス由来の HBx による新しい肝

- 発癌メカニズムの提唱とその検証. 第 12 回日本肝臓学会大会. 2008/10/2. 東京
- 7) 常 金海, 加藤直也, 小俣政男. C型肝炎ウイルス増殖を規定するインターフェロン誘導遺伝子. 第 12 回日本肝臓学会大会. 2008/10/2. 東京
- 8) 室山良介, 加藤直也, 小俣政男. 組込み HBV より転写・翻訳される fusion HBx は肝発癌および進展に関連する. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008/10/29. 名古屋
- 9) Kato N. HCC susceptibility genes in patients with hepatitis C. Hong Kong Cancer Institute/AACR International Conference in conjunction with the State Key Laboratory in Oncology in South China, The Chinese University of Hong Kong. Infection and Cancer: Biology, Therapeutics, and Prevention. 2008/12/5-7. Hong Kong SAR, China
- 10) Kato N. Hepatitis C virus and innate immunity. 1st Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE. 2009/2/10. Tokyo, Japan
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) Kato N. Antivirals against hepatitis B and hepatocellular carcinoma. The Symposium of Liver Diseases, Jilin Province of China. 2009/8/8. Changchung, China.
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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

21) 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

22) 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

23) 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

24) 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

25) 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)
(総合)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

研究代表者 榎本 信幸 山梨大学 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て、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1年および2年間培養後におけるHCVゲノムの動態比較とIFN感受性試験を行い以下に示すような結果を得た。(1)HCVゲノムの遺伝的変異速度は $3.5-4.8 \times 10^{-3}$ 塩基置換/ヌクレオチド/年であり、遺伝的多様性の増大が観察された。2年間の培養により IFN- α に抵抗性を示す細胞の出現頻度が増加することを明らかにした(2)2年間培養後に得られた IFN- α 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することが分かった(3)IFN- α 抵抗性細胞由来の Total RNA を HCV が排除された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。

研究分担者 加藤 宣之
岡山大学 教授

を行った。

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っても、依然として半数は IFN 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に耐性を示すの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 HCV RNA 複製細胞を用いて以下に示すような実験

B. 研究方法

(1)長期培養による HCV ゲノムの遺伝的変動解析

5種類の全長 HCV RNA 複製細胞(O, OA, OB, OD および OE)の樹立時、1年培養時および2年培養時におけるHCVゲノムの塩基配列を決定した。全長 HCV ゲノムは 11 kb と長いので、前半部 5kb と後半部 6kb に分けて RT-PCR 法により増幅した。cDNA の作成には Superscript II あるいは Primscript を用い、PCR には fidelity の高い KOD-plus DNA polymerase を用いた。増幅した HCV ゲノムを pBR322MS ベクターにクローニングして、それぞれ独立的な3クローンの塩基配列の決定を行い、得られた塩基配列を相互に比較した。

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

IFN- α 感受性を調べ、IFN- α 抵抗性細胞を得るためのコロニーアッセイは以下のように行った。

全長 HCV RNA 複製細胞を直径 10 cm のデッシュにそれぞれ 2×10^4 個播き、IFN- α (50, 100 或は 200 IU/ml) を4日ごとに添加して G418 存在下3週間培養した。IFN- α 耐性として得られたコロニーをプールして IFN- α 抵抗性細胞とした。

2年間培養した O 細胞 (O2 細胞) を IFN- α (50 IU/ml) で 3 週間処理することにより得られた耐性細胞 (O2r) から Total RNA を調製し、前項で述べたように RT-PCR 法により HCV ゲノムを増幅し、pBR322MS ベクターにクローニング後、それぞれ独立的に得られた10クローンについて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 応答性については、STAT1 のリン酸化の程度を調べるために、細胞 (5×10^5 個) を6ウェルプレートに播き、1晩培養した後に、IFN- α (50 IU/ml) で 30 分処理した。細胞を Lysis buffer にて回収した後、抗リン酸化 STAT1 抗体にてウェスタンブロット解析を行った。対照として、IFN- γ (50 IU/ml) で 30 分処理した細胞も用いた。

(3) 第2世代の全長 HCV RNA 複製細胞の作成とそれらを用いた IFN- α 感受性試験

第2世代の全長 HCV RNA 複製細胞を作成するために、O2 細胞と O2r 細胞を IFN- γ (1000 IU/ml) で処理して、それぞれの細胞から全長 HCV RNA を排除した治療細胞 (O2c と O2rc) を作成した。

O2c 細胞と O2rc 細胞 (それぞれ 8×10^6 個) に O2 細胞と O2r 細胞由来の Total RNA (RNeasy extraction kit により調製し

た 100 μ g) をエレクトロポレーション法により導入した。培養2日後に、G418 選択を開始し、約3週間後に得られた G418 耐性コロニーをプールした。得られた細胞について、前項の O2 細胞や O2r 細胞で示したような条件で、IFN- α 応答性 (STAT1 のリン酸化) を調べた。また、得られた細胞と O2 細胞および O2r 細胞 (それぞれ 2×10^4) を 10 cm プレートに播き、IFN- α (50 IU/ml) で約3週間処理する感受性試験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究結果

(1) 長期培養による HCV ゲノムの遺伝的変動解析

1年および2年間培養した5種類の全長 HCV RNA 複製細胞内で複製している HCV ゲノムの塩基配列を決定し、樹立時の配列と比較した。その結果、ヌクレオチドの変異は経時的かつ直線的に増加し、変異速度は $3.5\text{--}4.8 \times 10^{-3}$ 塩基置換/ヌクレオチド/年と算定された。アミノ酸の置換数も同様に経時的な増加が認められ、RNA 複製の効率を上げる適応変異も出現していた。ヌクレオチドの変異様式は U \rightarrow C と A \rightarrow G の頻度 (それぞれ30%程度) が高く、以前 HCV レプリコン細胞で観察された変異パターンに類似していた。

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

全長 HCV RNA 複製細胞を長期に継代することにより IFN に対する感受性が変化するかどうかをコロニーアッセイにより調べた。その結果、1年或は2年継代培養した細胞から IFN 耐性として得られるコロニーの数は樹立時の細胞から得られるコロニー数より多い傾向が認められた。このような現象は実験に使用した5種類の全長 HCV RNA 複製細胞に共通して認められた。

O2細胞とIFN抵抗性のO2r細胞由来のHCVゲノムをRT-PCR法により増幅した。ゲノムの前半部5'~NS2領域(5kb)と後半部NS3~5B領域(6kb)に分けて増幅し、それぞれの増幅産物をプラスミドベクターにクローニングしてランダムに選別した10クローンについてそれらの塩基配列を決定した。両細胞から得られた塩基配列や推定アミノ酸配列を比較しても、IFN- α 抵抗性に強く相関する箇所は認められなかった。しかしながら、塩基配列および推定アミノ酸配列をもとに作成した系統樹解析では、ゲノムの前半部、後半部ともにIFN- α 抵抗性細胞から得られたクローンの大部分が、1つの遺伝的クラスターを形成する位置に配置されることが分かった。

細胞のIFN- α 応答性について、pSTAT1のリン酸化状態をウェスタンブロット解析により調べた。その結果、検討した4種類の細胞(O2, O2c, O2r および O2rc)とも、IFN- α 処理によりSTAT1は同程度にリン酸化されることが分かり、細胞間で差は認められなかった。対照として行ったIFN- γ 処理によるSTAT1のリン酸化の程度も細胞間での差は認められなかった。

(3)第2世代の全長 HCV RNA 複製細胞の作成とそれらを用いた IFN- α 感受性試験

O2細胞とO2r細胞由来のTotal RNAをO2cとO2rc細胞に導入して、第2世代の全長HCV RNA複製細胞を作成した。得られたG418耐性コロニーをまとめてプールして4種類のポリクローナル細胞群を得た。それぞれ、O2.1(O2)、O2.1(O2r)、O2r.1(O2)およびO2r.1(O2r)細胞と命名した。O2.1(O2)細胞はO2c細胞にO2細胞由来のTotal RNAを導入して得られたものであることを示し、O2.1(O2r)細胞はO2c細胞にO2r細胞由来のTotal RNAを導入して得られたものであることを示す。

これら4種類の細胞のIFN- α 応答性をSTAT1のリン酸化を指標にしてウェスタンブロットで解析した。その結果、これら4種類の細胞におけるSTAT1のリン酸化の程度には差がないことが分かった。次に、これら4種類の細胞とO2およびO2r細胞を用いて、研究方法の項目で示したような条件下でIFN- α に対する感受性試験を行った。その結果、O2細胞やO2r細胞では多数のG418耐性のコロニーが得られ、その数はO2r細胞>O2細胞であった。第2世代のHCV RNA複製細胞については、O2.1(O2)細胞でG418耐性になるコロニー数が極端に少なかった。他の3種類の細胞では、かなりの数のG418耐性コロニーが出現し、それらの数はO2r.1(O2r)>O2.1(O2r)>O2r.1(O2)となり、細胞間で差が認められた。

D. 考察

(1)長期培養によるHCVゲノムの遺伝的変動解析

全長 HCV RNA 複製細胞を用いて得られた HCV ゲノムの変異速度 ($3.5\text{--}4.8 \times 10^{-3}$ 塩基置換/ヌクレオチド/年)は、以前、我々が HCV レプリコン複製細胞を用いて算出した値 (3.0×10^{-3} 塩基置換/ヌクレオチド/年)より若干高い値であった。これは、RNA 複製に必須ではないコア~NS2 までの領域を含んでいるためと考えられる。事実、この領域の変異速度は NS3-NS5B までの領域の変異速度より高くなっており、全体として HCV レプリコン複製細胞で得られた値より高い値が得られたものと考えられる。

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

本研究により全長 HCV RNA 複製細胞を2年間培養すると、HCV ゲノムの多様性が増大し、HCV クローン間ではお互いに 0.64~1.05%異なることを明らかにした。一方、長期に培養した全長 HCV RNA 複製細胞は樹立時の細胞と比較すると IFN- α 抵抗性になる頻度が高まることを示した。HCV の遺伝的多様性と IFN- α 抵抗性との関係を探るために、HCV ゲノムの遺伝子解析を行った。その結果、IFN- α 抵抗性の O2r 細胞由来の HCV クローン群が、遺伝的系統樹において1つのクラスターを形成する傾向が認められた。O2r 細胞における HCV ゲノムは元の O2 細胞内の HCV ゲノムでは遺伝的にかなりマイナーな分子種集団であり、かなり均一化していることが示唆される。さらに、STAT1 のリン酸化実験においては、O2 細胞と O2r 細胞では IFN- α 応答性に差がなかったことから、両細胞における IFN- α のシグナル伝達効率に違いはないものと考えられる。従って、

HCV ゲノムのどこかに IFN 感受性を規定する領域の存在が予想される。IFN- α により誘導される宿主遺伝子群 (ISGs) の発現レベルに差が出ないかどうかについて今後調べる必要がある。

(3) 第2世代の全長 HCV RNA 複製細胞の作成とそれらを用いた IFN 感受性試験

4種類の第2世代の HCV RNA 複製細胞を用いた IFN- α の感受性試験の結果、IFN- α に耐性を示したコロニー数は O2r.1(O2r) O2.1(O2r) O2r.1(O2) >>O2.1(O2) であった。O2r.1(O2r)と O2.1(O2r)を比較すると、IFN- α に対する感受性は細胞側因子が関与していることが示唆される。しかし、O2r.1(O2r)と O2r.1(O2)を比較すると、今度は HCV RNAの方が関与してことが示唆される。O2細胞と O2r 細胞から得られた HCV ゲノムの解析では、遺伝的にかなり類似した HCV ゲノム集団が O2r 細胞に存在したことを合わせて考えると、おそらく IFN- α に対する感受性は宿主側因子とウイルス側因子の両方がかつ様々な割合で決まってくるのではないかと考えられる。今後、第2世代の HCV RNA 複製細胞から得られた IFN- α 抵抗性細胞内で複製している HCV ゲノムや細胞の IFN- α への応答性を詳細に調べていくことにより結論が得られるのではないと思われる。IFN- α 応答性については、STAT1 のリン酸化ばかりでなく、IFN- α により誘導される遺伝子群の発現レベルに差があるかどうかを調べる必要もある。

E. 結論

(1) HCV ゲノムの長期複製による HCV ゲ

ノムの遺伝的変異速度は $3.5-4.8 \times 10^{-3}$ 塩基置換/ヌクレオチド/年と算出され、遺伝的多様性の増大が観察された。IFN- α 抵抗性細胞の出現頻度も増大した(2) IFN- α 抵抗性細胞由来の HCV ゲノムと樹立時由来の HCV ゲノムを遺伝的系統樹において比較すると後者は一群のクラスターを形成した(3) 第2世代の全長 HCV RNA 複製細胞を作成して IFN 感受性試験を行ったところ、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato N, Mori K, Abe K, Dansako H, Kuroki M, Ariumi Y, Wakita T, Ikeda M. Efficient replication systems for hepatitis C virus using a new human hepatoma cell line. *Virus Res.* 146:41-50 (2009).
- 2) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. HCV genotype 1b chimeric replicon with NS5B of JFH-1 exhibited resistance to cyclosporine A. *Arch Virol.* 154:1671-1677 (2009).
- 3) Matsumoto A, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Hirano K, Fujimoto M, Akiyama M, Miuma S, Ozawa E, Shibata H, Takeshita S, Yamasaki H, Ikeda M, Kato N, Eguchi K. Interferon- α -induced mTOR activation is an anti-hepatitis C virus signal via the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-independent pathway. *J Gastroenterol.* 44:856-863 (2009).
- 4) Yano M, Ikeda M, Abe K, Kawai Y, Kuroki M, Mori K, Dansako H, Ariumi Y, Ohkoshi S, Aoyagi Y, Kato N. Oxidative stress induces anti-hepatitis C virus status via the activation of extracellular signal-regulated kinase. *Hepatology* 50:678-688 (2009).
- 5) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . *FEBS Letters* 583: 1434-1438 (2009).
- 6) Dansako H, Ikeda M, Ariumi Y, Wakita T, Kato N. Double-stranded RNA-induced interferon-beta and inflammatory cytokine production modulated by hepatitis C virus serine proteases derived from patients with hepatic diseases. *Arch. Virol.* 154:801-810 (2009).
- 7) Bender H, Wiesinger MY, Nordhoff C, Schoenherr C, Haan C, Ludwig S, Weiskirchen R, Kato N, Heinrich PC, Haan S. Interleukin-27 displays interferon γ -like functions in human hepatoma cells and hepatocytes. *Hepatology* 50: 585-591 (2009).
- 8) Kawai Y, Ikeda M, Abe K, Yano M, Ariumi Y, Dansako H, Yamamoto K, Kato N. Development of an HCV relapse model using genome-length HCV RNA harboring cells possessing the IFN- α -resistance phenotype. *Hepatol. Res.* 39: 898-909 (2009).
- 9) Vollmer S, Kappler V, Kaczor J, Flügel D, Rolwing C, Kato N, Kietzmann T,

- Behrmann I, Haan C.
Hypoxia-inducible factor 1 α is upregulated by Oncostatin M and participates in Oncostatin M signaling. *Hepatology* 50:253–260 (2009).
- 10) Nishimura G, Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Replicons from genotype 1b HCV-positive sera exhibit diverse sensitivities to anti-HCV reagents. *Antiviral Res.* 82:42–50 (2009).
- 11) 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).
- 12) Kuroki M, Ariumi Y, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. Arsenic Trioxide Inhibits HCV RNA replication through modulation of the glutathione redox System and oxidative stress. *J. Virol.* 83: 2338–2348 (2009).
- 13) Kato N, Abe K, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Ikeda M. Genetic variability and diversity of intracellular genome-length hepatitis C virus RNA in long-term cell culture. *Arch. Virol.* 154:77–85(2009).
- 14) Ariumi Y, Kuroki M, Dansako H, Abe K, Ikeda M, Wakita T, Kato N. The DNA damage sensors Ataxia-Telangiectasia mutated kinase and checkpoint kinase 2 are required for hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 82:9639–9646 (2008). *J.*
- Virol.* 82, 9305 (2008) spotlight
- 15) Dansako H, Ikeda M, Abe K, Mori K, Takemoto K, Ariumi Y, Kato N. A new living cell-based assay system for monitoring genome-length hepatitis C virus RNA replication. *Virus Res.* 137:72–79 (2008).
- 16) Mori K, Abe KI, Dansako H, Ariumi Y, Ikeda M, Kato N. New efficient replication system with hepatitis C virus genome derived from a patient with acute hepatitis C. *Biochem Biophys Res Commun.* 371:104–109 (2008).
- 17) Ando M, Korenaga M, Hino K, Ikeda M, Kato N, Nishina S, Hidaka I, Sakaida I. Mitochondrial electron transport inhibition in full genomic hepatitis C virus replicon cells is restored by reducing viral replication. *Liver Int.* 28:1158–1166 (2008).
- 18) Hirano K, Ichikawa T, Nakao K, Matsumoto A, Miyaaki H, Shibata H, Eguchi S, Takatsuki M, Ikeda M, Yamasaki H, Kato N, Kanematsu T, Ishii N, Eguchi K. Differential effects of calcineurin inhibitors, tacrolimus and cyclosporin a, on interferon-induced antiviral protein in human hepatocyte cells. *Liver Transpl.* 14:292–298 (2008).
- 19) Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Tada S, Kumagai N, Kato N, Shimotohno K, Hibi T. Possible molecular mechanism of the relationship between NS5B polymorphisms and early clearance of hepatitis C virus during interferon plus

- ribavirin treatment. *J Med Virol.* 80:632-639 (2008)
- 20) Abe K, Ikeda M, Dansako H, Naka K, Kato N. Cell culture-adaptive NS3 mutations required for the robust replication of genome-length hepatitis C virus RNA. *Virus Res.* 125: 88-97 (2007).
- 21) Abe K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Serum-free cell culture system supplemented with lipid-rich albumin for hepatitis C virus (strain O of genotype 1b) replication. *Virus Res.* 125:162-168 (2007).
- 22) Ariumi Y, Kuroki M, Abe K, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. *J. Virol.* 81:13922-13926 (2007).
- 23) Yano M, Ikeda M, Abe K, H. Dansako H., Ohkoshi S, Aoyagi, Y, Kato N. Comprehensive Analysis of the Effects of Ordinary Nutrients on Hepatitis C Virus RNA Replication in Cell Culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2016-2027(2007).
- 24) Dansako H, Ikeda M, Kato N. Limited suppression of the interferon-beta production by hepatitis C virus serine protease in cultured human hepatocytes. *FEBS J.* 274:4161-4176 (2007).
- 25) Ikeda M, Kato N. Modulation of host metabolism as a target of new antivirals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59:1277-1289 (2007).
- 26) Ikeda M, Kato N. Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-HCV reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. *J Pharmacol Sci.* 105:145-150 (2007).
2. 学会発表
- 1) 池田 房雄、團迫 浩方、西村 剛、河合 良成、有海 康雄、池田 正徳、高木 章乃夫、岩崎 良章、加藤 宣之、山本 和秀. HCV コア蛋白質のアミノ酸の違いと IFN 応答性との関係についての培養細胞を用いた解析. 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2009)/ 第 13 回日本肝臓学会大会、京都、2009 年 10 月.
- 2) 中村 光康、斎藤 英胤、池田 正徳、穂刈 量太、加藤 宣之、日比 紀文. 各種抗酸化剤の C 型肝炎ウイルス複製についての影響. 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2009)/ 第 13 回日本肝臓学会大会、京都、2009 年 10 月.
- 3) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Li23 cell-derived HCV-RNA replicating systems enabling analysis for anti-HCV mechanism of ribavirin. 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice, France, October 2009.
- 4) Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon- α . 16th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Nice,