

- ・研究代表者：(1) HBV-DNA モニタリングに関する臨床研究実施計画書作成、(2) 症例登録、(3) 研究事務局（参加施設およびデータセンターとの連絡、試験進捗状況の把握）、(4) HBV 再活性化に関連する因子の検討（臨床経過のデータ集積・解析・発表）
- ・研究分担者（上田龍三）：多施設共同臨床研究の計画・立案、実行にいたる全過程のマネージメント
- ・研究分担者（溝上雅史、田中靖人）：(1) HBV-DNA モニタリングに関する臨床研究実施計画書作成、(2) HBV 再活性化に関連する因子の検討（保存検体を用いた genotype, gene mutation の測定）
- ・研究分担者（小椋美知則・木下朝博・鈴木孝世・渡辺隆）：(1) HBV-DNA モニタリングに関する臨床研究実施計画書作成、(2) 症例登録
- ・研究分担者（鈴木律朗）：(1) HBV-DNA モニタリングに関する臨床研究実施計画書作成、(2) データセンターの統括（症例登録、HBV-DNA モニタリングの精度管理、HBV-DNA 測定結果の管理など）

IV. 22年度の課題

- (1) HBV-DNA モニタリングに関する多施設共同臨床研究の遂行（着実な症例登録、再活性化例に対する対応など）、目標症例数 321 例であり、症例集積ペースをさらに向上させ、22年度中に達成する。
- (2) 保存検体（血清および残余検体）を用いた後方視的研究：超高感度 real-time PCR 法による HBV-DNA 定量検査、再活性化に関連する悪性リンパ腫側因子及びウイルス側因子の同定および再活性化した症例における HBV の遺伝子配列および遺伝子変異の同定

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) HBV-DNA モニタリングによる HBV 再活性化対策が確立できれば、肝炎・肝障害による入院、劇症肝炎による死亡、リンパ腫治療中止による再発・再燃を最小化することに加えて、ウイルス耐性化や医療経済への負担を軽減できる。
- (2) HBV 再活性化の問題は、リツキシマブ＋ステロイド併用化学療法だけでなく、長期の免疫抑制を要する自己免疫疾患例や臓器移植の領域においても問題となっており、本研究における対策は“モデルケース”となることが期待できる。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- (1) Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Ueda R. Reactivation of hepatitis B virus following systemic chemotherapy for malignant lymphoma. *Int J Hematol.* 2009 (90) 13-23.
- (2) 楠本茂, 田中靖人 悪性リンパ腫：HBs 抗原陰性、HBs 抗体陽性の B 細胞性リンパ腫患者の治療で注意する点は？ *EBM 血液疾患の治療 2010-2011* 中外医学社 2009年10月
- (3) 楠本茂, 田中靖人 肝炎ウイルスキャリアへの対策 悪性リンパ腫治療マニュアル改訂第3版 南江堂 in press.
- (4) 楠本茂, 田中靖人, 溝上雅史 リツキシマブ＋ステロイド併用悪性リンパ腫治療中の B 型肝炎ウイルス再活性化への対策に関する多施設共同臨床研究～HBV-DNA モニタリング～ (C-SHOT 0802) *JDDW 2009 シンポジウム B 型肝炎ウイルス再活性化の問題点とその対策：肝 S3-8*
- (5) 楠本茂, 上田龍三 リツキシマブ治療と B 型肝炎再活性化：その後の展開 *日本リンパ網内系学会 2009 モーニングセミナー5*

Ⅶ. Ⅲ (2年間の研究成果)の概要図等

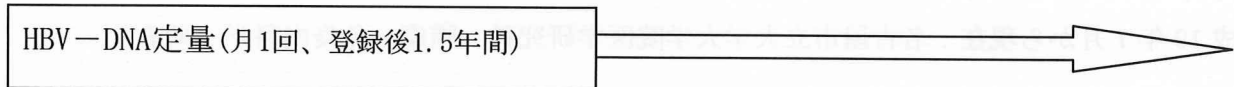
1) 平成20年6月9日、名古屋市立大学病院医薬品等臨床試験審査委員会にて『リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中のB型肝炎ウイルス再活性化への対策に関する多施設共同臨床研究～HBV-DNA モニタリング～』につき、承認を得た。

2) 平成20年8月11日より症例登録開始し、平成21年11月11日時点(1年3か月経過)で、120例の症例登録を得ている。(目標症例数は321例、IRB承認施設は51施設)

HBV-DNA モニタリング (多施設共同前方視的臨床研究)

リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中

治療後

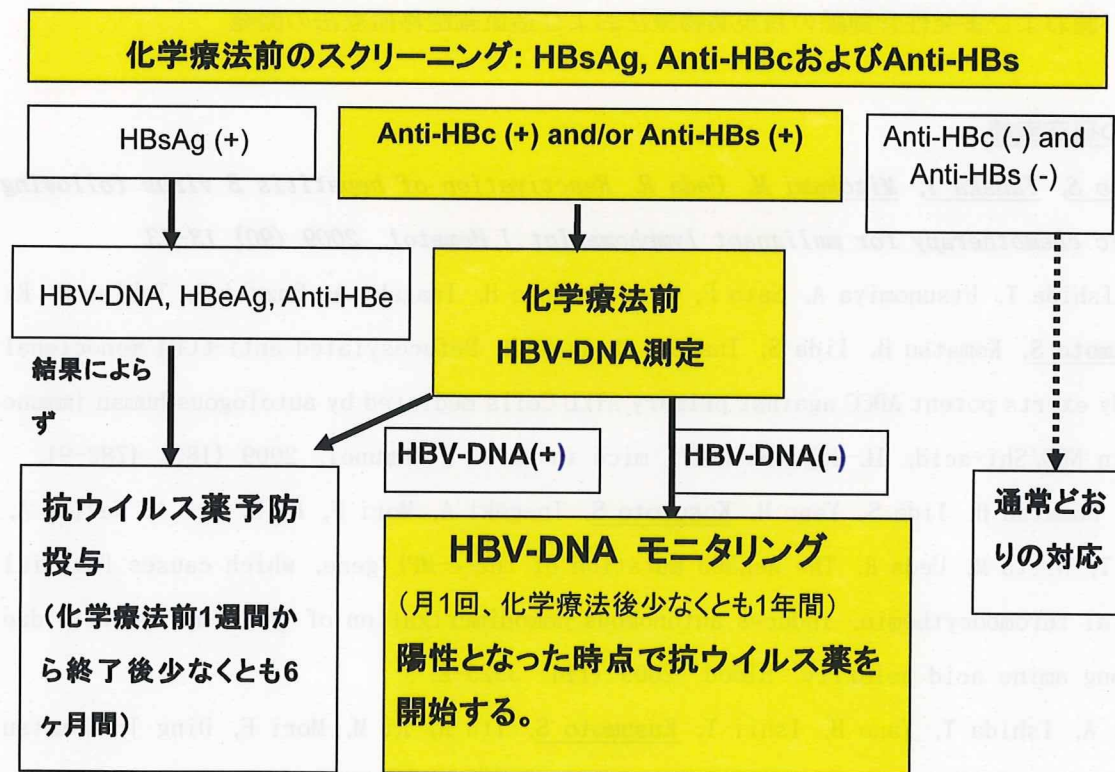


3) HBV 再活性化例の臨床経過および関連する因子の検討 (genotype, gene mutation)

平成21年11月11日時点で、症例登録120例中7例(5.8%)でHBV再活性化を認め、全例で肝炎・肝障害を認めない時点で抗ウイルス薬の投与を開始している。

また、HBV再活性化4例の保存検体を用い、治療前HBc抗体、HBs抗体および再活性化時のHBV-DNA、genotypeおよびgene mutationを評価し、平成21年度班会議(平成21年6月13日)およびJDDW2009シンポジウム(平成21年10月14日)にて発表した。

本研究では下記フローチャートの黄色部分(HBV-DNAモニタリングの有効性・安全性)につき、プロスペクティブに検証している。



○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

平成9年4月から平成11年3月まで：名古屋市立大学病院臨床研修医

平成11年4月から平成14年5月まで：静岡済生会総合病院血液内科医

平成14年6月から平成17年3月まで：国立がんセンター中央病院内科レジデント

平成17年4月から平成18年3月まで：名古屋市立大学病院 血液・膠原病内科 臨床研究医

平成18年4月から平成19年6月まで：名古屋市立大学病院 血液・膠原病内科 チーフレジデント

平成19年7月から現在：名古屋市立大学大学院医学研究科 腫瘍・免疫内科学 助教

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

○上田龍三 (名古屋市立大学大学院医学研究科 腫瘍・免疫内科学 教授)

○溝上雅史 (国立国際医療センター国府台病院 肝炎・免疫研究センター長)

○田中靖人 (名古屋市立大学大学院医学研究科 病態医科学 (ウイルス学) 教授)

○飛内賢正 (国立がんセンター中央病院 内科第一領域外来部長)

・主な研究課題

○全身化学療法および免疫抑制療法中のB型肝炎ウイルス再活性化への対策の確立

○悪性リンパ腫および多発性骨髄腫の新規薬物療法および造血細胞移植療法の開発

・これまでの研究実績

1. Kusumoto S, Tanaka Y, Mizokami M, Ueda R. Reactivation of hepatitis B virus following systemic chemotherapy for malignant lymphoma. *Int J Hematol*. 2009 (90) 13-23.
2. Ito A, Ishida T, Utsunomiya A, Sato F, Mori F, Yano H, Inagaki A, Suzuki S, Takino H, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exerts potent ADCC against primary ATLL Cells mediated by autologous human immune cells in NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma(null) mice in vivo. *J Immunol*. 2009 (183) 4782-91.
3. Ding J, Komatsu H, Iida S, Yano H, Kusumoto S, Inagaki A, Mori F, Ri M, Ito A, Wakita A, Ishida T, Nitta M, Ueda R. The Asn505 mutation of the c-MPL gene, which causes familial essential thrombocythemia, induces autonomous homodimerization of the c-Mpl protein due to strong amino acid polarity. *Blood*. 2009 (114) 3325-8.
4. Inagaki A, Ishida T, Yano H, Ishii T, Kusumoto S, Ito A, Ri M, Mori F, Ding J, Komatsu H, Iida S, Ueda R. Expression of the ULBP ligands for NKG2D by B-NHL cells plays an important role in determining their susceptibility to rituximab-induced ADCC. *Int J Cancer*. 2009 (125)

212-21.

5. Ito A, Ishida T, Yano H, Inagaki A, Suzuki S, Sato F, Takino H, Mori F, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Iida S, Inagaki H, Ueda R. Defucosylated anti-CCR4 monoclonal antibody exercises potent ADCC-mediated antitumor effect in the novel tumor-bearing humanized NOD/Shi-scid, IL-2Rgamma(null) mouse model. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 (58) 1195-206.
6. Kusumoto S, Mori S, Nosaka K, Morita-Hoshi Y, Onishi Y, Kim SW, Watanabe T, Heike Y, Tanosaki R, Takaue Y, Tobinai K. T-cell large granular lymphocyte leukemia of donor origin after cord blood transplantation. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2007;(7):475-9.
7. Kusumoto S, Kobayashi Y, Sekiguchi N, Tanimoto K, Onishi Y, Yokota Y, Watanabe T, Maeshima AM, Ishida T, Inagaki H, Matsuno Y, Ueda R, Tobinai K.
Diffuse large B-cell lymphoma with extra Bcl-2 gene signals detected by FISH analysis is associated with a "non-germinal center phenotype". *Am J Surg Pathol.* 2005; (29):1067-73.
8. Kusumoto S, Kobayashi Y, Tanimoto TE, Hasegawa T, Yokota Y, Tanimoto K, Sekiguchi N, Narabayashi M, Watanabe T, Matsuno Y, Tobinai K.
T(11;18)-bearing pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma responding to cladribine. *Int J Hematol.* 2004 ;(80):70-4.

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
平成21年度研究報告書資料

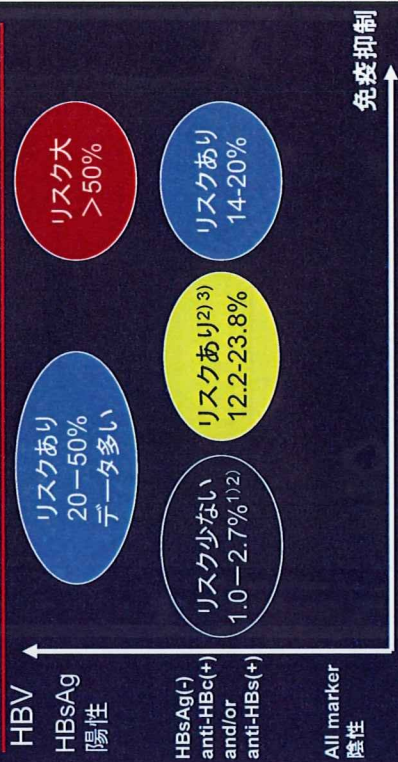
リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中のB型肝炎ウイルス再活性化への対策に関する研究
(H20-肝炎-若手-014)

研究代表者 楠本茂

名古屋市立大学大学院医学研究科 腫瘍・免疫内科学

HBV再活性化の頻度とリスク

Kusumoto et al. Int J Hematol 2009 (90) 13



1) Lok et al. Gastroenterology 1991 (100) 182

2) Hui et al. Gastroenterology 2006 (131) 59

3) Yeo et al. J Clin Oncol 2009 (27) 605

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
平成21年度研究報告書資料

リツキシマブ+ステロイド併用悪性リンパ腫治療中のB型肝炎ウイルス再活性化への対策に関する研究
(H20-肝炎-若手-014)

研究代表者 楠本茂

名古屋市立大学大学院医学研究科 腫瘍・免疫内科学

HBs抗原、anti-HBc、anti-HBs抗体陽性率の比較 (香港 vs 日本)

Hong Kong 従来のハイリスク群 Japan (Nagoya)

HBs抗原 (+) 12%¹⁾ (78/626) 1.5%⁴⁾ (56/3874)

Anti-HBc (+) 76%²⁾ (94/124) 62%³⁾ (152/244) 20% (764/3874)

Anti-HBs (+) 65%²⁾ (81/124) 58%³⁾ (今注目すべきハイリスク群) 22%

Anti-HBc (+) and/or Anti-HBs (+) 79%²⁾ (98/124) 71%³⁾ (173/244) 23.2% (899/3874)

1) Yeo et al. J Med Virol 2000 (62) 289

2) Hui et al. J Hepatol 2005 (42) 813

3) Hui et al. Gastroenterology 2006 (131) 59

4) Kusumoto et al. Int J Hematol 2009 (90) 13

リツキシマブ投与例におけるB型肝炎発症111例

2001年9月から2008年5月31日まで

HBsAg	再燃例	回復・軽快	未回復	死亡	後遺症	不明
(+)	47(10)	27(1)	6	13(9)	0	1
(-)	50(20)	22(1)	1	25(19)	1	1
未測定	1	1	0	0	0	0
N.I.	13(4)	7	1(1)	4(2)	0	1(1)

()は再燃例の内、劇症肝炎となった症例

HBsAg 劇症化割合 死亡割合

陽性47例 10/47 21.3% 13/47 27.7%

陰性50例 20/50 40.0% 25/50 50.0%

2008.5.31現在

HBV再活性化への対策

HBV再活性化による肝炎に対して、抗ウイルス薬を投与した場合には治療が間に合わない可能性がある。

• Yeoらは、32例のHBV再活性化肝炎に対してラミブジン投与を行ったところ、5例(16%)は死亡、22例(69%)は全身化学療法を中止もしくは中断せざるを得なかったことを報告。
(J Clin Oncol 2004 (22) 927)

• 本邦においても、Umamuraらは通常の急性B型肝炎と比較して、HBV再活性化による肝炎では劇症化率(27%vs 7%)および劇症肝炎死亡率(100%vs 44%)が高いことを報告。
(Intern Med 2006 (45) 747)

HBV再活性化への対策

- ① 抗ウイルス薬の予防投与
- ② ステロイド併用しない。慎重に治療経過観察し、肝障害が出現した時点でHBV-DNAを測定する。
- ③ HBV-DNAモニタリング
⇒ 陽性化した時点で治療介入(HBV-DNA陽性例には、慢性B型肝炎として抗ウイルス薬投与の保険適応あり)

HBV再活性化

抗ウイルス薬予防投与 (prophylaxis)

HBV
HBsAg
陽性

リスクあり
20-50%
データ多い

リスク大
>50%

HBsAg(-)
anti-HBc(+)
and/or
anti-HBs(+)

リスク少ない
1.0-2.7%(1)(2)

リスクあり(2)(3)
12.2-23.8%

リスクあり
14-20%

HBV-DNA monitoring 陽性になったら
抗ウイルス薬開始 (preemptive)

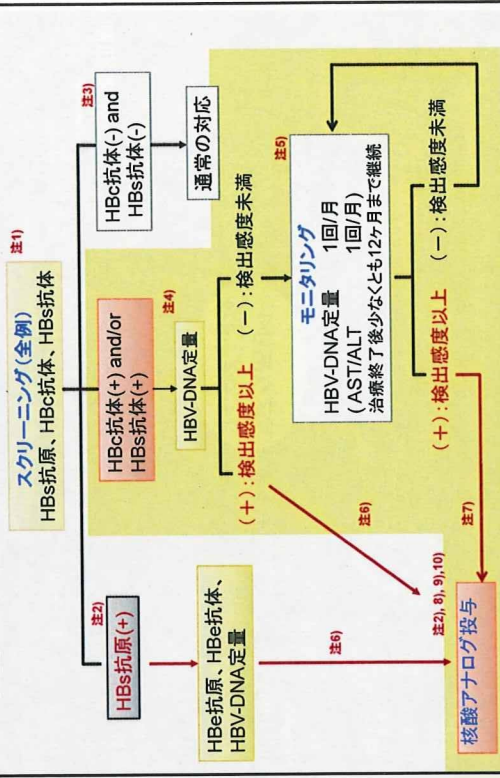
免疫抑制

全身化学療法
リツキシマブ+
ステロイド併用

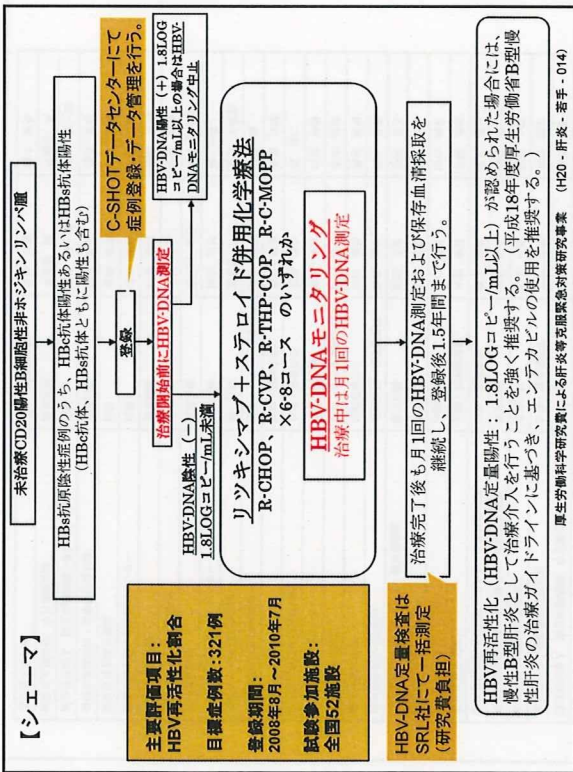
造血細胞移植
臓器移植

1) Lok et al. Gastroenterology 1991 (100) 182
2) Hui et al. Gastroenterology 2005 (131) 59
3) Yeo et al. J Clin Oncol 2009 (27) 605

免疫抑制・化学療法により発症するB型肝炎対策のガイドライン*



* 塚内博二、熊田博光、清澤研彦ら 肝臓. 2009; 50: 38-42
難治性の肝・胆道疾患に関する臨床研究班
肝硬変を伴ったウイルス性肝炎患者の治療の標準化に関する研究班



主要評価項目:
HBV再活性化割合
目録症例数: 321例
登録期間:
2008年8月～2010年7月
試験参加施設:
全国52施設

付随研究の概要

HBV-DNAモニタリング中の保存血清(一部血漿)を用いて、下記の検査を行う。

- ・治療経過中のHBV-DNA定量
(超高度real-time detection PCR)
- ・治療経過中のHBV関連マーカー
(HBs抗原定量、HBコア関連抗原定量、HBc抗体、HBs抗体)

以下、再活性化症例のみ対象

- ・B型肝炎ウイルスの遺伝子配列解析
- ・劇症肝炎に寄与するB型肝炎ウイルスの遺伝子変異

厚生労働科学研究費による肝炎等克服緊急対策研究事業 (H20・肝炎・若手・014)

HBV-DNAモニタリング試験進捗状況

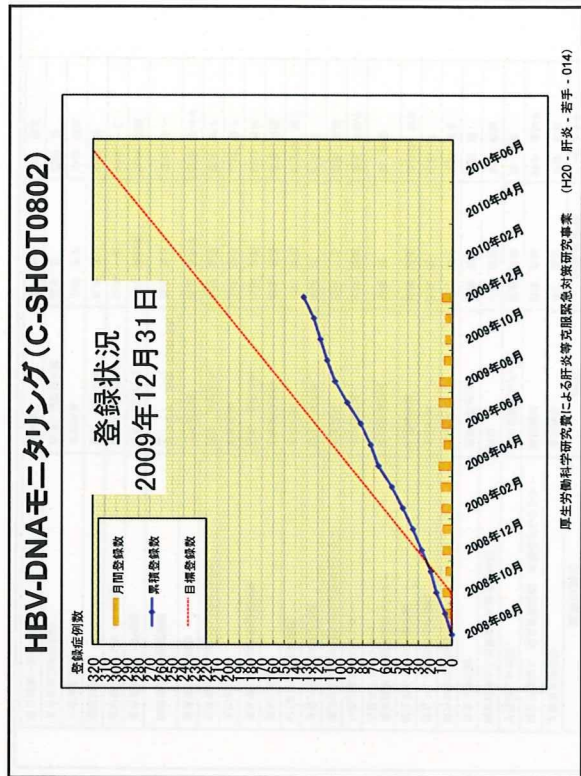
2010年1月8日時点: 試験開始17か月経過

IRB承認: 52施設中52施設

症例登録: 136例

登録136例中9例(6.6%)においてHBV再活性化を認め、全例肝障害・肝炎を認めない時点で抗ウイルス薬投与開始。

厚生労働科学研究費による肝炎等克服緊急対策研究事業 (H20・肝炎・若手・014)



謝辞

プロジェクト検討小委員会

- 名古屋市立大学大学院医学研究科 腫瘍・免疫内科学
- 国立国際医療センター国府台病院 肝臓・免疫研究センター
- 名古屋第二赤十字病院 血液・腫瘍内科
- 名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学
- 名古屋大学医学部 造血細胞移植情報管理学
- 滋賀県成人病センター 血液内科
- 国立がんセンター中央病院 血液内科
- 信州大学大学院医学研究科 消化器内科
- 名古屋市立大学大学院医学研究科 病態医科学

効果安全性評価委員

- 脇田隆字 ウイルス第二部
- 高本滋 愛知医科大学 医学部 輸血部
- 松尾惠太郎 愛知県がんセンター研究所疫学予防部

データセンター

C-SHOTデータセンター(NPO法人 血液疾患臨床研究サポートセンター)

代表者: 恵美宣彦

担当者: 倉田美穂、熱田由子、鈴木律明

医療機関名	科名	研究責任者	コーディネーター
北海道大学病院	血液内科	今村 雅章	黒松 勇樹
独立行政法人 国立がん研究センター 北海道がんセンター	血液内科	島崎 光孝	鈴木 志輝子
千代田記念病院	消化器病センター	安藤 朝宏	奥 真直
神宮産科婦人科	内科	中田 眞直	中田 眞直
東北大学病院	血液・免疫科	栗原 秀徳	大橋 康
仙台大学医学部附属病院	血液内科	栗田 寛一	奥田 西風
国立がんセンター中央病院	血液内科	野田 豊	丸山 大
国立がんセンター第一病院	化学療法科	伊藤 国明	久慈田 綾子
第五医科大学附属臨床センター	造血腫瘍科	柳澤 暹	香 美枝
神宮川国立がんセンター	化学療法科	本村 茂樹	鈴木 千穂子
京都府立総合医療センター	血液内科	藤井 リカ	高尾 英伸
京都府立総合医療センター	血液内科	安藤 暉	小島 登
京都府立総合医療センター	血液内科	白井 雅浩	伊豆野 聖二
京都市立病院	血液腫瘍科	藤倉 友通	藤倉 友通
京都市立病院	腫瘍・血液内科	山崎 俊子	山崎 俊子
京都府立総合医療センター	腫瘍・血液内科	土島 美智	山崎 俊子
京都府立総合医療センター	腫瘍・血液内科	藤井 聡子	山崎 俊子
京都府立総合医療センター	腫瘍・血液内科	藤元 とも子	藤元 とも子
京都府立総合医療センター	化学療法科	藤田 尚之	藤田 尚之
京都府立総合医療センター	血液・腫瘍内科	小塚 純知郎	内田 義樹
京都府立総合医療センター	血液・腫瘍内科	山本 一七	山本 一七
京都府立総合医療センター	血液・腫瘍内科	杉浦 勇	杉浦 勇
京都府立総合医療センター	血液内科	小杉 浩史	小杉 浩史
京都府立総合医療センター	血液内科	鈴木 茂	鈴木 茂
京都府立総合医療センター	血液内科	菅村 隆一	菅村 隆一

独立行政法人 国立がん研究センター	血液内科	赤井 聖和	水原 麗香
京都府立総合医療センター	血液・腫瘍内科	木下 朋輝	黒田 昭之
京都府立総合医療センター	血液内科	大西 一功	黒野 一幸
京都府立総合医療センター	血液内科	伊藤 凌也	菅原 将一郎
京都府立総合医療センター	血液・腫瘍内科	嶋下 剛久	鈴木 浩一
京都府立総合医療センター	血液・化学療法科	片岡 香江	片岡 香江
京都府立総合医療センター	血液内科	山口 孝子	山口 孝子
京都府立総合医療センター	血液内科	仁田 正和	花村 一朗
京都府立総合医療センター	血液内科	藤田 亮史	伊藤 公人
京都府立総合医療センター	血液内科	藤倉 友通	藤倉 友通
京都府立総合医療センター	血液内科	田中 真司	藤村 武典
京都府立総合医療センター	血液・リウマチ膠原病科	正木 真史	正木 真史
京都府立総合医療センター	血液・腫瘍内科	鈴木 香世	内藤 孝孝
京都府立総合医療センター	血液・腫瘍内科	宇藤 聖史	前 裕仁
京都府立総合医療センター	腫瘍センター・血液内科	島川 亮太	渡西 大輝
京都府立総合医療センター	第一内科	藤原 友洋	藤原 友洋
京都府立総合医療センター	血液内科	藤原 友洋	藤原 友洋
京都府立総合医療センター	血液内科	佐分利 雅生	佐分利 雅生
京都府立総合医療センター	血液内科	本村 晋也	藤島 悠樹
京都府立総合医療センター	血液内科	野坂 生輝	野坂 生輝
京都府立総合医療センター	内科	日高 凌弘	日高 凌弘
京都府立総合医療センター	血液内科	藤内 幹哉	藤内 幹哉
京都府立総合医療センター	血液内科	藤内 幹哉	藤内 幹哉
京都府立総合医療センター	内科	田田 真一郎	田田 真一郎
京都府立総合医療センター	血液内科	宇野 晋 真	宇野 晋 真
京都府立総合医療センター	血液・腫瘍内科	倉住 公治	鈴木 健介

3 年目研究課題

平成 21 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発要因及びウイルス増殖に対する人為的制御による肝炎征圧

課題番号：H19-肝炎-一般-001

研究代表者：下遠野 邦忠

I. 研究の意義

- (1) HCV 感染によるヒト慢性疾患の病態形成の分子機序が不明である。
- (2) HCV 複製増殖を確実に抑制できる人的制御法が開発されていない。
- (3) HCV 感染による細胞の変化を病態変化との関連で評価出来る系がない。
- (4) 慢性 C 型肝炎に対する現行の治療法・治療薬は十分でない。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) HCV 感染による細胞障害および異常増殖性など細胞に与える要因の解明。
- (2) HCV の複製を制御する宿主要因の解明を通じた、感染予防と疾患治療に向けた方法論の確立。
- (3) 生理条件下で HCV 増殖複製系を樹立、それを人為的に制御が可能な方法の開発。

III. 3 年間の研究成果

・ 研究代表者 (下遠野 邦忠)

- (1) HCV は脂肪滴を利用して増殖する事を明らかにした。
- (2) HCV は細胞内の脂肪滴を増やす事を明らかにした。
- (3) HCV の産生にリポタンパク質が重要な機能を果たすことを明らかにした。
- (4) Apolipoprotein E が感染性 HCV 粒子の細胞外放出に重要である事を明らかにした。

・ 研究分担者 (堀田 博)

- (1) HCV による細胞死の分子機序 (Bax 誘導性ミトコンドリアによる) の理解が進んだ。
- (2) HCV による細胞死とウイルス増殖の程度の逆相関及び関与する変異を同定した。
- (3) HCV による持続感染の分子機序の一部 (JNK の活性化) を明らかにした。

・ 研究分担者 (高久 洋)

- (1) HCV 複製に Hsp90 が関与しているが、その標的のひとつを明らかにした。

・ 分担研究者 (加藤 宣之)

- (1) HCV ゲノムの複製に必要な新規宿主因子として DDX3、ATM および Chk2 を見出した。
- (2) HCV ゲノム複製細胞ではメタロチオネインが発現誘導されることを見いだした。
- (3) HCV 粒子の細胞外への産生に ESCRT 小胞輸送系の宿主因子が関与していることを明らかにした。

・ 研究分担者 (西口修平)

- (1) C 型肝炎慢性肝炎の肝組織では IFN により HCV が消失してもミトコンドリア DNA の変異数が減少することを明らかにした。
- (2) IFN 治療後に HCV が消失しその後癌が発症した症例において、ミトコンドリアの増生と粗面小胞体の膨化が認められ、発癌との関連が示唆された。

・ 研究分担者 (小原 恭子)

- (1) HCV により発現誘導される増殖制御遺伝子、DHCR24 のプロモータ内に HCV 応答配列を見いだした。
- (2) DHCR24 の発現が p53 を抑制してアポトーシス耐性を肝細胞に賦与する事を明らかにした。

・ 研究分担者 (落谷 孝広)

- (1) ヒト間葉系幹細胞から分化誘導させた肝細胞は HCV に感染することをみだし、感染実験に供することができる。
- (2) 分化誘導した肝細胞に microRNA122 が発現していることを見いだした。

・ 研究分担者 (杉山和夫)

- (1) HCV 患者血清内に存在する欠失ゲノムを持つ複製能を有するウイルス粒子の存在を明らかにした。

・ 研究分担者 (丸澤宏之)

- (1) HCV のコアが転写因子 NF- κ B の活性化を介して、遺伝子編集酵素 AID を発現誘導することを同定。
- (2) AID を発現したヒト肝細胞にはさまざまな遺伝子変化や遺伝子異常が発生することを確認し、その領域に IFN 受容体遺伝子も含まれていることを明らかにした。

IV. 今後考えられる新たな課題

- (1) HCV が脂肪代謝・脂肪輸送機構をハイジャックして増殖する機構の解明とそれを標的にした治療戦略および抗 HCV 阻害剤の開発。
- (2) HCV 感染によるミトコンドリア機能障害の分子機構の解明とその予防法の確立を介した疾患発症予防。
- (3) これまでに解明した事実に基づく抗 HCV 剤の開発研究。

V. 行政施策への貢献の可能性

- (1) HCV 肝炎症におけるウイルス増殖と遺伝子異常の分子基盤が理解が進み、疾患の定量的な診断が可能になる。
- (2) HCV 複製と疾患との関連性が分子レベルで説明可能になり、発症予防の方策を構築出来る可能性がある。
- (3) 新規の抗 HCV 剤の開発に貢献できる可能性がある。
- (4) HCV 感染による慢性肝疾患の病態形成の原因を明らかにすることで、新しい治療法開発への道を開くと期待される。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)**下遠野 邦忠**

Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. **Proc Jpn Acad** 85(7): 217-228, 2009

Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. **Hepatology**. 50(3): 689-696, 2009

Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K. Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. **Cancer Sci**. 100: 1943-1950, 2009

Noguchi T, Otsubaki T, Ando I, Ogura N, Ikeda S, Shimotohno K. Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome. **Virology**. 375(2):424-432, 2008

Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nat Cell Biol**. 9:1089-1097, 2007

堀田 博

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: 9993-10006, 2009

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(21):10375-10385, 2008.

Amako Y, Sarkeshik A, Hotta H, Yates J 3rd, Siddiqui A. Role of oxysterol binding protein in hepatitis C virus infection. **J Virol**. 83: 9237-46, 2009

高久 洋

Ujino S, Yamaguchi S, Shimotohno K, Takaku H. Heat-shock protein 90 is essential for stabilization of the hepatitis C virus non-structural protein NS3. **J Biol Chem**. 284: 6841-6846, 2009

Suzuki H, Tamai N, Habu Y, Chang MO, Takaku H. Suppression of hepatitis C virus replication by baculovirus vector-mediated short-hairpin RNA expression. **FEBS Lett**. 58:3085-3089, 2008.

加藤 宣之

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

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

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

西口 修平

Kumada T, Tanaka E, Nishiguchi S, et al. Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum aminotransferase based on platelet counts. **Hepatology Res.** 38: 27-36, 2008

Tamori A, Shiomi S, Nishiguchi S, et al. Serial changes in expression of functionally clustered genes in progression of liver fibrosis in hepatitis C patients. **World J. Gastroenterol.** 7: 2010-2022, 2008

小原 恭子

Nishimura T, Kohara M, Izumi K, Kasama K, Hirata Y, Huang Y, Shuda M, Mukaidani C, Takano T, Tokunaga Y, Nuriya H, Satoh M, Saito M, Kai C and Tsukiyama-Kohara K. Hepatitis C virus impairs p53 via persistent over-expression of 3 β -hydroxysterol D24-reductase. **J.Biol.Chem**, 2009 in press

Nishimura T, Saito M, Takano T, Nomoto A, Kohara M, and Tsukiyama-Kohara K. Comparative Aspects on the Role of Polypyrimidine Tract Binding Protein in Internal Initiation of Hepatitis C Virus and Picornavirus RNAs. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 5:435-448, 2008

落谷 孝広

Ochiya T., Yamamoto Y., Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. **Differentiation**, 2009 in press

Song X, Guo Y, Duo S, Che J, Wu C, Ochiya T, Ding M, Deng H. A Mouse Model of Inducible Liver Injury Caused by Tet-on Regulated Urokinase for Studies of Hepatocyte Transplantation. **Am J Pathol.**, 2009 in press

Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. In Vivo Therapeutic Potential of Human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells After Transplantation into Mice with Liver Injury. **Stem Cells**, 26: 2705-2712, 2008

杉山 和夫

Sugiyama K, Suzuki K, Nakazawa T, Funami K, Hishiki T, Ogawa K, Saito S, Shimotohno KW, Suzuki T, Shimizu Y, Tobita R, Hijikata M, Takaku H, Shimotohno K. Genetic analysis of hepatitis C virus with defective genome and its infectivity in vitro. **J Virol.** 83: 6922-6928, 2009

Duan H, Yoshimura K, Kobayashi N, Takagi A, Matsui M, Ohno S, Sugiyama K, Morisseau C, Hammock BD, and Akatsuka T, Analysis of the topology of the microsomal epoxide hydrolase on the cell surface with monoclonal antibodies with different epitope specificities. **FASEB J.** 22 : 479-431, 2008.

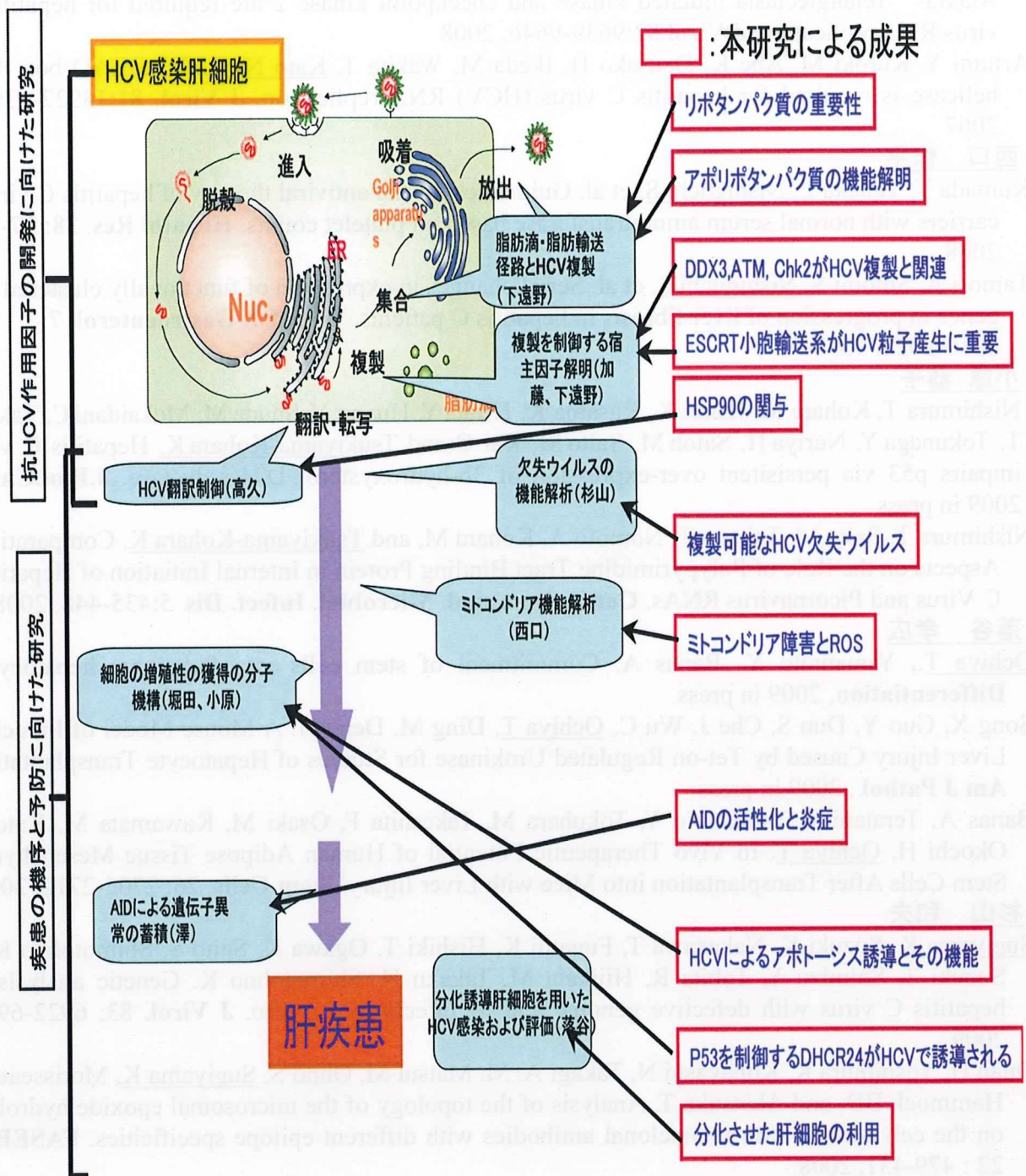
丸澤 宏之

Takai A, Toyoshima T, Uemura M, Kitawaki Y, Marusawa H, Hiai H, Yamada S, Okazaki IM, Honjo T, Chiba T, Kinoshita K. A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. **Oncogene.** 28: 469-478, 2009

Marusawa H. Aberrant AID expression and human cancer development. **Int J Biochem Cell Biol.** 40: 1399-1404: 2008.

Wada M, Marusawa H, Yamada R, Nasu A, Osaki Y, Kudo M, Nabehima M, Fukuda Y, Chiba T Matsuda F. Association of genetic polymorphisms with interferon-induced haematologic adverse effects in chronic hepatitis C patients. **J Viral Hepat.** 16: 388-396, 2009

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等



○研究代表者の研究歴等

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和47年～昭和58年 国立遺伝学研究所 分子遺伝部 (研究員)
 昭和53年～昭和56年 米国 ウィスコンシン大学 McArdle 癌研究所 (博士研究員)
 昭和58年～平成6年 国立がんセンター研究所 ウイルス部 (室長・部長)
 平成6年～平成19年 京都大学 ウイルス研究所 (教授・所長)
 平成19年～21年 慶應義塾大学 医学部 (特別研究教授)
 平成21年～現在 千葉工業大学 附属総合研究所 (教授)

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

三浦 謹一郎 (国立遺伝学研究所)
 Howard M. Temin (米国 McArdle 癌研究所)
 杉村 隆 (国立がんセンター研究所)

・主な研究課題

- (1) レトロウイルスの複製機構の解析
- (2) レトロウイルスベクターに関する研究
- (3) ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV) の分子ウイルス学的研究
- (4) HCVの複製機構およびウイルス発がんに関する研究

・これまでの研究実績

- Ogawa K, Hishiki T, Shimizu Y, Funami K, Sugiyama K, Miyanari Y, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes lipid droplet for production of infectious virus. *Proc Jpn Acad* 85(7): 217-228, 2009
- Aly HH, Qi Y, Atsuzawa K, Usuda N, Takada Y, Mizokami M, Shimotohno K, Hijikata M. Strain-dependent viral dynamics and virus-cell interactions in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood-borne hepatitis C virus. *Hepatology*. 50(3): 689-696, 2009
- Goto K, Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Shimotohno K. Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor. *Cancer Sci*. 100: 1943-1950, 2009
- Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T and Shimotohno K., Negative regulation of the RIG-I signaling by the novel ubiquitin ligase RNF125. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 7500-7505, 2007
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol*. 9(9):1089-1097, 2007
- Watashi K, Inoue D, Hijikata M, Goto K, Aly HH, Shimotohno K. Anti-hepatitis C virus activity of tamoxifen reveals the functional association of estrogen receptor with viral RNA polymerase NS5B. *J Biol Chem*. 282(45):32765-32772, 2007
- Watashi K, Ishii N, Hijikata M, Inoue D, Murata T, Miyanari Y, Shimotohno K. Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell*. 19 :111-122, 2005.
- Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K, Chiba T. The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology*. 127:1775-1786, 2004
- Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, Yamaji M, Shimotohno K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology*. 38 :1282-1288. 2003
- Hijikata, M, Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi, T., Kato, N., Kimura, K., and Shimotohno, K., Proteolytic processing and membrane association of putative nonstructural proteins of hepatitis C virus., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 10773-10777, 1993
- Tajima, K., Shimotohno, K. and Oki, S. Natural horizontal transmission of HCV in microepidemic town in Japan. *Lancet*, 337: 1410-1411, 1991
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T. and Shimotohno, K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 9524-9528, 1990
- Kitado, H., Chen, I.S.Y., Shah, N.P., Cann, A.J., Shimotohno, K. and Fan, H. U3 sequences from HTLV-I and -II LTRs confer pX protein response to a murine leukemia virus LTR. *Science*, 235: 901-904, 1987
- Shimotohno, K., Takano, M., Teruuchi, T. and Miwa, M. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8112-8116, 1986
- Shimotohno, K., Miwa, M., Slamon, D.J., Chen, I.S.Y., Hoshino, H., Takano, M., Fujino, M. and Sugimura T. Identification of new gene products coded from X regions of human T-cell leukemia viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 302-306, 1985
- Wachsman, W., Shimotohno, K., Clark, S.C., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Expression of the 3' terminal region of human T-cell leukemia virus. *Science*, 266: 177-179, 1984
- Slamon, D.J., Shimotohno, K., Cline, M.J., Golde, D.W. and Chen, I.S.Y. Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia virus. HTLV-I and HTLV-II. *Science*, 266: 61-65, 1984
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Loss of intervening sequence in genomic mouse alpha-globin DNA inserted in an infectious retrovirus vector. *Nature*, 299: 265-268, 1982
- Shimotohno, K. and Temin, H.M. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell*, 26: 67-77, 1981
- Shimotohno, K., Mizutani, S. and Temin, H.M. Sequence of retrovirus provirus resembles that of bacterial transposable elements. *Nature*, 285: 550-554, 1980

・平成22年度 肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

「肝炎ウイルスによる肝疾患発症の宿主要因と発症予防に関する研究」へ応募

厚生労働科学研究費補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業研究班

「肝炎ウイルスにより惹起される炎症性誘発要因及びウイルス増殖に対する人為的制御による肝炎制圧」(平成19-21年度)

班員 個別研究課題

下遠野邦忠 (研究代表者)	HCVIによる細胞の異常増殖性の機構
高久 洋	HCV増殖に関与するヒートショックタンパク質の機能解析
堀田 博	HCV複製、細胞の増殖を制御する細胞側因子の解明と機能解析
加藤 宣之	HCV増殖制御に関与する宿主因子とその機能解析
西口 修平	HCV感染によるミトコンドリア遺伝子異常の解析
小原 恭子	HCVIによる細胞増殖性獲得機構の分子機構
落谷 孝広	間葉系幹細胞から肝細胞への分化と肝炎ウイルス感染系の確立
杉山 和夫	肝炎患者に存在するHCVゲノム多様性の意義
丸澤 宏之	HCV感染による宿主遺伝子への変異蓄積の分子機構解析

目的

HCV感染により引き起こされる細胞の異常化の分子基盤を明らかにし、それを人為的に治す方法を探る。一方、ウイルス複製を阻止する方策も探り最終的にはHCVによる疾患の予防と治療を目指す。

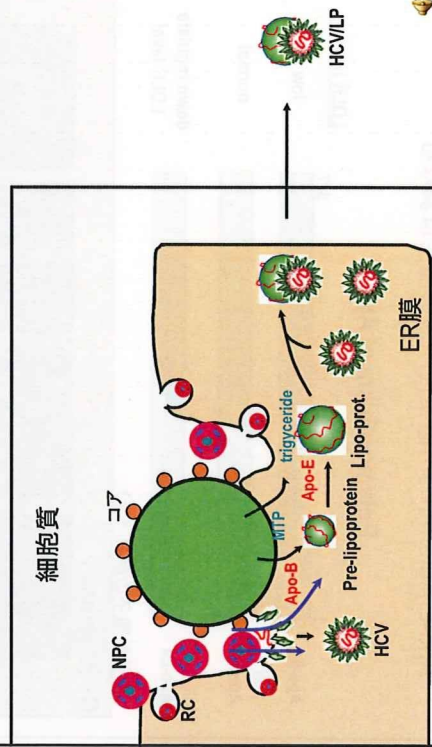
成果 (赤は昨年度評価時以降のもの)

HCV感染による細胞の変化

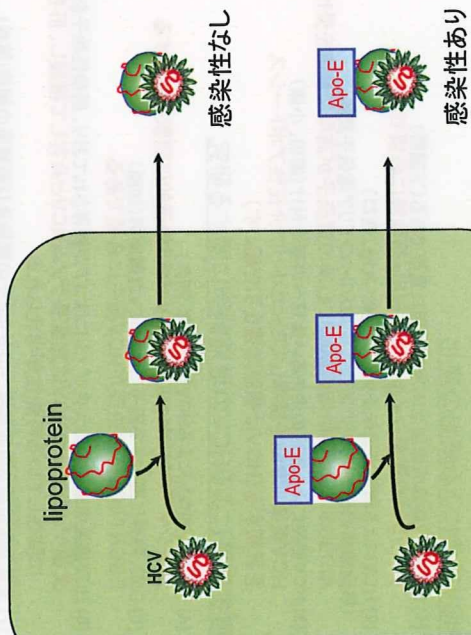
- (1) 細胞内脂肪滴の増加はHCVの複製に重要である(下遠野)
リポタンパク質がウイルス粒子放出・感染性に必須である。
 - (2) HCVIによる細胞の遺伝子変化の促進(丸澤、西口)
(核酸編集遺伝子(AID)の活性化およびミトコンドリア遺伝子変異)
AID誘導により細胞増殖制御に必須の遺伝子が高率に変異を受ける
 - (3) HCV感染による細胞の生あるいは死への運命付け(堀田、小原)
HCV感染はBaxを誘導してミトコンドリア介在性アポトーシスを惹起する(HCVIは細胞障害を引き起こす)
- 宿主因子によるHCVの増殖制御に関する研究
- (4) 分子シャペロンによるHCV複製制御(高久)
分子シャペロン(Hsp90)はHCV IRES依存性に翻訳を制御する
 - (5) DNA 障害に関与する因子によるHCV複製制御(加藤)
ESCR1小胞体輸送系がHCV産生に必要である
 - (6) HCV感染者血液内の欠失ゲノムにはコアが保存されており、感染性粒子を産生する(杉山)
欠損ゲノムを持つHCVIは完全長ゲノムHCVと共存して複製し、肝疾患の増悪に関係している可能性が考えられる
 - (7) 間葉系脂肪細胞の肝細胞への分化とその感染及び評価系の構築(落谷)
分化した肝細胞がHCV感染系として有効である

(1) HCVの増殖には脂防代謝系が関与している

HCVの細胞外への放出にはリポタンパク質が関係する可能性が強い
(他のグループも含めた昨年までの成果)



感染性HCV粒子の細胞外への放出にApo-Eが必須である



Apo-EはHCVの産生と感染に重要である

- (1) 感染性ウイルス粒子を細胞外に放出するのに必須である。
- (2) Apo-EはHCVと会合して存在しており、感染する際にApo-E受容体 (LDLR, SR-B1) を利用して感染する。
- (3) Apo-E isoform (Apo-E2-Apo-E4) の違いによりHCV感染性が異なる。
(日本人の約5%近くがApo-E2 isoformを持つと推定されている)

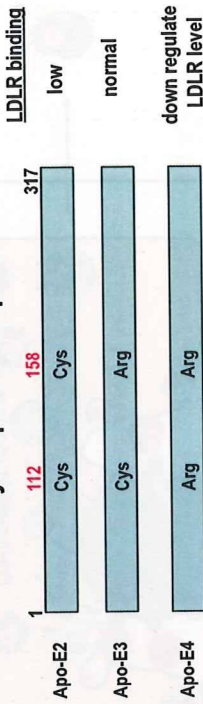
「HCVが脂肪滴を増加して増える」というこれまでの本研究からの成果も加味すると、

「HCVは脂肪代謝・脂肪輸送系をハイジャックして増殖する」

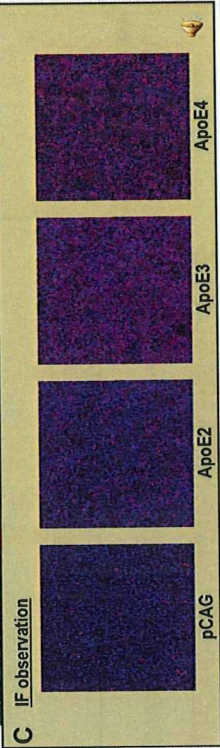
というHCV研究の新たなパラダイムを生むことができ、その様な観点からの抗HCV開発および疾患予防、治療の研究の必要性を示した。

Apo-E isoformにより感染性HCVの産生は異なる

Polymorphism of Apo-E



感染性粒子の産生 (赤)



(2) AID遺伝子発現誘導による変異導入の増加

HCV感染したヒト肝細胞に、通常は活性化Bリンパ球にしか発現しないDNA編集酵素 (AID) が発現誘導される。

Activation-induced cytidine deaminase (AID) がHCV感染による炎症細胞の遺伝子変異を誘導している。



体細胞変異

Gene	Mutated clones (n / total)	Mutation frequency (n / 10 ⁴ bp)
p53	6 / 52	1.4
c-myc	2 / 32	0.8
PTEN	0 / 56	0

染色体異常



(3) HCVは細胞障害性を示すと同時に、増殖性を促進する遺伝子も活性化する

(i) HCV感染による、

1. アポトーシスの誘導 (Bax依存的でmitochondriaを介する)
2. 核小体の肥大 (ERKを介する)

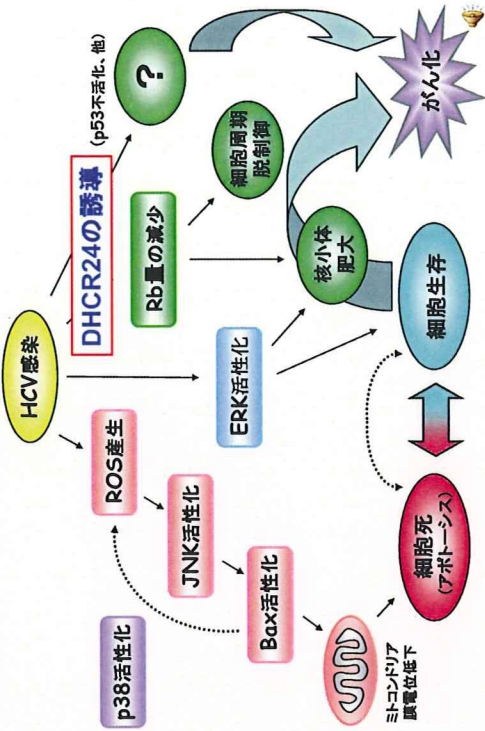
→ 細胞障害性に関与。

(ii) HCV感染細胞での、

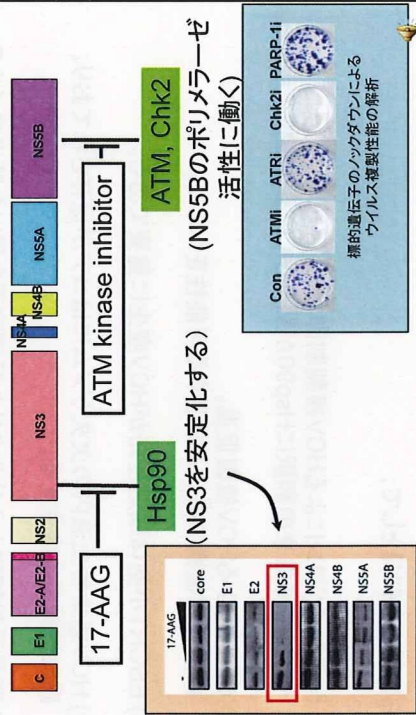
3. コレステロール合成酵素のひとつである、DHCR24の誘導 (p53の機能阻害を惹起) (CDK-RB経路を活性化)

→ 細胞の増殖促進に関与。

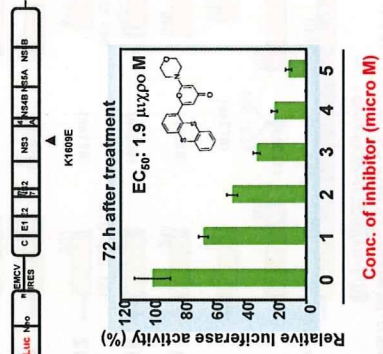
HCV感染による細胞死と、細胞生存、細胞周期脱制御、がん化



Hsp90はNS3に結合して、ATM、Chk2はNS5Bに結合してウイルスゲノムの複製を制御する



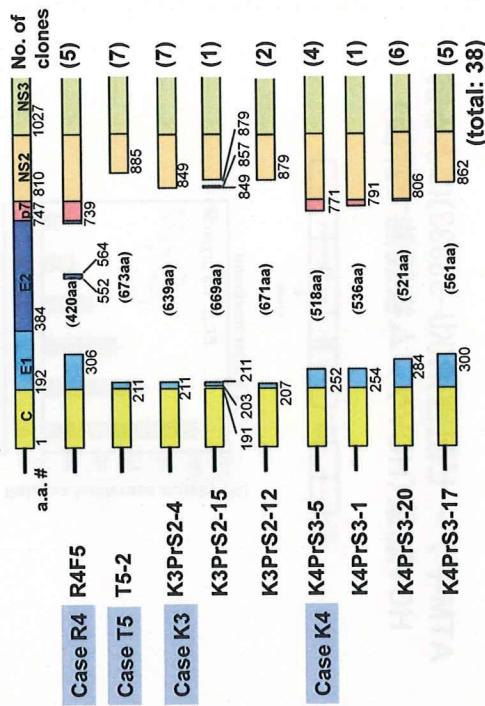
ATMキナーゼ阻害剤(KU-55933)による抗HCV効果(HCVゲノム複製能で評価)



さらに新たな知見として;

- (i) シンパロニンによるHCV複製制御
HCV IRES由来の翻訳にHsp90が関与している可能性を示した。
- (ii) DDX3によるHCV複製促進。
自然免疫機構の抑制と関連する可能性を示した。
- (iii) ESCRT小胞体輸送経路がHCV産生に重要である。
- (iv) HCV感染者血液内の欠失ゲノムにはコアが保存されており、
感染性粒子を産生する。
- (v) 間葉系幹細胞から分化させた肝細胞系を用いた肝炎ウイルス
感染系への応用が可能になった。

欠損ゲノムでは構造領域が広範囲に欠損しているが、ヘルパーウイルス存在下で
粒子の産生が見られる。



今後の研究の展望

- HCV感染による惹起される細胞側変化を標的とした治療、
疾患発症予防および、抗ウイルス剤の開発
- (1) HCV感染による脂防代謝・脂防輸送系のハイジャック機構の解明と
そのエビデンスに基づく治療、予防法の確立
- (2) Apo-EとHCVの相互作用の分子機構解明と会合阻害による抗HCV剤開発
の可能性の検討
- (3) HCVによるAID遺伝子誘導機構の解明と人為的阻害方法の開発
- (4) ミトコンドリア遺伝子変異と機能との関係
- (5) 欠失HCVゲノムと肝疾患との関連性
- (6) HCV感染による細胞の死と増殖を制御する要因の解明
- (7) HCV複製制御に関わる宿主因子の探索と機能解析
- (8) 間葉系脂肪細胞から分化させた肝細胞を用いたHCV感染評価系の確立

平成21年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：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

課題番号：H19-肝炎-一般-002

研究代表者：榎本 信幸

I. 研究の意義

1. 薬剤耐性(治療抵抗性)肝炎ウイルス感染が大きな問題となっている。
2. 本研究では、これらの薬剤耐性の病態を解明しその対策の基盤的研究を行うことにより、薬剤耐性ウイルス感染の診断・治療アルゴリズムの確立、新規治療法の開発を行う。

II. 研究の目的、期待される成果

本研究は以下の目的で実施する。

1. 薬剤耐性肝炎ウイルス感染の病態を解明し、その予測・診断法を確立する。
2. 耐性を予防・克服し現行の治療の効果を高める治療法の開発の基礎的研究を行う。
3. 既存治療に耐性の肝炎ウイルスに対しても有効な新規治療の開発を行う。

本研究の結果として、直接的には以下の成果が期待される

1. 現行治療の効果的な適用により安全・確実なウイルス肝炎治療体系が実現する。
2. 肝炎ウイルス感染機構に関する理解が深まるとともに耐性克服の基盤が形成される。
3. 既存治療とは全く異なる機序の治療法の開発による、耐性ウイルス感染の治療への展望が得られる。

III. 3年間の研究成果

●研究代表者(榎本信幸):ハイスループットの HCV ゲノムワイド解析システムを構築し、多数症例で HCV 全遺伝子配列を網羅的に決定し、HCV core 遺伝子および NS5A 遺伝子に peginterferon/Ribavirin 併用療法の治療効果を決定するアミノ酸変異が存在することを解明した。核酸アナログ治療前の HBV 全遺伝子配列の解析を行い、preS2 変異が耐性変異出現に関与する知見を得た。

●研究分担者(横須賀浩):HBV polymerase 180/204 重変異は adefovir 治療反応性が不良であること、HCV core 70/91 重変異は peginterferon/Ribavirin 治療に対する反応が不要であることを明らかとした。

●研究分担者(朝比奈靖浩):肝内脂肪沈着、血糖値、GGT、LDL-C、肝内自然免疫遺伝子発現、特に RIG-I 系発現などの宿主側因子が C 型肝炎の治療効果に影響することを見出した。

●研究分担者(鈴木文孝):Invader assay を用いた lamivudine, adefovir, entecavir 耐性 HBV 遺伝子の検出法を作成した。HCV core 領域のアミノ酸置換と ISDR の変異数が治療効果に関係することを明らかとした。

●研究分担者(加藤直也):Taqman 法を用いた lamivudine 耐性 B 型肝炎ウイルスの検出系および培養系を確立した。interferon 関連分子の SNP を解析し C 型肝炎の病態と関連する SNP を同定、HCV core 蛋白変異株の定量系を開発し混在現象を見出した。

●研究分担者(中川美奈):Interferon 誘導遺伝子である GBP-1 が HCV-NS5B 蛋白と特異的に結合し HCV 増殖を抑制すること、NS4B が Cardif 及びその下流の RIG-I 依存性 interferon β 発現応答を抑制すること、IL28B 遺伝子多型が interferon 治療効果に強い影響を与えることを明らかとした。

●研究分担者(堀田 博):HCV-1b および 2a/2b 感染において C 型肝炎ウイルス NS5A の一部分 (IRRDR) のアミノ酸配列多様性が peginterferon/ribavirin 併用療法の効果予測と関連することを明らかとし、NS5A 結合宿主タンパク質として GCN2 kinase を同定した。

●研究分担者(加藤宣之):全長 HCV ゲノム複製細胞(5種類)を2年間にわたり継代培養し、HCV ゲノムの遺伝的変異動態および細胞の感受性変化を検討、HCV-RNA の再導入実験により interferon 抵抗性は HCV と宿主側因子の双方が関与することを明らかとした。

●研究分担者(鈴木哲朗):遺伝子型 2a HCV の ribavirin 耐性に関与する遺伝子型選択的な NS5B polymerase 変異を明らかにした。持続感染細胞への阻害剤長期処理によって、HCV protease 阻害剤耐性変異を同定、阻害剤結合部位から離れた部位であること、遺伝子型選択的であることなどの特徴を見出した。

●研究分担者(今村道雄):ヒト肝細胞キメラマウスを用いて HCV の ISDR 変異と感染性の関連を検討、また protease 阻害剤の単剤治療では早期に耐性クローンが選択されることを確認した。種々の変異型 HCV 感染マウスの作製、変異型 HCV の生体内における増殖能および薬剤耐性能の評価が可能となり、薬剤耐性株は、HCV の selection のみならず mutation によっても生じることを解明した。

●研究分担者(中本安成):慢性ウイルス肝炎トランスジェニックマウスモデル系の DNA マイクロアレイ解析により、慢性肝炎期には肝組織において HBV 特異的な CD8 陽性細胞障害性 Tリンパ球が検出され、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、がん化に伴い iNOS、8-OHdG の蓄積が生じ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。

●研究分担者(松本武久):In silico screening により探索した NS3/4A および NS2/3 protease 活性と HCV subgenomic replicon の両方を強く阻害するリード化合物の構造類縁化合物をデータベースから探索し、さらに抗 HCV 活性の強い化合物の同定に成功した。

●研究分担者(伊藤正彦):7 種の HCV NS3 protease 阻害化合物を in silico screening および in vitro における抑制効果判定実験により見出し、より効果の高い類縁体を同定、genotype1b および 2a の両者に有効な化合物候補を見出した。抗真菌薬 griseofulvin、抗癌剤 paclitaxel、AIDS 治療薬 ritonavir の抗 HCV 活性を見出した。

IV. 今後考えられる新たな課題

1. HBV 遺伝子解析による核酸アナログ耐性変異の解析および予測・診断・治療法開発と臨床応用
2. HCV 遺伝子変異による治療抵抗性の臨床的および基礎的解析と診断法の確立
3. HCV interferon 抵抗性の宿主因子、特に自然免疫系と IL28B 系の基礎的および臨床的解析
4. 細胞培養系およびマウスモデルによる治療抵抗性機構の解析
5. In silico screening による治療抵抗性肝炎ウイルスに有効な新規化合物の探索
6. 治療抵抗性ウイルス遺伝子および宿主遺伝子検査の臨床への導入
7. 治療抵抗性肝炎ウイルス感染による病変進展・発癌機構の解明と制御

V. 行政施策への貢献の可能性

1. 治療抵抗性肝炎ウイルス感染の診断法開発とそれに基づく現行治療法のアルゴリズムの改善
2. 治療抵抗性肝炎ウイルス感染の病態解明による、難治性ウイルス肝炎を予防・克服する新規治療法の開発基盤の形成
3. 新たな抗 HCV 化合物の同定による治療抵抗性肝炎ウイルス感染に対する新規治療薬の開発

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

●主任研究者 (榎本信幸)

Amemiya F, Maekawa S, Itakura Y, Kanayama A, Matsui A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Yamashita A, Sakamoto N, Itoh M, Enomoto N. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection.

J Infect Dis. 2008 Feb 1;197(3):361-70.

Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Asahina Y, Miyake S, Enomoto N, Izumi N. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy.

J Hepatol. 2008 May;48(5):736-42. Epub 2008 Feb 26.

●研究分担者 (伊藤正彦)

Jin H, Yamashita A, Maekawa S, Yang P, He L, Takayanagi S, Wakita T, Sakamoto N, Enomoto N, Ito M. Griseofulvin, an oral antifungal agent, suppresses hepatitis C virus replication in vitro. **Hepatol Res.** 2008 Vol 38 p909-18.

●研究分担者 (横須賀 収)

Nakamoto S, Imazeki F, Fukai K, Fujiwara K, Arai M, Kanda T, Yonemitsu Y, Yokosuka O. Association between mutations in the core region of hepatitis C virus genotype 1 and hepatocellular carcinoma development. **J Hepatol.** 2009 Oct 23. [Epub ahead of print]

●研究分担者 (朝比奈靖浩)

Asahina Y, Izumi N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Komatsu N, Umeda N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Enomoto N, Tasaka M, Sakamoto N, Miyake S. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. **Gastroenterology.** 2008 May;134(5):1396-405. Epub 2008 Feb 1

●研究分担者 (鈴木文孝)

Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Watahiki S, Iwasaki S, Kobayashi M, Kumada H. Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy: Two-year follow-up. **Journal of Hepatology** 2008; 48:923-931.

●研究分担者 (加藤直也)

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

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

●研究分担者 (中川美奈)

Itsui Y, Sakamoto N, Kakinuma S, Nakagawa M, Sekine-Osajima Y, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Watanabe M: Antiviral effects of the interferon-induced protein GBP-1 and its interaction with the hepatitis C virus NS5B protein. **Hepatology** 2009 (in press).

●研究分担者 (堀田 博)

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**, 2008; 48:38-47.

●研究分担者 (加藤宣之)

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.** 2009; 154:77-85.

●研究分担者 (鈴木哲朗)

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).

●研究分担者 (今村道雄)

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.

●研究分担者 (中本安成)

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