

Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

研究の目的: 核酸アナログ耐性HBV、インターフェロン・リバビリン抵抗性HCVの病態解明



背景 B型肝炎ウイルス(HBV)に対する核酸アナログ治療の導入
 著明な短期的効果 → 長期投与による核酸アナログ耐性ウイルスの出現
 C型肝炎ウイルス(HCV)に対するインターフェロン・リバビリン治療の導入
 3分の2の患者でのみウイルス排除可能
 → 依然として多数の治療抵抗性患者が存在

薬剤耐性肝炎ウイルスの病態解明・治療法開発が急務

H19・20・21年度の成果



核酸アナログ耐性B型肝炎ウイルス感染病態の解析

1. 核酸アナログに対する治療反応性・耐性化に関与するHBV遺伝子構造の特徴を解析
2. Realtime PCRおよびinvader法による耐性変異検出法を開発

治療抵抗性C型肝炎ウイルス感染病態の解析

1. インターフェロン・リバビリン治療抵抗性にHCVコアおよびNS5A遺伝子変異が関与することを発見
2. HCV培養細胞系においてインターフェロン、リバビリン、プロテアーゼ阻害薬に抵抗性のウイルスおよび細胞の特徴を解析
3. HCV NS5B蛋白、NS5A蛋白と相互作用する宿主蛋白を同定
4. 肝細胞脂肪化などの宿主代謝因子がC型肝炎治療抵抗性に関連することを発見
5. 肝内自然免疫関連宿主遺伝子が治療抵抗性に関与することを解明
6. 治療抵抗性および病変進展に関与する宿主遺伝子のSNPを同定

新規治療法の基盤開発

1. 肝炎モデルマウスにより薬剤耐性肝炎ウイルス感染系を作成
2. 肝炎モデルマウスにより病変進展に関与する遺伝子変動を解析
3. In silico screeningとウイルス培養細胞系を用いた抗ウイルス化合物探索システムにより抗HCV候補化合物を発見

期待される成果: 耐性機構の解明、診断・治療への応用、新規治療法の開発

核酸アナログ耐性HBVの病態解明 →

予測・診断法、発生機構・病原性解明および治療法開発

インターフェロン・リバビリン抵抗性HCVの病態解明 →

インターフェロン系抑制機構および抵抗性のウイルスおよび宿主因子の解明

インターフェロン・リバビリン抵抗性の診断および克服法の開発

治療抵抗性肝炎ウイルス感染診療に有効な診断・治療アルゴリズムおよび新規治療の開発

肝硬変・肝癌による死亡の減少

○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62年(1987)~平成2年(1990) 金沢医科大学・消化器内科
 平成3年(1991)~平成12年(2000) 東京医科歯科大学・第2内科
 平成13年(2001)~平成15年(2003) 東京医科歯科大学・消化器内科
 平成16年(2004)以降 山梨大学医学部・第1内科

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

金沢医科大学・消化器内科 高田 昭 教授
 東京医科歯科大学・第2内科 丸茂文昭 教授
 東京医科歯科大学・保健衛生学科 佐藤千史 教授
 東京医科歯科大学・消化器内科 渡辺 守 教授
 武蔵野赤十字病院 泉 並木 副院長

・主な研究課題

1. HCVにおける治療反応性および病態を決定するウイルスおよび宿主因子の解明
2. HBV 遺伝子変異と病態
3. HCV 培養細胞モデルによる HCV 増殖機構、薬剤の抗ウイルス作用について分子生物学的研究
4. 消化器癌における発癌機序について網羅的遺伝子解析
5. アルコール代謝酵素 ALDH2 の多型とアルコール肝疾患病態との関連の解明

・これまでの研究実績

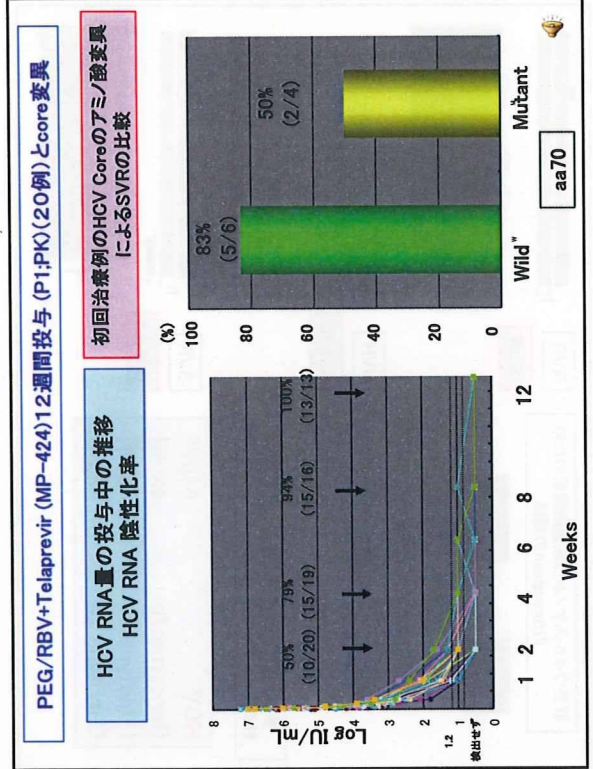
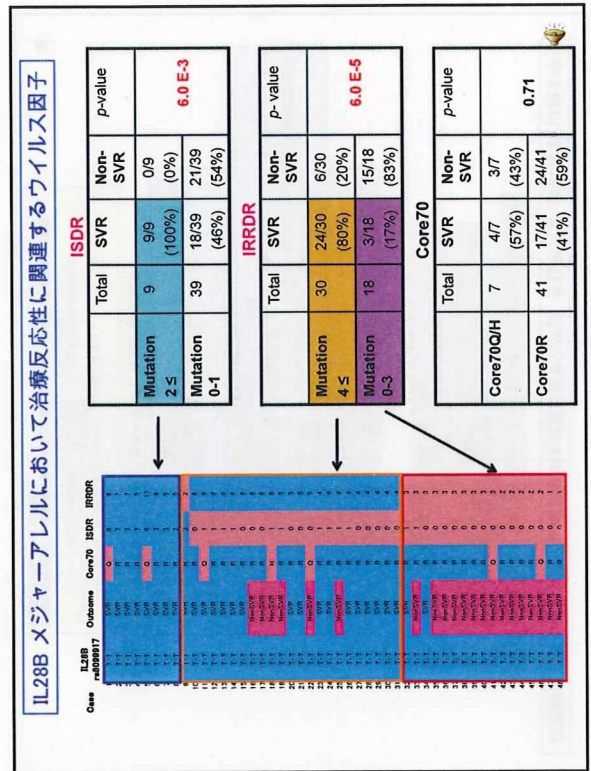
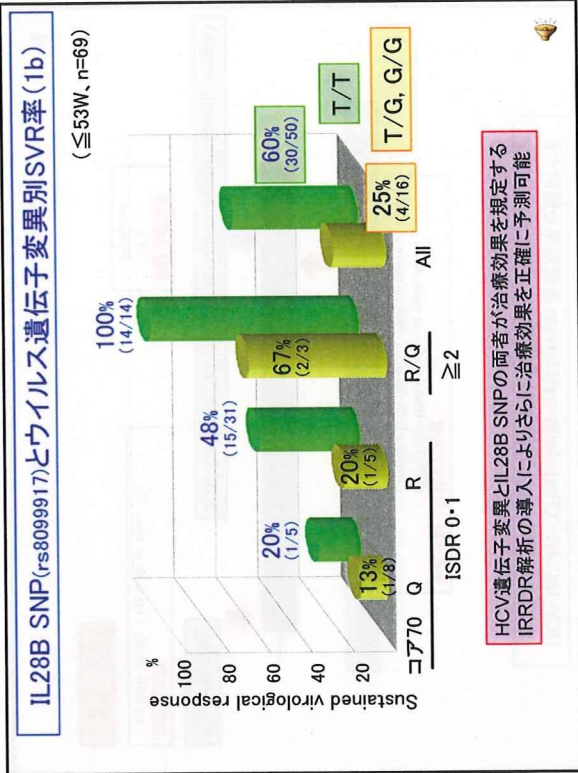
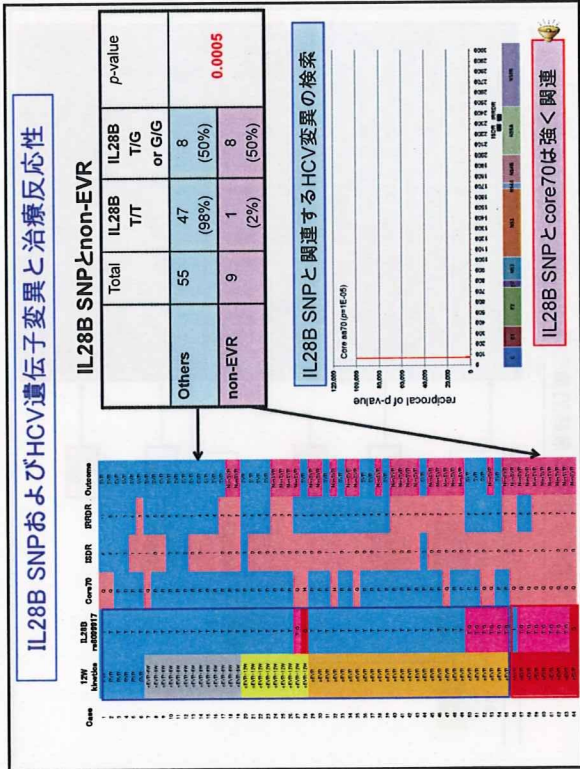
1. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol.* 2009;44(10):1009-15.
2. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 2008 Feb 1;197(3):361-70.
3. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology.* 2008 May;134(5):1396-405.
4. 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.
5. Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology* 2008 Feb 5;371(1):71-85.
6. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008 Sep;23(9):1437-47.
7. HCV nonstructural proteins responsible for suppression of RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol* 2007 Dec;88(Pt 12):3323-33.
8. Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J Viral Hepatitis* 2006 Oct;13(10):690-700.
9. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepatitis* 2006 Sep;13(9):582-90.
10. Viral load change and sequential evolution of entire hepatitis C virus genome in Irish recipients of single source-contaminated anti-E immunoglobulin. *J Viral Hepatitis* 2005 Nov;12(6):594-603.
11. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2005 Oct;43(4):623-9.
12. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2005 Oct;42(4):962-73.
13. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology.* 2005 Sep;129(3):1031-41.
14. Characteristic sequence changes of hepatitis C virus genotype 2b associated with sustained biochemical response to IFN therapy. *J Viral Hepat.* 2005 May;12(3):251-61.
15. Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV replicon derived from chimpanzee-infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in Huh-7 cells. *J Viral Hepat.* 2004 Sep;11(5):394-403.
16. Quantitation of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction--and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. *J Infect Dis.* 2004 Apr 1;189(7):1151-7. Epub 2004 Mar 12.
17. Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. *J Virol.* 2004 Sep;78(18):9713-20.
18. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *J Infect Dis.* 2004 Apr 1;189(7):1129-39. Epub 2004 Mar 16.
19. Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jan 2;313(1):42-7.
20. Chronic HDV Infection with Genotype IIb Variant is Correlated with Progressive Liver Disease. *J Gen Virol* 2003 Dec;84(Pt 12):3275-89.
21. Hepatitis C Virus NS5A Protein Inhibits TNF-alpha Mediated Apoptosis in Huh7 Cells. *J Infect Dis* 2003 Nov 15;188(10):1537-44.
22. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003 Jun;4(6):602-8.
23. Sequence element correlating with circulating viral load in genotype 1b hepatitis C virus infection. *Virology* 311:376-83, 2003. 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.

●特許番号2939171および3629372:ジェノタイプ1bのC型肝炎ウイルスに対する治療の有効性の判定方法及びそのためのプライマー

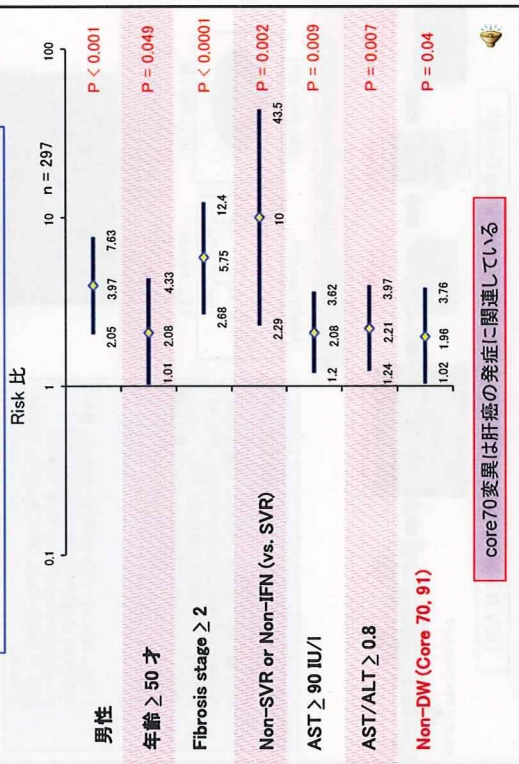
・平成22年度 肝炎等克服緊急対策研究事業への新規研究課題の応募状況

※申請している場合は、申請課題名を記載してください。

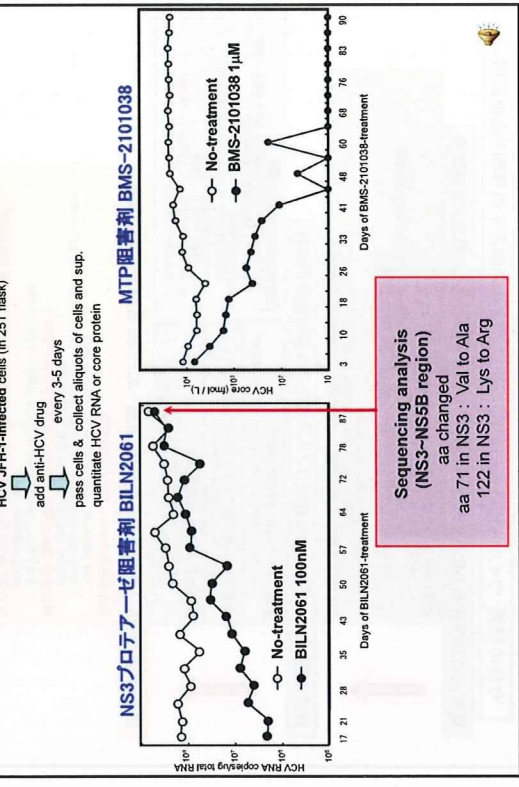
「ウイルス性肝炎に関わる、病態に応じたウイルス側因子の解明と治療応用に関する研究」



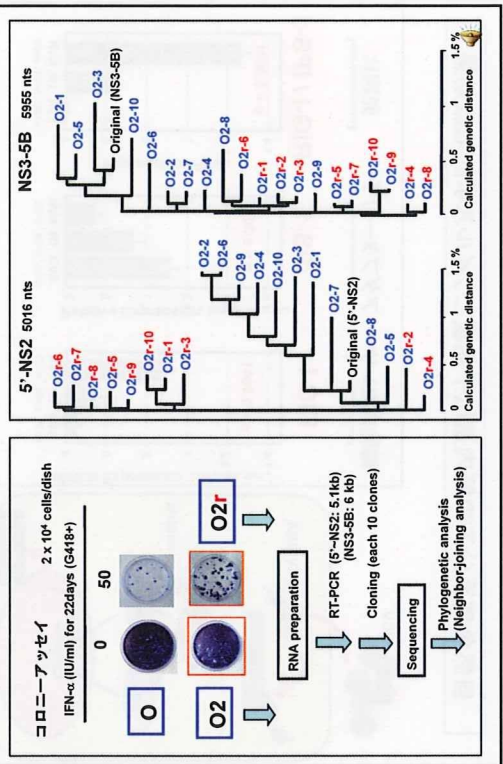
HCVによる発癌の危険因子：多変量解析結果



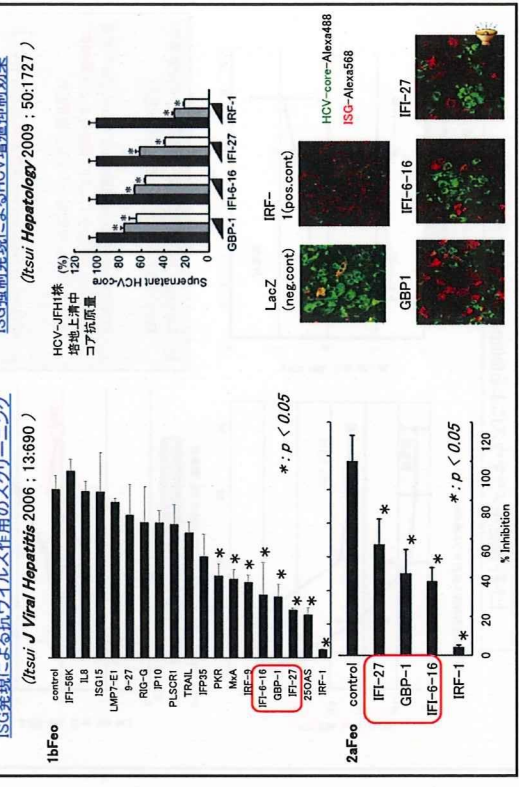
HCV持続感染細胞系を用いた薬剤耐性HCVの解析



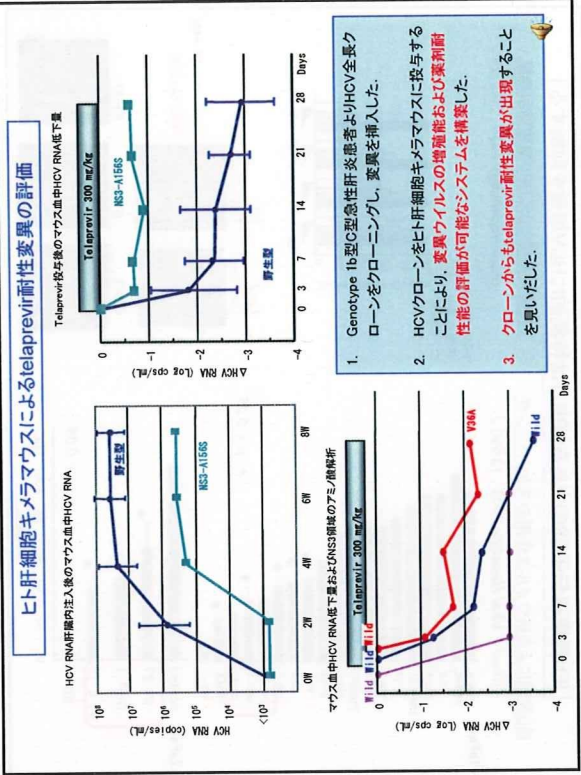
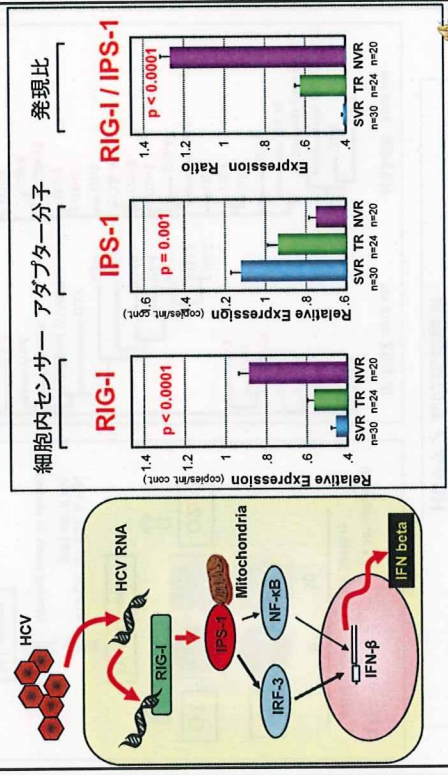
IFN- α に抵抗性を示す全長HCV RNA複製細胞と親細胞を用いたHCVゲノムの比較解析



IFN誘導遺伝子(ISG)であるGBP-1は特異的にHCV増殖を抑制する



自然免疫系分子の肝内遺伝子発現とウイルス学的治療効果



HCV NS3/4A proteaseを標的としたStructure-Based Drug Design

特徴: インターフェロン/リビリン併用治療抵抗性ウイルス株の出現に対応。北化合物はMDL CMCライブラリから、北里大 梅山秀明教授が関与したGENIUSで探査し、NS3/4A高活性型SoNS4A-NS3 proteaseタンパク質を試用したセリンプロテアーゼ活性阻害試験でHCV subgenomic repliconアッセイで評価。

成果: 2系統の細胞毒性が低い阻害剤を見出した。最も活性の高い化合物NS3-PRO-0071は、HCV subgenomic repliconアッセイでIC₅₀ 6 nMを、SoNS4A-NS3 protease 活性性に対してIC₅₀ 600 nMを示した。

本研究で発見したNS3/4A protease活性阻害剤

HCV71_con_CG1 IC₅₀: 10 nM

NS3-PRO-0071 IC₅₀: 600 nM

非公開

今後の課題: ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス変異の解明と治療応用

目的: ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス変異の解明と治療応用

背景: 肝ウイルス変異は多様な病態、日進月遷する病態、長期投与による持続アノログ耐性ウイルスの出現の予測は困難。ホリマラセマール一長期間投与によるインターフェロン/リビリン治療C型肝炎ウイルス(HCV)に対するインターフェロン/リビリン治療一部の高寛解率は肝臓に進展した慢性肝炎の多発性の病態は不明。肝ウイルス変異の解析による病態解明・診断治療法の開発が急務。

方法: 臨床的および基礎的な肝ウイルス変異の統合的解析

- 持続アノログ耐性HCV感染の解析: HCV全長ゲノム解析による耐性変異ウイルスの出現予測
- 治療抵抗性HCVの病態の解析: コア-NS5A遺伝子変異と治療抵抗性
- 耐性ウイルスによるインターフェロン/リビリン治療阻害の解析: NS3変異とプロテアーゼ耐性
- 宿主因子(自然免疫分子、IL28B, etc.)の解析: ウイルス因子と宿主因子の相互作用

効果: 肝ウイルス変異情報の診断・治療への応用、新規治療法の開発

治療抵抗性ウイルス変異の病態解明: 予測・診断法、発症機構、高寛解率病態および治療法開発。インターフェロン/リビリン併用治療抵抗性ウイルス変異の病態解明。耐性ウイルス変異の病態解明。

病態解明: 病態に關するウイルス変異子変異多数例における同時的・相続的ウイルス変異子解析

新規の診断治療法の開発: 肝ウイルス変異子変異の解析による病態解明・診断治療法の開発

肝ウイルス変異子情報を臨床応用するための遺伝子検査・解析法の標準化: 検査法、検体アルゴリズムの標準化と検証、有用性のエビデンスの確立

治療効果の向上により肝硬変・肝癌死の減少

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：ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する総合研究課題番号：H19-肝炎-一般-003研究代表者：浜口 功**I. 研究の意義**

血液製剤（輸血含む）を介する肝炎ウイルス（HBV、HCV、HEV）感染症は、日本赤十字血液センター、血液製剤メーカーの対応にも関わらず、いまだ解決していない。本研究課題では、簡便性と経済性を重視した新規の肝炎ウイルス検出法の開発、院内肝炎感染または医療行為に伴う肝炎ウイルス再活性化の実態解析、および全国規模の輸血副作用サーベイランスシステム構築を実現し、総合的な肝炎ウイルス感染防止体制の確立を行う。

II. 研究の目的、期待される成果

日赤中央血液研究所、国立感染症研究所、および全国大学病院輸血部、細胞治療部と連帯し緊密な研究体制を進めることで総合的な肝炎ウイルス感染防止体制を確立する。本研究では、1) 肝炎ウイルスと院内感染および潜伏肝炎ウイルス再活性化において、院内感染、潜伏肝炎ウイルス再活性化の実態を明らかにし、有効な対策についても検討する。2) 輸血・細胞療法のウイルス安全性において、RNA 増幅およびマイクロアレイなどの新しい技術を駆使し、HCV、HBV および HIV の安全性を担保できる検出システムの構築を目指す。3) 安全な血液を確保するための総合戦略の確立においては、「安全な輸血製剤の安定供給の確保」および「安全で適正な輸血医療」を実現するための必要な方策について、輸血副作用に関するサーベイシステム構築を行い総合的に検討する。

III. 3年間の研究成果

1) 病原体検出のための、共通モチーフ集合プライマー予測アルゴリズム (CoCoMo) を用いたウイルス特異的 degenerate primer の設計 ((研究代表者/研究分担者: 山口一成、協力研究者: 遠藤大二 (酪農学園大獣医))

HIV など、遺伝子型の間 (ウイルス群) に保存領域が存在しないウイルスに対応するため、縮重プライマー (degenerate primer) を用いた遺伝子検出法を利用して、複数の遺伝子型 (ウイルス群) を網羅的に検出する方法を開発した。

2) 安全な血液を確保するための総合戦略の一環として年 2 回、全国規模での厚労科研輸血関連合同班会議、シンポジウムを開催した (毎回約 100 名の参加)。

3) 日本人における肝炎ウイルス浸隠状況調査 ((分担研究者: 紀野修一 (旭川医科大病院 臨床検査・輸血部)、大戸 斉 (福島県医大医病院 輸血・移植免疫部)、高橋孝喜 (東京大病院 輸血部)、高松純樹 (名古屋大医病院 輸血部))

輸血前後の感染症検査・輸血前検体保管の実施状況調査を行うとともに、肝炎ウイルス浸隠状況について解析を行った。研究結果から、効率的な輸血後感染症検査実施体制を構築するため輸血前感染症検査と輸血前検体保管のガイドライン上の位置づけを病院規模や診療内容に応じてわかりやすく提示できる様に提言を行う。また、旭川医科大学病院における輸血前検査実施患者検査成績から、全体の陽性率は、HBs抗原: 3.7%、HBs抗体: 29.2%、HBc抗体: 30.2%、HCV抗体 6.3%、HCVコア抗原: 3.6%であり、肝炎ウイルス浸隠率を知るデータとなる。

5) 安全な血液を確保するための総合戦略 (研究代表者/研究分担者: 山口一成 (国立感染症研究所)、研究代表者/研究分担者: 浜口功 (国立感染症研究所)、研究分担者: 高橋孝喜 (東京大病院 輸血部)、高松純樹 (名古屋大医病院 輸血部))

「安全な輸血製剤の安定供給の確保」および「安全で適正な輸血医療」を実現するための必要な方策について、全国の医療機関の輸血副作用情報を収集し、これらのデータを基に、必要な方策について総合的に検討するシステムを日本輸血・細胞治療学会と確立を行った。

6) ウイルス遺伝子の特異的増幅方法の確立 ((分担研究者: 水谷哲也 (国立感染症研究所ウイルス第一部)、協力研究者: 遠藤大二 (酪農学園大獣医)、江下優樹 (大分大医)、佐藤朝光 (福岡大医))
血液検査において、複数のウイルス遺伝子を同時に非特異的に増幅することにより操作簡便化と、安価な DNA chip を用いて検出するシステムの構築をおこなった。

7) ウイルス核酸検出用 DNA Chip の検出能力の評価 (研究代表者/研究分担者: 浜口功 (国立感染症研究所血液・安全性研究部)、半田誠 (慶応義塾大医 輸血・細胞治療部) 研究協力者: 水上拓郎、滝澤和也 (国立感染症研究所))

DNA Chip を用いた病原体検出システムを用い、複数の遺伝子型を有する HIV、HCV、HBV、PvB19 及び WNV の 5 種類のウイルスの網羅的な検出方法を開発した。特許出願を行う。

8) 国内技術を基盤としたウイルス検出用新規核酸増幅法の開発 (分担研究者: 古田里佳 (大阪赤十字血液センター・研究部)、田所慶治 (日本赤十字中央血液研究所))

輸血感染症検査において等温キメラプライマー核酸増幅法 (ICAN[®]法) を用いて輸血血液感染ウイルス検出のための NAT 開発に成功した。

IV. 今後考えられる新たな課題

肝炎ウイルス浸隠状況の全国調査: 今回の検討は単施設の輸血前検査成績をまとめたものであるが、日本全体の陽性率や地域間差を求めるためには、施設数の拡大が必要である。サーベイランスシステムの基盤拡充が望まれる。

V. 行政施策への貢献の可能性

血液（輸血を含む）を介した肝炎ウイルス感染症の研究は国内外で行われているが、医療体制、献血体制の背景が各国で異なっており、独自の研究が求められる。しかしながら血液を介した肝炎対策は実態調査を含めてその基本とならねばならない。実態調査に基づき、肝炎ウイルス浸透状況調査の結果は貴重なデータである。このようなデータを効率よく集積するためにも、本研究の成果をもとに、現状の肝炎ウイルス検査システムの改善に関する提言を行う予定である。また日本赤十字血液センターおよび全国の血液・輸血関係者を網羅し、新しい副作用モニタリングシステムの構築はこうしたデータの集積に役立つものと思われる。本研究において、輸血・細胞治療学会や日本赤十字社との連携といったソフトの部分と、モニタリングシステムや新しいウイルス検出システムの開発といったハードの部分を融合させ有意義な研究が行われた。なお特筆すべきは、本開発研究プロジェクトから病原体検出法に関する特許出願につながる成果を出せた。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

1. H. W. Reesink, C. P. Engelfriet, G. Henn, W. R. Mayr, G. Delage, F. Bernier, T. Krusius, A. Assal, P. Gallian, C. Corbi, P. Morel, B. David, P. De Micco, H. Murokawa, H. Yugi, S. Hino, K. Tadokoro, Ø. Flesland, E. Brojer, M. Łtowska, G. Olim, F. Nascimento, H. Gonçalves, L. Castro, M. Morais, S. L. Stezinar, M. Alvarez, S. Sauleda, R. González, C. Niederhauser, M. Stolz, J.-P. Allain, S. Owusu-Ofori, R. Eglin, S. Stramer, M. Busch, D. M. Strong, J. Epstein, R. Biswas. Occult hepatitis B infection in blood donors. *Vox Sang.* 94:153-166, 2008
2. Endoh D, Hamaguchi I, CoCoMo-Primers: a web server to design degenerate primers for virus research, in preparation
3. Takizawa K, Nakashima R, Mizukami T, Mizutani T, Yamaguchi K, Hamaguchi I, Microarray assay using Novel design primers for the Multiple detection of pathogens, in preparation
2. 紀野修一. 当院における輸血前・輸血後感染症検査実施のための取組みと日本の現状. *医学のあゆみ* 255(7):610-611, 2008
4. Shumpei Watanabe, Tetsuya Mizutani, Kouji Sakai, Kentaro Kato, Yukinobu Tohya, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Yasuhiro Yoshikawa, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Hiroomi Akashi. Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *J. Clin. Virol.* 2008. 43: 56-59.
5. Furuta RA, Kondo Y, Saito T, Tomita M, Oka K, Kishimoto Y, Tani Y, Shibata T. Transfusions of red blood cells from an occult hepatitis B virus carrier without apparent signs of transfusion-transmitted hepatitis B infection. *Transfus Med.* 2008 Dec;18(6):379-81
6. 特許申請：「複数の遺伝子型を有する HIV、HCV、HBV、PvB19 及び WNV の 5 種類のウイルスの網羅的な検出方法、ウイルス検出用プライマーセット、マイクロアレイ及びウイルス検出用キット」出願準備中

Ⅶ. 2) Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等



○研究代表者の研究歴等 山口 一成 (平成19、20年度)

・過去に所属した研究機関の履歴

昭和49年—平成16年 熊本大学医学部文部教官

平成16年—平成21年 国立感染症研究所 血液・安全性研究部部长

平成18年— 東京大学医科学研究所非常勤講師 (血液内科)

平成21年—

・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

岸本 進、高月 清 (熊本大学医学部内科教授)

・主な研究課題

血液学、輸血学、腫瘍ウイルス学、ワクチン、品質管理学

・これまでの研究実績

研究業績 (英文論文 192、和文論文 270)、受賞数: 3、特許の取得数: 5

昭和49年より熊本大学医学部に於いて岸本進、高月清教授らとともに血液学、ウイルス学の研究を行った。この間レトロウイルス (HTLV-1) により発症する成人 T 細胞白血病の臨床像の確立、発症予防、発症のメカニズム解析などを行っている。平成16年度から国立感染症研究所・血液・安全性研究部長として、ワクチン血液製剤を含む生物学的製剤の安全性の研究に従事。21年3月に定年退官となり、現在国立感染症研究所、客員研究員。

1. Mizukami T, Imai J, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K: Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety. *Vaccine*, 26(18):2270-83, 2008

2. Ohsugi T, Kumasaka T, Okada S, Ishida T, Yamaguchi K, Horie R, Watanabe T, Umezawa K: Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ) therapy reduces tumor formation in mice inoculated with Tax-deficient adult T cell leukemia-derived cell lines. *Cancer letter* 257(2),206-215,2007

3. Tsukasaka K, Utsunomiya A, Fukuda H, Fukushima T, Takatsuka Y, Ikede S, Masuda M, Nagashi H, Ueda R, Tamura K, Sano M, Momita S, Yamaguchi K, Kawano F, Hanada S, Tobinao K, Shimoyama M, Hotta T, Tomonaga M, and LSG Group: VCAP-AMP-VECP versus biweekly CHOP for adult T cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study, JCOG9801. *J Clin Oncol* 25(34):5458-64, 2007

4. Mizuochi T, Okada Y, Umemori K, Mizusawa S, Yamaguchi K: Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H. *J Virological methods* 136,254-256,2006

○研究代表者の研究歴等 浜口 功 (平成21年度)

・過去に所属した研究機関の履歴

平成 5年—平成 10年 熊本大学医学部分化制御講座 (大学院博士課程および特別研究員)

平成 10年—平成 14年 スウェーデン、ルンド大学遺伝子治療講座 (客員研究員)

平成 14年—平成 16年 慶應義塾大学医学部発生分化生物学教室 (講師)

平成 16年—現在 国立感染症研究所、血液・安全性研究部 (室長、部長)

・ 主な共同研究者 (又は指導を受けた研究者)

須田年生 (熊本大学医学部および慶應義塾大学教授)

ステファン=カールソン教授 (ルンド大学教授)

山口一成 (国立感染症研究所部長)

・ 主な研究課題

血液学、輸血学、ウイルス学、ワクチン、品質管理学

・ これまでの研究実績

研究論文 (英文論文 34)、特許の出願 1

平成 5年 4月—平成 9年 3月 熊本大学大学院医学研究科博士課程 (須田年生教授)、造血幹細胞に特異的に発現する分子の機能解析、平成 9年 4月—平成 10年 3月 学術振興会・特別研究員 (熊本大学医学部分化制御部門、須田年生教授) マウスにおける造血発生のメカニズム解析、平成 10年 4月—平成 14年 8月 スウェーデン、ルンド大学医学部遺伝子治療部門・客員研究員 (ステファン=カールソン教授) 造血幹細胞を用いた遺伝子治療法の開発、平成 14年 9月—平成 16年 7月 慶應義塾大学医学部発生分化生物学講座・講師 (須田年生教授) ES細胞からの造血発生のメカニズム解析、平成 16年 8月—現在 国立感染症研究所・血液安全性研究部 (山口一成部長) 血液製剤の安全性評価および血液製剤を介する感染症に関する研究、平成 21年 4月より血液・安全性研究部長として、血液製剤の安全性に関連する研究を推進している。

1. Mizuochi T, Ito M, Saito K, Kasai M, Kunimura T, Morohoshi T, Morohoshi T, Momose H, Hamaguchi I, Takai K, Iino S, Suzuki M, Mochida S, Ikebuchi K, Yamaguchi K, Possible recruitment of peripheral blood CXCR3+CD27+CD19+B cells to the liver in chronic hepatitis C patients. *J. Interferon and Cytokine Research, in press*

2. Yamazaki J, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Momose H, Masumi A, Ami Y, Hasegawa H, Hall WW, Tsujimoto H, Hamaguchi I, Yamaguchi K. Identification of cancer stem cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse model of adult T-cell leukemia / lymphoma (ATL). *Blood, 114, 2709-2720, 2009*

3. Mizukami T, Masumi A, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Naito S, Maeyama J-I, Furuhashi K, Tsuruhara M, Hamaguchi I, Yamaguchi K, An improved abnormal toxicity test by using reference vaccine-specific body weight curves and histopathological data for monitoring vaccine quality and safety in Japan. *Biologicals, 37, 8-17, 2009*

4. Hamaguchi I, Imai J-I, Momose H, Kawamura M, Mizukami T, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Kato H, Mizutani T, Horiuchi Y, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K, Application of quantitative gene expression analysis for pertussis vaccine safety control. *Vaccine, 26 :4686-96, 2008*

5. Mizukami T, Imai J-I, Hamaguchi I, Kawamura M, Momose H, Naito S, Maeyama J-I, Masumi A, Kuramitsu M, Takizawa K, Nomura N, Watanabe S, Yamaguchi K, Application of complementary DNA microarray technology to influenza A/Vietnam/1194/2004 (H5N1) vaccine safety evaluation. *Vaccine*, 26 :2270-83, 2008

・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

※申請している場合は、申請課題名を記載してください。

ウイルス肝炎感染防止体制の確立に関する 総合研究

国立感染症研究所
血液・安全性研究部

浜口 功

新規肝炎ウイルス検出法開発

ウイルス肝炎感染防止体制の確立

肝炎ウイルスの院内感
染および潜伏肝炎ウイ
ルス活性化の研究

輸血副作用に関連した
サーベイランスシステ
ムの構築

輸血前後の感染症検査の目的と対応策

- 輸血患者の健康被害を早期に見出すためには？
 - 輸血後の検査
 - その実施率は低いのでそれを向上させる方策を検討
- 健康被害の原因(輸血感染？ 再活性化？ 院内感染？ 性感染？ etc.)を究明するためには？
 - 輸血前の感染状態の把握
 - 輸血前検査 and/or 輸血前検体保存
 - 現状(普及程度、コストなど)から、それらの有用性を検討
- 血液による感染被害拡大を最小限に食い止めるためには？
 - 輸血後患者のフォローアップ体制確立
 - ヘモビジランス体制との連動
 - 輸血前(輸血後)検体保管の強化

輸血前後の感染症検査・輸血前検体保管の実施状況調査

平成20年度(2008)施設、回答率50.4%

• 輸血前感染症検査

- 輸血前検査として独立して原則すべての症例に、調査がガイドラインに沿って輸血前感染症検査を行っている施設は約25%で、入院時検査や術前検査とあわせて行っているのは約60%であった。約10%の施設では輸血前検査をしておらず、その約70%施設では輸血前検査を実施しない理由として輸血前検体保管を行っているからとしていた。
- HBsAg、HCVAbは、ほぼすべての施設で採用されていたが、HBsAb、HBeAb、HCVcAgは約半数、HIVAbは約70%施設での採用率であった。
- 輸血療法の実施に関する指針に示されているすべての項目(HBsAg、HBsAb、HBeAb、HCVAb、HCVcAg、HIVAb)を採用している施設は38%、いづれかの人間時検査(HBsAgとHCVAb)は44%であった。
- 輸血療法の実施に関する指針に示される全項目の検査実施率が輸血患者の80%を超える施設は25%、実施率が20%を下回る施設が約60%であった。

• 輸血前検体保管

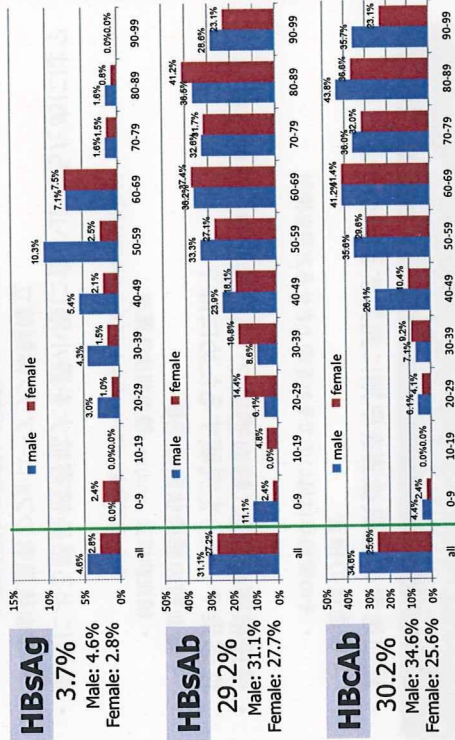
- 95%以上の施設で、輸血前検体の凍結保存が行われ、そのうち約90%の施設では24ヶ月以上保管していた。
- 72%の施設では、血液型検査や交差試験の凍余検体を保存していた。41%の施設ではNATに耐える採血管で保存していた。20%の施設では凍結保存専用の採血を行っていた。

• 輸血後検査

- 原則として全ての症例に輸血後検査を行っている施設は30~40%にすぎなかった。
- 検査項目としてHBV-DNAとHCVコア抗原は約70%、HIV抗体は約85%の施設で採用されていた。
- 肝炎ウイルス検査項目の組み合わせは、輸血療法の実施に関する指針に示されている項目を採用している施設が65.3%、輸血・細胞治療学全マニユアルに示されている項目を採用している施設が21%であった。
- 輸血療法の実施に関する指針に示されるすべての検査実施率が輸血患者の80%を超える施設は5%にすぎず、輸血後患者の20%を下回る施設が60%であった。

肝炎ウイルス浸透状況調査

旭川医科大学病院で、2005年7月から2008年12月までに輸血前感染症検査セットを用いて初回検査を施行した3353例の検査結果を集計し、浸透率を求めた。



輸血後検査HBV陽性の原因(平成19年度)

HBV陽性・HBsAg(+) and/or HBV DNA(+)

【個別調査】18/24施設が個別調査に回答:全37症例
(予備調査では24/37施設が個別調査に協力と回答)

- HBVキャリア : 19例
- HBV既感染から再活性化 : 6例
- 輸血による感染例 : 4例
(4例とも血液センターに報告済)
- 院内感染 : 0例
- 性交渉による感染 : 0例
- 原因の特定不能 : 5例
 - HBSAb, HBcAb未検 : 1例(輸血前検査、保管検体の検査)
 - 輸血による感染の可能性あり : 4例(4例とも血液センターに報告済)
- 判定不能 : 3例

【輸血による感染の可能性あり】
輸血後検査陽性で、輸血前検査・保管検体検査で陰性、血液センターには報告しているが、輸血による感染と診断されていないもの。院内感染や性交渉による感染などが考えられるが、原因は特定できない。

輸血前検体保管を含めた輸血前後の感染症検査を効率的に実施するための提言(平成22年3月)

- 1) 輸血前検査と輸血前検体保管について
輸血前検体保管を主に、輸血前感染症検査を従とする内容に書き換える。ただし、医療機関の規模や設備などに合わせて選択できる内容とする。
- 2) 輸血後検査実施率向上を目指す
輸血後感染症検査の完全実施を目指し、輸血後検査実施体制について検討する組織を立ち上げる。
- 3) 小児の輸血前後の感染症検査、輸血前検体保管ガイドラインを策定する
- 4) 肝臓病診療、院内感染対策との連携強化
輸血前後の感染症検査、輸血前検体保管に関する調査研究で明らかとなった成果を肝炎診療や院内感染対策に利用し、これらの専門家が共同研究できる組織を作るべきである。
- 5) 輸血前後の感染症検査項目の見直しとヘモジタスセンターの設置
現在ターゲットとしている3種類のウイルス(HBV, HCV, HIV)設定をリスク、コストなどから通見直す必要がある。そのためには、客観的サーベイで得られた調査結果を根拠とする必要があり、中立的なヘモジタスセンターの設置が必要である。

ヘモジタスの将来構想

「オンライシステム」を 現行の報告体制を補充する形で、どのように(組み込み)活用するか。

- オンライシステムの位置づけ
- ・対象とする製剤の種類
- ・赤血球、血小板、新鮮凍結血漿
- ・報告内容 症状項目+診断項目

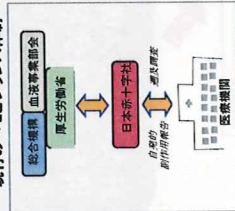
システムをどのように拡大するか？

1. 大学病院及び大規模病院のシステムに参加をはかり、実態の概要を把握する。(体前の整備後、全国の医療機関に拡大する。)
2. 中小の医療施設の参加可能な環境を整える。

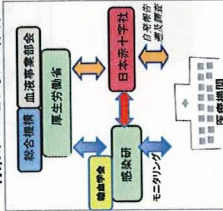
「収集した副作用データ」を、今後の国の施策に對しても、どのように活用するか。

1. モニターされたデータの報告(年報)
2. 専門家によるデータの分析、及び副作用に對する診断および対応の構築化
3. 新しく導入される輸血に関する安全対策の評価

現行のヘモジタス体制



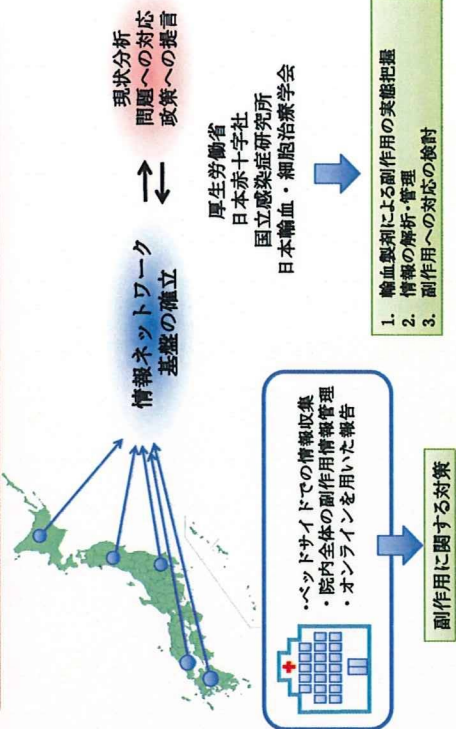
将来のヘモジタス体制



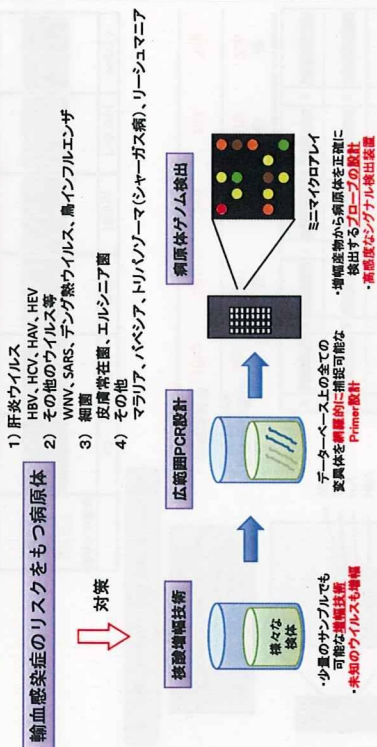
日本における輸血副作用サーベイランス体制の確立



輸血副作用サーベイランス体制の確立

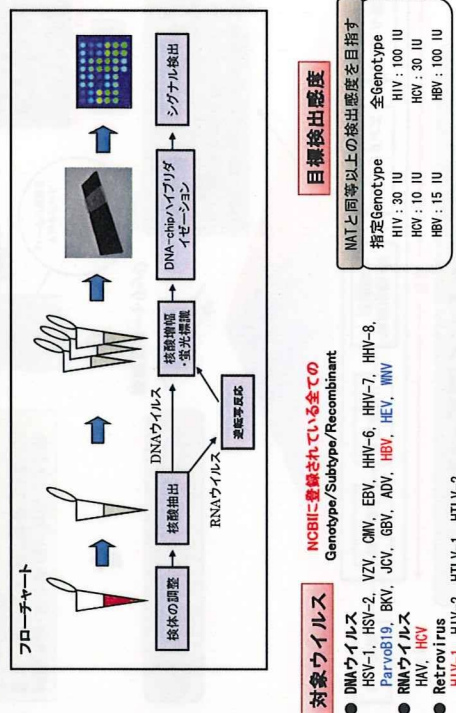


新規ウイルス検出システムの開発



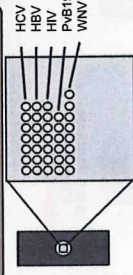
- 課題**
1. 網羅的なウイルス検出用PCR Primer設計システムの開発
 2. 高感度にウイルス検出を検出するマイクロアレイシステムの開発
 3. 完全自動化を目指した研究開発
 4. 病原体の追加/更なる感度向上を目指した核増幅技術の改良

ミニマイクロアレイを用いたウイルス検出システム



市販標準品を用いたウイルス検出感度の測定

①.NATと同等以上の検出感度を得ることが可能



調剤標準品
 HIV-1 Genotype B, ACCURAN 315
 HIV-1 Genotype A, ACCURAN 325
 PVB19 ND NAT Trcl
 WNV Strain NY 2001-0283, NAT Trcl

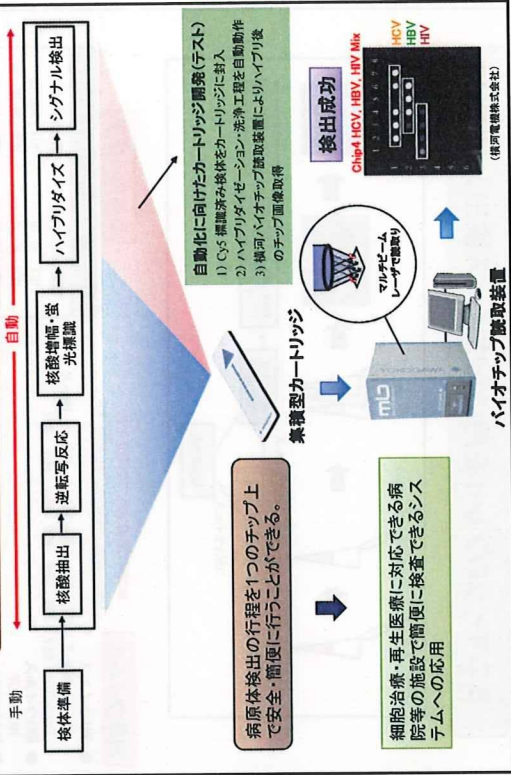
ウイルス	検出感度 (copies/ml)	検出感度 (IU/ml)	検出感度 (cp/ml)
HIV	5cp	2IU	10
HCV	2IU	1cp	5
HBV	1cp	5	10
PVB19	1	2	5
WNV	2	1	2

②.複数ウイルスの同時検出が可能

検査PCR産物	All	HIV(+)	HCV(+)	HBV(+)	PVB19(+)	WNV(+)
HCV (BU)	●	●	●	●	●	●
HIV (TR)	●	●	●	●	●	●
PVB19 (2U)	●	●	●	●	●	●
WNV (SCP)	●	●	●	●	●	●

平成21年12月14日特許出願・特願2009-283366

病原体検出システムの自動化



自動化に向けたカートリッジ開発(テスト)
 1) C/S 標識済み検体をカートリッジに封入
 2) ハイブリダイゼーション・洗浄工程を自動動作
 3) 梅河バイオチップ検取装置によりハイブリ後
 のチップ画像取得

病原体検出の行程を1つのチップ上で安全・簡便に行うことができる。
 細胞治療・再生医療に対応できる病院等の施設で簡便に検査できるシステムへの応用

検出成功
 Chip4 HCV, HBV, HIV, WNV
 (梅河電機株式会社)

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：肝炎ウイルスの培養系を用いた新規肝炎治療法の開発

課題番号：H19-肝炎一般-004

研究代表者：脇田 隆字

I. 研究の意義

申請者はC型肝炎ウイルス(HCV)のウイルス培養系を確立した。また、B型肝炎ウイルス(HBV)の場合、複製増殖実験は可能だが、培養細胞による感染実験系は確立されていない。両肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発が望まれている。そこで、本研究ではHBVやHCVのウイルス培養系や増殖系を用いて新規肝炎治療法の開発を目的とする。

II. 研究の目的、期待される成果

- (1) 肝炎ウイルスの新規感染モデルの開発
- (2) HCV増殖機構の解析と新規治療法の開発
- (3) HCV生活環に関与する宿主側因子の探索と新規治療法の開発
- (4) HBV増殖機構の解析と新規治療法の開発
- (5) 肝炎ウイルス培養系および増殖系を用いた抗ウイルス薬のスクリーニング

III. 3年間の研究成果

- ・主任研究者(脇田 隆字)：JFH-1株以外のHCV株によるウイルス培養系の構築を行った。すでに既報のウイルス株とともに、新規にHCV感染患者からウイルスを分離しウイルス遺伝子をクローニングした。レプリコンによる複製実験では一部のウイルス株による複製を確認した。培養細胞におけるレプリコン複製には適合変異が必要であった。適合変異を導入したウイルス株によるウイルス増殖、ウイルス粒子産生、感染を確認した。JFH-1株以外のウイルス株によるウイルス培養が可能となった。
- ・分担研究者(土方 誠)：小規模中空糸培養系をもちいて不死化肝細胞HuS-E/2細胞の立体培養系を完成させた。この系では従来の系に比較して、種々の患者血液由来天然型HCVの感染増殖が著しく高い効率で観察することが可能であり、また天然型HCV由来の感染性粒子産生が再現された。この培養細胞系を用いた解析から異なる患者血液由来HCVの感染増殖様式が多様であることや、細胞におけるPPAR α シグナル系がHCVの感染増殖を正に制御することを明らかにした。
- ・分担研究者(田中靖人)：不死化ヒト肝細胞を3次元培養により培養しHBV感染実験を行った。薬剤感受性試験および感染中和試験をおこなった。インターフェロンとエンテカビルなどの併用による相乗効果を確認した。preS抗体、S抗体(116抗体)やHBIGを用いた中和実験を行った結果、genotype C野生株のみならず、ワクチンエスケープ変異株(145R)も不完全であるが感染防御できることが示された。
- ・分担研究者(森石恒司)：HCV感染系におけるシグナルペプチドペプチダーゼによるHCVコア蛋白質の膜貫通領域の切断を抑制するとコア蛋白質は界面活性剤不溶化画分へは移行せず、ウイルス産生が低下する。コア蛋白質の膜貫通領域内の切断は抗ウイルス剤開発の標的になり得る。
- ・分担研究者(本多政夫)：肝組織において、HCV蛋白翻訳因子は正常肝よりC型慢性肝炎肝組織で発現が誘導され、肝組織のHCV-RNAと有意な相関を示した。La蛋白はJFH-1の感染により誘導されており、HCVは宿主翻訳因子を自ら誘導し複製に利用している。興味深いことにHCVのNS5AがLa蛋白の発現を上げていることが明らかとなった。
- ・分担研究者(原田和雄)：HCVゲノムRNA二次構造を標的とした複製阻害ペプチド/RNAの同定、およびその新規抗HCV薬への応用を試みた。KANシステムを用いた3'XSL2結合ペプチドの最適化を行い、結合最適化ペプチドによるレプリコン複製への影響を検証した。また、IRES IIIIf結合RNAステムループによるHCV RNA複製の抑制を解析した。
- ・分担研究者(坂本直哉)：8,000種の化合物のscreeningを施行し、HCV増殖を抑制する41種の化合物を同定した。さらに構造活性相関(SAR)解析により、IC50の優れた5個のepoxide誘導体を同定した。また、生薬成分化合物の細胞内HCV増殖に対する効果を解析し、甘草由来のisoliquiritigenin、glycycomarinにHCV repliconおよびHCV-JFH1ウイルス増殖抑制効果を確認した。また、肝コレステロール合成抑制薬(Statin)、肝脂肪化関連薬(Glitazon)添加によりそれぞれReplicon発現が抑制、および促進され、脂質代謝関連蛋白が新規治療法の標的因子となる可能性が示唆された。
- ・分担研究者(武部 豊)：HCVccアッセイを用いたHCV阻害剤探索のためのスクリーニング系を確立し、最適化した。複数の新規低分子HCVエンター阻害剤を同定した。また、強力な抗HCV作用をもつ糖鎖結

合タンパク質を同定し、その作用機序を解析した。

・分担研究者(池田正徳): ビタミン、アミノ酸、脂肪酸、およびミネラル類の HCV RNA 複製に対する効果を網羅的に解析した。日常的に摂取する栄養成分のうちリノール酸、ビタミン D2、β-カロテンが抗 HCV 活性を有することを見出した。この抗 HCV 活性は抗酸化剤でキャンセルされることから、酸化ストレスが抗 HCV 活性に重要であり、その機構として酸化ストレスによる MEK/ERK シグナル系の活性化が重要なことを明らかにした。また、アラキドン酸の代謝産物である 5-HETE が抗 HCV 活性を有することを見出した。

・分担研究者(竹原徹郎): B 型肝炎におけるラミブジン耐性に対するアデフォビル追加投与後の抗ウイルス効果はコアプロモーター領域にある V1753 変異とコア遺伝子内に存在する C2189 変異を有する例で優れていることが示された。また、分枝鎖アミノ酸 (BCAA) は HCV RNA 複製に対しては抑制効果があるが、ウイルス粒子形成から放出、再感染に対して促進効果を示した。

・分担研究者(加藤孝宣): Cre-loxP システムを用い、HCV 感染により GFP を発現する感染検出システムの構築を行った。Cre 存在下で GFP 発現が誘導されるレポータープラスミドと、Cre 遺伝子を持った HCV が生成されるコンストラクトを用い、Cre-HCV の感染により GFP の発現が誘導されることを確認できた。

・分担研究者(上田啓次): HBV pseudotype virus (HBVp) の開発に成功した。HBVp を用いた感染性を指標にしたヒト肝臓 cDNA のレトロウイルス発現ベクターライブラリーのスクリーニングが可能になった。

IV. 今後考えられる新たな課題

1. 不死化ヒト肝細胞を 3 次元培養により HBV 感染系および HCV 臨床株感染系が確立されつつある。本実験系を至適化し、HBV レセプターの探索、HBV 感染・複製過程や HCV の臨床分離株の感染過程を解明する。
2. HBV、HCV の増殖を制御する宿主因子の機能的解析を進め、新たな治療標的の探索を進める必要がある。
3. 細胞内脂質および脂質関連分子は HCV の生活環に重要であり、脂質代謝制御による HCV 複製抑制が可能。
4. HBV pseudotype virus の開発により、レセプター同定が期待される。さらに、HBV ゲノム解析により HBV の新たな複製制御機構あるいは制御領域を解明し、治療標的を探索する。
5. さらに抗ウイルス薬候補のスクリーニングを進める。ヒット化合物に関しては作用機序、標的因子を解析するとともに、化合物の至適化を進める。また動物レベルでの有効性、毒性を確認する。

V. 行政施策への貢献の可能性

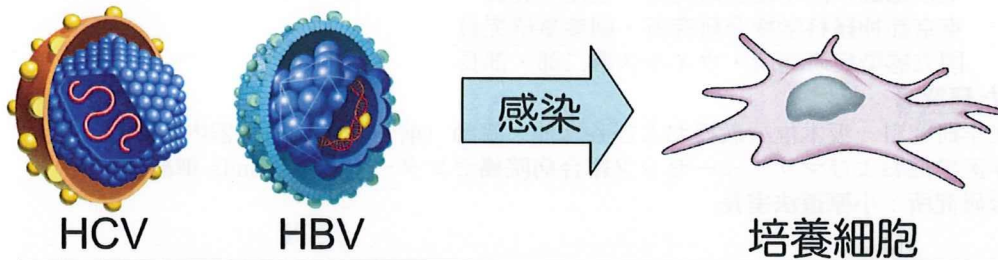
肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善し、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らし、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与する。また、ウイルス肝炎患者を広く検診で拾い上げ、適切な治療を行うことが社会的な要請である。この要請に応えるためにはより効果の高い治療法を低コストで実施できるよう開発していく必要がある。

VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- Hussein H. Aly, Yue Qi, Kimie Atsuzawa, Noobuteru Usuda, Yasutsugu Takada, Yasuhiro Tanaka, Masashi Mizogami, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: Strain-dependent viral dynamics and virus cell interactions observed in a novel in vitro system supporting the life cycle of blood borne HCV. *Hepatology*, 50, 689-696, 2009
- Hussein H. Aly, Kunitada Shimotohno, Makoto Hijikata: 3D cultured immortalized human hepatocytes useful to develop drugs for blood-borne HCV. *BBRC.*, 379: 330-334, 2009
- 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 particles. *J Virol*. 2008 82:7964-76.
- Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M, Hara H, Inoue Y, Tani H, Saito K, Nishijima M, Hanada K, Matsuura Y, Lai MM, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol*. 2008 82:5715-24.
- Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. 2009.83(20): 10538-10547.
- Sugiyama M, Tanaka Y, Kurbanov F, Maruyama I, Shimada T, Takahashi S, Shirai T, Hino K, Sakaida I, Mizokami M. Direct Cytopathic Effects of Particular Hepatitis B Virus Genotypes in uPA/SCID Mouse with Human Hepatocytes. *Gastroenterology*. 2009.136:652-62.
- Kurbanov F, Tanaka Y, Kramvis A, Simmonds P, Mizokami M. When should "I" consider a new hepatitis B virus genotype? *J Virol*. 2008. 82:8241-8242.
- 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. *Nature Cell Biology* 2007 9(9):1089-97.
- 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* 2007 81(15):8030-40.
- Kukihara, H., K. Moriishi, S. Taguwa, H. Tani, T. Abe, Y. Mori, T. Suzuki, T. Fukuhara, A. Taketomi, Y. Machara, and Y. Matsuura. 2009. Human VAP-C negatively regulates hepatitis C virus propagation. *J. Virol.* 83:7959-7969.
- Moriishi, K. Y. Matsuura, Host factors involved in the replication of hepatitis C virus. *Rev. Med. Virol.*, 2007. 17(5): p. 343-354.
- Abe, T., Y. Kaname, I. Hamamoto, Y. Tsuda, X. Wen, S. Taguwa, K. Moriishi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kanto, N. Hayashi, S. Akira, and Y. Matsuura, Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J. Virol.*, 2007. 81(17): p. 8953-8966.
- Amemiya F, Maeckawa S, Itakura Y, Kanayama A, Takano S, Yamaguchi T, Itakura J, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Yamauchi K, Okada S, Sakamoto N, Enomoto N: Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C. *J Infect Dis*, in press.
- Peng LF, Kim SS, Matchacheep S, Lei X, Su S, Lin W, Rungphan W, Choe WH, Sakamoto N, Ikeda M, Kato N, Beeler AB, Porco JA Jr, Schreiber SL and Chung RT: Identification of novel epoxide inhibitors of HCV replication: a high-throughput screen. *Antimicrob Agent Chemother* 2007; 51 (10):3756-3759.
- Ariumi Y, Kuroki M, Abe KI, Dansako H, Ikeda M, Wakita T, Kato N. DDX3 DEAD box RNA helicase is required for hepatitis C virus (HCV) RNA replication. *J Virol.*, 2007 81(24):13922-6

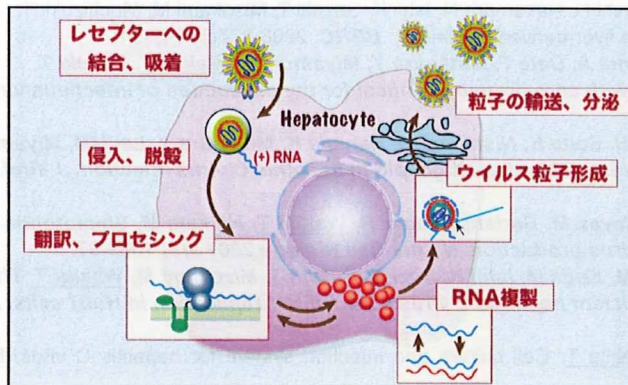
Ⅶ. Ⅲ (3年間の研究成果)の概要図等

1. 新規ウイルス培養系の開発



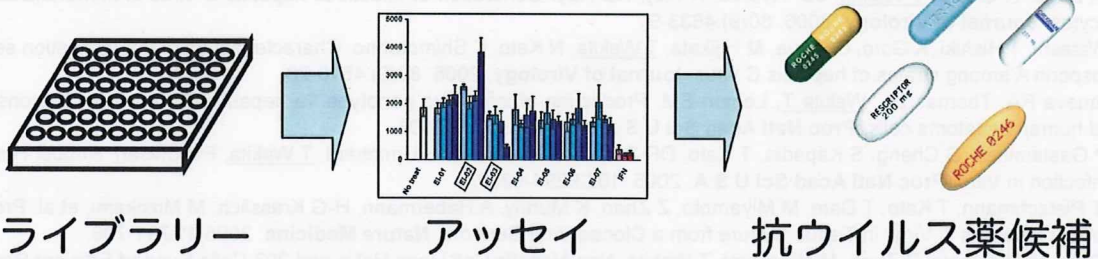
初代培養肝細胞や肝癌細胞など肝炎ウイルス培養に適した細胞の探索と開発

2. ウイルスの感染増殖機構の解析と治療標的の探索



肝炎ウイルスの感染、複製機構を解明して関与するウイルス側因子、宿主因子を同定、治療標的を探索

3. 抗ウイルス薬のスクリーニング



肝炎ウイルス培養系を用いて新規抗ウイルス薬を探索