

- Hugon J, Gatignol A, Akazawa D, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. PLoS One. 2010 5:e10575.
- 7) Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. PLoS Pathog. 2010 6:e1000885.
- 8) Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. Biochem Biophys Res Commun. 2010 395:565-71.
- 9) Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription. J Virol. 2010 84:5824-35.
2. 学会発表
- 1) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構」、第23回肝臓フォーラム（東部）、日本工業倶楽部会館（2010, 6.5）
- 2) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の解析」、第9回KMU研究推進セミナー、北陸がんプロ教育セミナー、金沢医科大学病院 新館12階大会議室（2010, 6.18）
- 3) 脇田隆宇, 「C型肝炎ウイルスの複製増殖および持続感染機構の研究」、第17回ソニックフォーラム、ソニックシティビル 6階 602 会議室（2010, 11.25）
- H. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究分担報告書

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた肝炎ウイルスに関する研究

研究分担者

茶山 一彰 広島大学 教授

研究要旨：肝炎ウイルスはヒトとチンパンジーのみにしか感染しないため、ウイルスの解析、薬剤棟の解析などが困難であった。我々はヒト肝細胞を移植したキメラマウスを用いてウイルスの感染実験を実施することに成功し、様々な研究を行ってきた。平成 22 年度には B 型肝炎ウイルスの HBx 蛋白の機能解析を行い、ウイルスの増殖にこの蛋白が必須であることを明らかにした。また、NS3-4A protease 阻害剤である telaprevir の評価、大豆から抽出された新規化合物である ME3732 の評価を行った。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスに対する研究はマウスなどの小動物モデルがないために、動物実験がきわめて困難であった。我々はヒト肝細胞キメラマウスを使用して様々な感染実験を行い、これまでに両ウイルスの安定的な感染が可能であること、クローンを用いた実験が可能であること、reverse genetics の系の構築が可能であることを明らかにしてきた。今年度の研究では、B 型肝炎ウイルスの HBx 蛋白の機能解析を行い、この蛋白がウイルス増殖に必須であることを明らかにした。また、NS3-4A protease 阻害剤である telaprevir の有効性の評価にこのマウスを用いた系が有用であることを示した。さらに、大豆から抽出された新規化合物である ME3732 の評価を行った。そして、telaprevir と

NS5B polymerase inhibitor を併用することによってウイルスを完全に排除することが可能かどうかについて検討を行った。

B. 研究方法

B 型肝炎ウイルスの HBx 蛋白の機能解析では、培養肝癌細胞に対して HBx 蛋白をトランスフェクションすることによりウイルス増殖に対する影響を評価した。また、HBx 蛋白をノックアウトしたウイルスクローンを作製し、その増殖能力を in vitro、in vivo の両方の系で評価した。さらに hydrodynamic injection により HBx 蛋白を人肝細胞キメラマウスの肝臓で発現させ、HBx をノックアウトしたウイルスが増殖可能となるかどうかについて検討した。telaprevir の薬効の評価では、ヒト肝細胞キメラマウスに C 型肝炎ウイルス感染患者の血清を投与し、ウイルスの増殖に対す

る影響がどのように評価可能かを検討した。また、ME3732をC型肝炎ウイルス感染人肝細胞キメラマウスに投与し、インターフェロンとの併用効果を評価した。さらに、telaprevirとNS5B polymerase inhibitorを併用することによってウイルスの完全な排除が可能かどうかを肝内HCV RNAの検出も行って評価した。

(倫理面の配慮)

ヒト血清の提供については広島大学の倫理委員会で承認を得た手続きを経てインフォームドコンセントを取得した。動物実験に関しては広島大学動物実験倫理規定に従って実験を実施した。

C. 研究結果

B型肝炎ウイルスに関しては、HBx蛋白がウイルス増殖を増強することを*in vitro*の実験で明らかにした。また、HBxを欠損したB型肝炎ウイルスは増殖能力がきわめて低く、ヒト肝細胞キメラマウスにおける感染は成立しなかった。HBx蛋白をhydrodynamic injectionによってヒト肝細胞キメラマウスの肝内で発現させた後に感染実験を行うと、ウイルス血症が認められた。この増殖してきたウイルスを解析すると、ノックアウトしたHBx遺伝子はもとの野生型に戻っていた。Telaprevirを用いた薬効評価では、このマウスの系で薬剤投与に関する様々な評価が可能であることを示した。ME3732の投与実験では、インターフェロンとの併用でC型肝炎ウイルスに関する抗ウイルス作用が増強されることを示した。また、telaprevirとNS5B polymerase inhibitorとの併用実験では、

この2剤の併用でインターフェロンを使用しなくても、C型肝炎ウイルスを排除できることを、肝内のHCV RNAも陰性であることを証明して示した。

D. 考察

我々のマウスモデルを使用して、B型肝炎ウイルスの蛋白の機能解析を行い、HBx蛋白がウイルスの感染、増殖必須であることを証明した。従って、この蛋白の機能をさらに詳しく解析し、阻害する薬剤を開発すれば新たなB型肝炎ウイルスに対する治療薬になることが期待される。また、telaprevirは抗ウイルス効果が極めて高く、インターフェロンとの併用のみならず、NS5B polymerase inhibitorとの併用でも高い効果を示した。今回我々が示したように、インターフェロンを使用しなくても、経口の抗ウイルス剤のみの使用でウイルスを排除できる可能性を示した。このことは、副作用やコストの面でインターフェロン治療を受けにくい症例には大きな朗報であるといえる。

E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた実験により、B型肝炎ウイルスHBx蛋白がウイルスの感染、増殖に必須であることを明らかにした。さらに、C型肝炎ウイルスの治療についても経口の抗ウイルス薬のみでウイルスを排除できる可能性を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H, Tsuge M, Imamura M. Animal model for study of human hepatitis viruses. *J Gastroenterol Hepatol*2010;26(1):13-8
- 2) Abe H, Imamura M, Hiraga N, Tsuge M, Mitsui F, Kawaoka T, Takahashi S, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tateno C, Yoshizato K, Murakami S, Yamashita N, Matsuhira T, Asai K, Chayama K. ME3738 enhances the effect of interferon and inhibits hepatitis C virus replication both in vitro and in vivo. *J Hepatol*2010;[Epub ahead of print]:[Epub ahead of print]
- 3) Ohara E, Hiraga N, Imamura M, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Kono T, Onishi M, Hirata D, Mitsui F, Kawaoka T, Tsuge M, Takahashi S, Abe H, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka S, Chayama K. Elimination of Hepatitis C Virus by Short Term NS3-4A and NS5B Inhibitor Combination Therapy in Human Hepatocyte Chimeric Mice. *J Hepatol*2010;[Epub ahead of print]:[Epub ahead of print]
- 4) Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Wakita T, Watanabe M. Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants. *Virology*2010;405(2):361-9
- 5) Tsuge M, Hiraga N, Akiyama R, Tanaka S, Matsushita M, Mitsui F, Abe H, Kitamura S, Hatakeyama T, Kimura T, Miki D, Mori N, Imamura M, Takahashi S, Hayes CN, Chayama K. HBx protein is indispensable for development of viraemia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*2010;91(Pt 7):1854-64
- 6) Kamiya N, Iwao E, Hiraga N, Tsuge M, Imamura M, Takahashi S, Miyoshi S, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Practical evaluation of a mouse with chimeric human liver model for hepatitis C virus infection using an NS3-4A protease inhibitor. *J Gen Virol*2010;91(Pt 7):1668-77

2. 学会発表

- 1) 茶山一彰, B型慢性肝炎の治療, 第96回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010
- 2) 今村道雄, 越智秀典, 茶山一彰, C型慢性肝炎に対するインターフェロン治療における ILB28 多型と Core 領域変異の影響, 第96回日本消化器病学会総会, 新潟, 2010
- 3) 茶山一彰, C型肝炎の最新の話, 第500回広島市医科学術講演会, 広島, 2010
- 4) 茶山一彰, C型肝炎の最新情報, 第46回日本肝臓学会総会 ランチョンセミナー1, 山形, 2010
- 5) 今村道雄, 越智秀典, 茶山一彰, C型慢性肝炎患者における ILB28 多型とウイルス側および宿主側因子との関連, 第46回日本肝臓学会総会 山形, 2010
- 6) 河岡友和, 高橋祥一, 田代裕尊, 大段秀樹, 茶山一彰, 肝移植後C型肝炎再燃に対する IFN 治療の現況と SVR 率改善のための検討, 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010
- 7) 石田友希, 兵庫秀幸, 石飛朋和, 鍋島由宝, 長沖祐子, 橋本義政, 片村嘉男, 河岡友和,

- 高木慎太郎, 脇 浩司, 平松 憲, 川上由育, 相方 浩, 高橋祥一, 茶山一彰, 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) における肝線維化と糖代謝異常の関連性について, 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010
- 8) 阿部弘美, 越智秀典, 柘植雅貴, 三木大樹, 光井富貴子, 平賀伸彦, 今村道雄, 高橋祥一, 茶山一彰, C型慢性肝炎患者に対する PegIFN/RBV 療法の治療効果と IL28locus の SNP および肝内 IFN 誘導遺伝子発現量の関連, 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010
- 9) 阿部弘美, 越智秀典, 柘植雅貴, 三木大樹, 光井富貴子, 平賀伸彦, 今村道雄, 高橋祥一, 茶山一彰, IL28 の多型と C型慢性肝炎の炎症、繊維化、 γ GTP との関連, 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010
- 10) 北本幹也, 井川 敦, 松本陽子, 山田博康, 川上由育, 茶山一彰, Genotype1b・高ウイルス量以外の C型慢性肝炎に対する Response-guided therapy, 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010
- 11) 大石和佳, 吉田健吾, 林 奉権, 楠洋一郎, 藤原佐枝子, 柘植雅貴, 茶山一彰, C型慢性肝炎ウイルス感染における HLA DRB1 と NKG 2D 遺伝子多型の影響, 第46回日本肝臓学会総会, 山形, 2010
- 12) 茶山一彰, C型慢性肝炎の治療の予測因子, 第28回犬山シンポジウム「肝炎・肝癌の新しい診断と治療」, 愛知, 2010
- 13) Chayama K, Personalized Medicine in Chronic Hepatitis B, TAsL 2010 Single Topic Conference, 台北, 2010
- 14) 茶山一彰, B型・C型慢性肝炎合併 CKD 患者におけるステロイド薬、免疫抑制薬使用に関する考え方, 第40回日本腎臓学会西部学術大会, 広島, 2010
- 15) 茶山一彰, C型慢性肝炎の最新の治療, 第239回世羅郡医師会学術講演会, 広島, 2010
- 16) 茶山一彰, Hepatitis C Virus Replication and
- 17) Response to Anti-viral Drugs in Human Hepatocyte Chimeric Mice, 第7回アジア太平洋肝臓病学会議 (APASL) シングルトピックカンファレンス, 千葉, 2010
- 18) 柘植雅貴, 今村道雄, 茶山一彰, B型慢性肝炎における核酸アナログ治療中止例の検討, 第14回日本肝臓学会大会 第52回日本消化器病学会, 横浜, 2010
- 19) 越智秀典, 今村道雄, 茶山一彰, C型慢性肝炎治療効果に対するゲノムワイド SNP 関連解析-IL28B 遺伝子多型と HCV ウィルスゲノム変異に関連して, 第14回日本肝臓学会大会 第52回日本消化器病学会, 横浜, 2010
- 20) 長沖祐子, 相方 浩, 橋本義政, 片村嘉男, 河岡友和, 高木慎太郎, 脇 浩司, 平松 憲, 今村道雄, 川上由育, 高橋祥一, 茶山一彰, C型慢性肝炎に対する IFN SVR 後肝発癌に対する局所治療後の再発, 予後の検討, 横浜, 2010
- 21) 相方 浩, 長沖祐子, 橋本義政, 片村嘉男, 河岡友和, 高木慎太郎, 脇 浩司, 平松 憲, 今村道雄, 川上由育, 高橋祥一, 茶山一彰, C型慢性肝炎 IFN SVR 後の肝癌サーベイランスについての検討, 第14回日本肝臓学会大会, 横浜, 2010
- 22) 柘植雅貴, B型慢性肝炎治療における最新の話題, 第52回日本消化器病学会, 横浜, 2010
- 23) Tsuge M, Kohno T, Abe H, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Chayama K,

Identification of Novel Hepatitis C Virus

Deletion Mutants in Chronic Hepatitis C Patients,

THE 61TH ANNUAL MEETING OF THE

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE

STUDY OF LIVER DISEASES, Boston, 2010

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特になし

研究分担報告書

B, C, E型肝炎の疫学, 免疫学, 亜細亜との共同研究に関する研究

研究分担者

アクバル シェイクMF 東芝病院研究部主任研究員

研究要旨：

亜細亜の開発途上国では肝炎ウイルス、特にB型及びE型肝炎ウイルスが蔓延しており、大きな医療問題・社会問題の一つとなっている。しかし、これらのウイルスの感染実態は未だ解明されておらず、現地では予防も治療も適切に行われているとは言えない。亜細亜の開発途上国におけるウイルス肝炎蔓延の実態が先進国の実態とは異なることを臨床と基礎実験によって明らかにし、亜細亜の開発途上国の社会状況・経済状況・医療状況に適したウイルス肝炎の予防と治療の方法を確立することが急務である。本研究では、バングラデシュ及びインドネシア国内でウイルス肝炎の実態について疫学調査を実施し、その調査に基づき亜細亜の開発途上国の病態の特徴を分析した。加えて、日本国内の基礎実験で安全性と効果の確認された新たな免疫治療法を開発途上国現地実態調査の結果をもとに現地で臨床治験を行い、開発途上国のためのウイルス性肝疾患新規治療法の開発、及び新ガイドラインの作成を試みた。

A.研究目的

発展途上国の実情に則した新規治療方法の開発、および新ガイドラインの作成。

B.研究方法

1. バングラデシュ国内の Acute on chronic liver failure (ACLF)患者について、慢性肝炎の病因、急性発症の特性、臨床的特徴及び予後についての検討。
2. バングラデシュにおける重篤な急性肝炎の病原因子についての検討。
3. バングラデシュにおける肝癌の特徴の

解明。

4. バングラデシュにおける Occult B 型肝炎の検討。
5. B 型慢性肝炎患者の核酸アナログによる免疫回復のメカニズムについての考察。
6. B 型慢性肝炎患者における抗原パルス樹状細胞治療の安全性と効果の解析。
7. 肝内 Natural Killer (NK) 細胞群の homeostasis 免疫抑制作用の解析。
8. HBV Transgenic mice (TM) に対する HBs/HBc 抗原ワクチンと樹状細胞を用

いた抗ウイルス作用の基礎的検討。

9. バングラデシュにおける Phase I 臨床試験 HBs/HBc 抗原複合ワクチン使用後1年の安全性と治療効果に対する考察。
10. インドネシアにおける B 型肝炎 ウィルス感染率 20 年間 (1990 年から減少) の変遷についての調査。

(倫理面の配慮)

バングラデシュ及びインドネシアにおける全ての臨床研究について、現地の共同研究機関の責任者を通じ、現地の大学及び病院の倫理委員会により研究の許可を得ている。また患者に対しては、研究及び治療を行うことの同意を得ている。日本における実験実施の際には、実験を行う大学側に実験計画を提出し許可を得て実験を行っている。

C. 研究結果

1. ACLF 患者 30 例中 77%にあたる 23 例の慢性肝炎の原因が B 型慢性肝炎ウイルスであった。一方、60%にあたる 18 例で IgM-HEV が陽性であり急性発症の原因が E 型肝炎ウイルスであった。また、3 ヶ月の経過観察で同 30 例のうち 6 例が多臓器不全で死亡した。
2. 患者全ての血清中に、IgM 型 HEV 抗体が見られ、急性肝炎に関するほかの病因は見られなかった。16 例について行った HEV RNA 分析により、E 型肝炎ウイルス系統樹を作成した結果、ウイルスは全て同一のものであることが判明し、単一の感染経路からウイルスが広がった集団感染であることが明らかになった。
3. 肝癌患者 57 例中で 52 例が男性であった。患者には、腹部のしこり、腹痛、体重減少、発熱の症状がみられた。HBs 抗原陽性が 62%の患者から検出された一方で、HCV 抗体陽性は 6%であった。また、77%の患者に肝硬変が確認された。
4. 原因不明の慢性肝疾患であり、かつ、A 型肝炎ウイルス、E 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスについて陰性であった 30 例の患者について、血清中の HBV DNA 検査を行った。そのうち 10 例は HBs 抗原陰性であったが、低量の HBV DNA が検出された。8 例は肝硬変まで進行していた。2 例は ALT 上昇が見られたものの組織検査では肝障害はみられなかった。
5. B 型慢性肝炎患者は HBV に特異的な免疫反応が減少する。ラミブジンを 1 ヶ月間摂取した後、抗原提示樹状細胞 (DC) の活性化が起こり、T 細胞に特異的な免疫反応を回復した。しかし、ラミブジンを 1 カ月摂取した DC レベルの結果と、3 ヶ月および 12 ヶ月後に調査した結果を比較したところ、それ以上の DC 機能の活性化は見られなかった。
6. B 型慢性肝炎患者 5 名の抹消血から単核球を分離し、樹状細胞を作成した後、この樹状細胞と HBs 抗原を混合培養し、HBs 抗原パルス樹状細胞を作成した。この HBs 抗原パルス樹状細胞を B 型慢性肝炎患者に 1~3 回皮下注射し、3 年間の経過観察を行った結果、安全であることが証明された。効果として、5 例中 2 例に HBs 抗原特異的免疫反応が確認された。

7. 肝内高レベルの IL-10 と低量の IFN-gamma を産生する NK 細胞群を制御性 NK 細胞とし、マウスの肝臓より抽出し flow cytometry を利用し確認した。これらの制御性 NK 細胞は T 細胞の増殖を抑制した。
8. HBV TM の脾臓から採取した樹状細胞を HBs/HBc 抗原でパルスし、HBV DNA 陽性、HBV TM の腹内に注入した。この HBs/HBc 抗原パルス樹状細胞により、HBV TM 全例の血中において HBV DNA が陰性化した。しかし、副作用は見られなかった。
9. Phase I 臨床試験終了 1 年後に被験者 18 例を調査した結果、すべての患者に副作用は見られず安全性を確認することができた。なお、いずれの患者も免疫促進剤および抗ウイルス剤を使用していない。
50%が HBV DNA 陰性であり、ALT については全例が正常値を示した。また、3 例は HBe 抗原陰性となった。
10. 1989 年にインドネシアのロンボク島で HBs 抗原陽性率は 13%であった。そのうち、10 歳以下の子供の中で HBs 抗原陽性率は 15%であった。2006 年に全体の HBs 抗原陽性率は 6.4%、10 歳以下の子供については 3.5%にまで減少した。2008 年に至っては全体の HBs 抗原陽性率は 3.7%にまで更に減少し、15 歳以下の子供においては 2.3%であった。一方、総人口に対する HBs 抗体陽性率はこの 20 年間で大きな変化は見られない (1989 年 36%、2006 年 43%、2008 年 30.7%)。HCV の陽性率は 2006 年で 1%、

2008 年で 0.8%であった。また、HEV 抗体の陽性率は 2008 年において 13%であった。

D. 考察

現在世界に 4 億人の慢性 B 型肝炎キャリアが存在するが、そのうち 7-8 割が亜細亜の開発途上国に集中している。B 型肝炎の予防及び治療に関するガイドラインは先進国によって示されているが、現在存在するガイドラインは開発途上国の社会・経済・医療制度の実態に適しているとは言えない。亜細亜開発途上国の B 型肝炎患者は貧困であることが多く、また国家としても医療保険制度が整備されていないため、このような実態を前提としていない先進国のガイドラインに従った治療を実施することは現実的ではない。

また、先進国のガイドラインで推奨されている B 型肝炎治療は抗ウイルス剤の投与と継続的な経過観察であるが、抗ウイルス剤が高価なものである点、開発途上国においては副作用に対する継続的な経過観察を実施するための条件が不十分である点なども、開発途上国での一様な治療の実施を困難にさせている。

本研究ではまずバングラデシュ現地慢性肝炎患者について、病因・特性・臨床的特徴・予後について調査を行い正確な実態を把握した。C 型肝炎患者及び E 型肝炎患者の調査に加え、開発途上国に無症候性 B 型肝炎キャリアや非活動性 B 型肝炎キャリアが多く存在することから、Occult HBV 及び肝癌について特に検討を行いその特性が明らかとなった。

また、昨年度同研究にてバングラデシュ国内で実施した B 型肝炎患者への Phase I 臨床治験 HBs/HBc 抗原複合ワクチン使用后 1 年の経過観察を行ったところ、治療を実施した全ての患者に結果は良好であり副作用も見られず、HBs/HBc 抗原複合ワクチンの安全性と効果の継続性を確認することができた。当該患者には 1 年間抗ウイルス剤も免疫促進剤も使用していないことは特筆すべき点である。

日本国内においては HBV 動物モデルとしてマウスを用いた基礎実験を実施し、新しい免疫治療ヒトへの実現化に向けて必要な分析と結果・情報の蓄積を行った。

今年度の現地実態調査、Phase I 臨床治験の結果、日本国内での基礎実験の結果を踏まえ、来年度は Phase II・III 臨床治験を実施し、開発途上国のウイルス性肝疾患に適した新規治療法と新ガイドラインの作成の早期確立を目指したいと考える。

E. 結論

開発途上国における独自の疫学的調査や病態の解明により、新ガイドラインを作成し新治療法を確立させることは、開発途上国に於ける B 型肝炎感染の拡大に歯止めをかけ、また B 型肝炎に罹患した患者の病気の進行を食い止めることにもつながる。更に、本研究のような前例がないだけに本研究を継続して実施していくことは将来開発途上国における他の肝炎ウイルスのための臨床研究や臨床治験の礎となることは必至であり意義があるものと考えている。

F. 健康危険情報

通報せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akbar SM. B型慢性肝炎に対する免疫療法；過去からの教訓と未来への挑戦. 治療学 2010; 44-50
- 2) Akbar SM, Yoshida O, Chen S, Aguilar AJ, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Immune modulator and antiviral potential of dendritic cells pulsed with both hepatitis B surface antigen and core antigen for treating chronic HBV infection. Antivir Ther 2010;15: 887-95
- 3) Yoshida O, Akbar SM, Chen S, Miyake T, Abe M, Hiasa Y, Murakami H, Onji M. Regulatory natural killer cells in murine liver and their immunosuppressive capacity. Liver Int 2010;30: 906-12
- 4) Miyake T, Akbar SM, Yoshida O, Chen S, Hiasa Y, Matsuura B, Abe M, Onji M. Impaired dendritic cell functions disrupt antigen-specific adaptive immune responses in mice with non alcoholic fatty liver disease. J Gastroenterol 2010;45:859-67
- 5) Al-Mahtab M, Rahman S, Akbar SM, Khan SI, Uddin H, Karim F, Ahmed F. Combination therapy with antiviral drugs and hepatitis B vaccine in incidentally-detected and asymptomatic chronic hepatitis B virus carriers at Bangladesh. Viral Immunol 2010;23:335-338
- 6) Al-Mahtab M, Rahman S, Akbar SM,

- Kamal M, Khan SI. Clinical use of liver biopsy for the diagnosis and management of inactive and asymptomatic hepatitis B virus carriers in Bangladesh. *J Med Virol* 2010;82:1350-1354
- 7) Al-Mahtab M, Rahman S, Akbar SM, Khan Si, Karim MF, Ahmed F. Combination therapy of lamivudine and interferon alpha in pediatric patients with chronic hepatitis B at Bangladesh: A safe and effective therapeutic approach for pediatric CHB patients of developing countries. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010;23:659-664
- 8) Akbar SM, Al-Mahtab M. Immune-mediated damages of the hepatocytes: mechanisms of destruction of hepatocytes and progression of liver diseases by non-cytopathic virus. *Bangladesh Liver Journal* 2010;1:26-29
- 9) Akbar SM, Al-Mahtab M, Khan SI. Rationality and designing immune therapy against chronic hepatitis B virus infection. *International Journal of Hepatology* 2010;1:49-50
2. 学会発表
- 1) ファズレ・アクバル、吉田理、阿部雅則、陳式儀、三宅映己、日浅陽一、恩地森一. 肝に局在するregulatory NK細胞の同定と機能解析 第24回肝類洞壁細胞研究会, 福島, 2010.
- 2) Akbar SM, Yoshida O, Chen S, Aguilar JC, Abe M, Hiasa Y, Onji M. A preclinical study to assess therapeutic and immune modulatory effects of antigen-specific immune therapy over non antigen-specific immune therapy for treating chronic hepatitis B virus infection. 61st Annual meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases, Boston, 2010
- 3) Akbar SM, Al-Mahtab M, Rahman S, Aguilar JC, Onji M, Mishiro S. Therapeutic potential of a novel therapeutic vaccine containing both hepatitis B surface antigen (HBsAg) and hepatitis B core antigen (HBcAg) administered through mucosal and parental route in patients with chronic hepatitis B. 61st Annual meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases, Boston, 2010
- 4) Akbar SM, Al-Mahtab M. Safety, efficacy and immunogenicity of a combination vaccine containing HBsAg and HBcAg through nasal and parental route in patients with chronic hepatitis B. 第21回The Meeting of the Liver and Immunology. Tokyo, 2010.
- 5) Akbar SM, Al-Mahtab M, Khan SI. Rationality and designing immune therapy against chronic hepatitis B virus infection. 9th Biannual Conference of Association for the Study of the Liver, Bangladesh, 2010
- 6) Mahtab MA, Akbar SM, Rahman S, Rubido JCA, Mishiro S. Safety, efficacy and immunogenicity of a therapeutic vaccine containing HBsAg and HBcAg by nasal route in patients with chronic hepatitis B. 45th Annual Meeting of the

European Association for the Study of the Liver. Vienna, 2010

- 7) Akbar SM, Al-Mahtab M, Rahman S, Aguilar JC, Onji M, Mishiro S. A therapeutic nasal vaccine containing both HBsAg and HBcAg was safe, had antiviral potential, and induced antigen-specific immunity in patients with chronic hepatitis B. 20th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Beijing, 2010
- 8) Chen S, Akbar SM, Michitaka K, Horiike N, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M. Mechanism of restoration of immune responses of chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy: Increased antigen processing and presentation by dendritic cells. 20th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Beijing, 2010

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究分担報告書

包括的遺伝子発現評価を用いたB, C型ウイルス肝炎に関する研究

研究分担者

金子 周一 金沢大学 教授

研究要旨：B型慢性肝炎、C型慢性肝炎、関連肝細胞がんにおける発現遺伝子、small RNAを包括的に解析し、慢性肝炎および肝細胞がんの病態と発現遺伝子との関連を明らかにした。インターフェロン治療を行ったC型慢性肝炎患者の肝臓では、治療前からインターフェロン誘導遺伝子の発現が高い群と、低い群に分けられた。治療前から発現の高い群ではインターフェロン治療による遺伝子の誘導が低く、低い群では逆に遺伝子の誘導が高かった。この関係はインターフェロン治療効果と相関しており、インターフェロン治療効果との関係が報告されているSNP IL28Bの変異とも関連していた。

A. 研究目的

アジアに蔓延するB型肝炎(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)感染症を制御する為、肝炎ウイルスおよび宿主が発現する遺伝子を包括的に解析し、その病態を発現遺伝子の観点から理解するとともに、診断、治療および予防の標的とする遺伝子および分子経路を明らかにする。

B. 研究方法

BおよびC型の慢性肝炎、肝硬変および関連する肝細胞がんを対象とする。培養細胞、実験動物系、ヒト臨床材料より核酸を抽出しreal time PCR, DNA chipを始めとする解析を行う。臨床情報と合わせ包括的に各種の情報を解析し、遺伝子の変化、ネットワークの変化と、病態との関連を解析する。

(倫理面の配慮)

関連する各種の倫理指針を遵守して実施した。研究は該当する委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

我々はB型およびC型慢性肝炎では、発現する遺伝子およびmicro-RNAが両者において大きく異なることを報告してきた。C型肝炎ではインターフェロンおよびインターフェロンによって誘導される遺伝子(ISG)の発現が高いことを示してきた。今回の研究ではインターフェロンとリバビリン療法を行った肝臓組織において治療前からISGの高い症例と低い症例があることを示した。インターフェロンを投与された際には投与前からISGが高い症例ではISGの

増加率が低く、投与前から ISG の低い症例では ISG の増加率が高いことが明らかとなった。また、治療前の ISG が低い症例はインターフェロン治療の奏効率が高く、ISG の誘導がウイルス排除と密接に関係していることが示された。さらに、投与前の ISG の発現とインターフェロン治療の効果に密接な関係があるとされる SNP IL28B との相関が示された。

D. 考察

B 型と C 型の慢性肝炎は肝細胞に感染する肝炎ウイルスに対する長年の炎症が持続することにより生じる。最終的には、肝硬変、そして肝細胞がんが引き起こされる。この間、同様な臨床像、病理所見を呈するものの、本研究ではそこにいたる病態が両者で異なっていること、変動する遺伝子が異なること、それと関連する micro-RNA の発現が異なることを明らかにした。さらに、本年の研究ではインターフェロン治療の効果と関連する遺伝子の変動が明らかとなった。IL28B との関係はさらに検討を必要とするが、この変異がウイルス排除に関与する機序のひとつとして ISG の誘導があることが示唆された。

E. 結論

肝炎ウイルス感染症の病態と包括的な発現遺伝子解析との関連を示した。両者は密接に関連しており、さらなる解析によって、診断、治療、予後と関連する標的遺伝子および経路の解明が可能であると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K Kakinoki, Y Nakamoto, T Kagaya, T Tsuchiyama, Y Sakai, T Nakahama, N Mukaida, S Kaneko. Prevention of intrahepatic metastasis of liver cancer by suicide gene therapy and chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. *J Gene Med* 2010;12(12):1002-1013.
- 2) S Kaneko, M Sata, T Ide, T Yamashita, S Hige, E Tomita, S Mochida, Y Yamashita, Y Inui, SR Kim, N Komada, T Mikami, S Satoh, S Morita, K Takaguchi, N Hirashima, Y Nishio, D Watanabe, K Kioka, K Fujiwara. Efficacy and safety of double filtration plasmapheresis in combination with interferon therapy for chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2010;40(11):1072-1081.
- 3) M Honda, M Nakamura, M Tateno, A Sakai, T Shimakami, T Shirasaki, T Yamashita, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, S Kaneko. Differential interferon signaling in liver lobule and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2010;53(5):817-826.
- 4) M Honda, Y Sakai, T Yamashita, T Yamashita, A Sakai, E Mizukoshi, Y Nakamoto, I Tatsumi, Y Miyazaki, H Tanno, S Kaneko; Hokuriku Liver Study Group. Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system

cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;400(1):7-15.

- 5) M Honda, A Sakai, T Yamashita, Y Nakamoto, E Mizukoshi, Y Sakai, T Yamashita, M Nakamura, T Shirasaki, K Horimoto, Y Tanaka, K Tokunaga, M Mizokami, S Kaneko; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in IL28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2010;139(2):499-509.
- 6) T Shirasaki, M Honda, H Mizuno, T Shimakami, H Okada, Y Sakai, S Murakami, T Wakita, S Kaneko. La Protein Required for Internal Ribosome Entry Site-Directed Translation Is a Potential Therapeutic Target for Hepatitis C Virus Replication. *J Infect Dis* 2010;202(1):75-85.
- 7) T Yamashita, M Honda, K Nio, Y Nakamoto, T Yamashita, H Takamura, T Tani, Y Zen, S Kaneko. Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res* 2010;70(11):4687-4697.
- 8) H Takatori, T Yamashita, M Honda, R Nishino, K Arai, T Yamashita, H Takamura, T Ohta, Y Zen, S Kaneko. dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2010;30(3):438-446.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, <u>Koike K.</u>	Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein	J Hepatol			2010 Sep 22. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21093950.
Watanabe S, Enomoto N, <u>Koike K.</u> , Izumi N, Takikawa H, Hashimoto E, Moriyasu F, Kumada H, Imawari M.	Prolonged treatment with pegylated interferon alpha 2b plus ribavirin improves sustained virological response in chronic hepatitis C genotype 1 patients with late response in a clinical real-life setting in Japan.	Hepatol Res	40	135-44	2010
Tejima K, Masuzaki R, Ikeda H, Yoshida H, Tateishi R, Sugioka Y, Kume Y, Okano T, Iwai T, Gotoh H, Katoh S, Suzuki A, Koike Y, Yatomi Y, Omata M, <u>Koike K.</u>	Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B with the same grade of liver stiffness and splenomegaly.	J Gastroenterol	45	876-84.	2010
Moriya K, Miyoshi H, Shinzawa S, Tsutsumi T, Fujie H, Goto K, Shintani Y, Yotsuyanagi H, <u>Koike K.</u>	Hepatitis C virus core protein compromises iron-induced activation of antioxidants in mice and HepG2 cells.	J Med Virol	82	776-92	2010
<u>Koike K.</u> , Tsutsumi T, Yotsuyanagi H, Moriya K.	Lipid metabolism and liver disease in hepatitis C viral infection.	Oncology	78 Suppl 1	24-30	2010

<u>Koike K</u> , Moriya K, Matsuura Y.	Animal models for hepatitis C and related liver disease.	Hepatol Res	40	69-82	2010
Kanamori H, Yuhashi K, Ohnishi S, <u>Koike K</u> , Kodama T.	RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus binds to its coding region RNA stem-loop structure, 5BSL3.2, and its negative strand.	J Gen Virol	91	1207-12.	2010
Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Yamakado M, <u>Koike K</u> , Nagai R.	Association between gamma-glutamyltransferase levels and insulin resistance according to alcohol consumption and number of cigarettes smoked.	J Atheroscler Thromb	17	476-85	2010
Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, <u>Koike K</u> , Wakita T, Suzuki T.	Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin.	Antiviral Res	85	520-4	2010
Okuse C, Yotsuyanagi H, Yamada N, Okamoto M, Ikeda H, Kobayashi M, Fukuda Y, Takahashi H, Nagase Y, Suzuki Y, Matsunaga K, Ishii T, Matsumoto N, <u>Koike K</u> , Suzuki M, and Itoh F	Effect of nucleoside analogues-interferon sequential therapy on patients with acute exacerbation of chronic hepatitis B.	Hepatol Res	40	461-469	2010
Isomura Y.Yutaka Y. Ohta M.Seto M.Asaoka Y.Tanaka Y.Sasaki T.Nakai Y.Sasahira N.Isayama H.Tada M.Yoshida H.Kawabe T. Omata M. <u>Koike K</u> .	A genetic polymorphism of CYP2C19 is associated with susceptibility to biliary tract cancer	J Gastroenterol	45	1045-1052.	2010

Mizuno S .Hirano K.Tada M . Yamamoto K.Yashima Y.Yagioka H. Kawakubo K.Ito Y.Kogure H. Sasaki T.Arizumi T.Togawa O . Matsubara S.Nakai Y.Sasahira N.Tsujino T.Isayama H.Kawabe T. Omata M . <u>Koike K</u>	Bezafibrate for the treatment of primary sclerosing cholangitis	J Gastroenterol	45	758-762	2010
Molina-JimÁLenez F.Benedicto I .Murata M.MartíÁLn-ViÁLlchez S. Seki T. Pintor-Toro J. Tortolero M. Moreno-Otero R. Okazaki K. <u>Koike K</u> . Barbero J.Matsuzaki K. Majano P and L ÁL opez-Cabrera M	Expression of pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1)/securin in hepatitis B virus-associated liver diseases: Evidence for a hepatitis B virus X protein-mediated inhibition of PTTG1 ubiquitination and degradation	Hepatology	51	777-787	2010
Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Murakami K, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, <u>Wakita T</u> , Suzuki T.	Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein.	Virology	410	38-47	2011
Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, <u>Wakita T</u> , Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T.	Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner.	J Virol.	84	11761-70.	2010
Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T,	Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms.	J Virol.	84	12048-57.	2010

Takaku H, <u>Wakita T</u> , Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K.					
Mishima K, Sakamoto N, Sekine-Osajima Y, Nakagawa M, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Kiyohashi K, Kitazume A, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, <u>Wakita T</u> , Watanabe M.	Cell culture and in vivo analyses of cytopathic hepatitis C virus mutants.	Virology.	405	361-9.	2010
Kushima Y, <u>Wakita T</u> , Hijikata M.	A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production.	J Virol.	84	9118-27.	2010
Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Kalliampakou KI, Mavromara P, Garcin D, Hugon J, Gatignol A, Akazawa D, <u>Wakita T</u> , Meurs EF.	Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation.	PLoS One.	5	e10575	2010
Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, <u>Wakita T</u> , Toyoda T.	RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells.	PLoS Pathog.	6	e1000885	2010
Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, <u>Wakita T</u> .	Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope.	Biochem Biophys Res Commun.	395	565-71.	2010

Masaki T, Suzuki R, Saeed M, Mori K, Matsuda M, Aizaki H, Ishii K, Maki N, Miyamura T, Matsuura Y, <u>Wakita T</u> , Suzuki T.	Production of infectious hepatitis C virus by using RNA polymerase I-mediated transcription.	J Virol.	84	5824-35.	2010
<u>Akbar SM</u>	B型慢性肝炎に対する免疫療法 ; 過去からの教訓と未来への挑戦	治療学	44	44-50	2010
<u>Akbar SM</u> , Yoshida O, Chen S, Aguilar AJ, Abe M, Matsuura B, Hiasa Y, Onji M	Immune modulator and antiviral potential of dendritic cells pulsed with both hepatitis B surface antigen and core antigen for treating chronic HBV infection.	Antivir Ther	15	887-95	2010
Yoshida O, <u>Akbar SM</u> , Chen S, Miyake T, Abe M, Hiasa Y, Murakami H, Onji M.	Regulatory natural killer cells in murine liver and their immunosuppressive capacity.	Liver Int	30	906-12.	2010
Miyake T, <u>Akbar SM</u> , Yoshida O, Chen S, Hiasa Y, Matsuura B, Abe M, Onji M.	Impaired dendritic cell functions disrupt antigen-specific adaptive immune responses in mice with non alcoholic fatty liver disease.	J Gastroenterol	45	859-67	2010
Al-Mahtab M, Rahman S, <u>Akbar SM</u> , Khan SI, Uddin H, Karim F, Ahmed F.	Combination therapy with antiviral drugs and hepatitis B vaccine in incidentally-detected and asymptomatic chronic hepatitis B virus carriers at Bangladesh	Viral Immunol	23	335-338	2010