

201030032A

**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**

**ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス側
因子の解明と治療応用**

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 榎本 信幸

平成23（2011）年3月

**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**

**ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス側
因子の解明と治療応用**

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 榎本 信幸

平成23（2011）年3月

目 次

I. 総括研究報告		
ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス側因子の解明と治療応用	榎本 信幸	----- 1
II. 分担研究報告		
1. 遺伝子発現プロファイルの解析によるC型慢性肝炎を背景にした肝細胞癌発癌機構の検討	藤井 秀樹	----- 14
2. NS2/3プロテアーゼ阻害剤開発基盤の構築と抗HCV剤開発における海洋生物抽出物ライブラリーの創薬ライブラリーとしての可能性	山下 篤哉	----- 24
3. 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	松本 武久	----- 34
4. ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス側因子の解明と治療応用	朝比奈靖浩	----- 37
5. 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	今村 道雄	----- 41
6. ウイルス性肝炎の病態における制御性免疫機構の解析	中本 安成	----- 45
7. HCV-1b及びそれ以外のgenotype症例におけるPEG-IFN/RBV治療応答性と相関するウイルス側因子と宿主側因子	堀田 博	----- 47
8. 培養細胞系を用いた薬剤耐性肝炎ウイルスの解析	鈴木 哲朗	----- 53
9. B型肝炎及びC型肝炎ウイルスの変異と病態、治療との関係	鈴木 文孝	----- 56
10. ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス側因子の解明と治療応用： インターフェロン治療抵抗性に関わる因子の解析	中川 美奈	----- 62
11. 治療抵抗性HCV感染のウイルス遺伝子変異測定法の開発と応用	加藤 直也	----- 65
12. HCVのインターフェロン・リバビリン抵抗性の分子機構に関する研究	加藤 宣之	----- 69
13. IL28B SNP、HCVコア変異と肝脂肪化に関する研究	横須賀 収	----- 76
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		----- 79
IV. 研究成果の刊行物・別刷		----- 105

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

研究報告書

ウイルス性肝炎の病態に応じたウイルス側因子の解明と治療応用

研究代表者 榎本信幸 山梨大学医学部第一内科 教授

研究要旨

●肝炎ウイルスに対する治療は近年急速な進歩を見せているが、核酸アナログ耐性 HBV の出現、インターフェロン・リバビリン抵抗性 HCV の存在が難治性ウイルス性肝炎克服の障害となっており、また難治症例は肝病変の進展から肝癌となるなど治療反応性・病態は多様である。これらは肝炎ウイルス遺伝子および宿主遺伝子の多様性を背景としており、病態に関連するウイルス側因子の解明は難治性ウイルス肝炎の制御に不可欠と考えられる。本研究では治療反応性、病態、発癌などに関わるウイルス遺伝子変異を解明し一般診療での活用のための標準化を目指すとともに、宿主因子、特に最近解明された IL28B 遺伝子多型などとの相互作用の解明により新規治療開発の基盤とすることを目標としている。

●治療抵抗性肝炎ウイルスの病態解明に関しては、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、IL28B 遺伝子とは独立に NS5A 遺伝子に ISDR および IRRDR という 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。この IL28B SNP は Peginterferon/Ribavirin 治療効果と強く関連するとともに、HCV コア変異や肝脂肪化との関連も示唆された。さらに IL28B 遺伝子の SNP と関連するウイルス遺伝子変異および宿主因子および自然免疫系遺伝子発現変化を明らかとした。C 型肝炎に対する新規の PEG-IFN /RBV /プロテアーゼ阻害剤の効果にも HCV 遺伝子(Core aa70)変異が関連することを解明した。HCV core70 変異など治療抵抗性 HCV の定量法を確立し、治療抵抗性 HCV の治療中・後の動態を明らかにした。HCV-2a 及び-2b の PEG-IFN/RBV の治療効果にも NS5A の特定領域 (IRRDR 及び ISDR) のアミノ酸配列の多様性と相関していることを確認した。一方、B 型肝炎に対する核酸アナログ使用による多剤耐性ウイルスの出現率とタイプを明らかにした。

●病変進展・発癌に関与するウイルス因子の解明と応用に関しては、HCV core 遺伝子変異が肝癌発症に関連する一方、IL28B 遺伝子変異は肝癌発症には関連しないことを見出した。肝癌に関連する宿主因子の解析として HCV 関連 HCC40 症例の凍結サンプルを用い、マイクロアレイによる遺伝子発現パターンでサブクラス分類し、これらの臨床学的特徴を分析した

●治療抵抗性・病変進展・発癌に関与するウイルス側因子を標的とした新規治療法の開発基盤確立に関しては NS5B と GBP-1 が相互作用を示し、NS5B が GBP-1 のもつ GTPase 活性を阻害すること、さらに NS5B 存在下では GBP-1 蛋白発現が抑制されることが確認され、これらの相互作用が IFN 抵抗性に関与している可能性を示した。Li23 由来の細胞システムで検出されたリバビリンの抗 HCV 活性は、イノシンーリン酸脱水素酵素の阻害により細胞内 GTP 濃度が下がることに起因していること、そして、その結果、イノシンーリン酸が蓄積されることを見出した。HCV 持続感染細胞を、HCV ポリメラーゼ阻害剤また NS4A 阻害剤存在下で長期間培養し NS4A 阻害剤に対する感染細胞の低感受性を観察した。また HCV レプリコン細胞および HCV 感染マウスを用いて、ME3738 が IFN による IFN 誘導遺伝子の発現を促進し、抗 HCV 効果を増強することを見いだした。HCV 感染マウスに NS3/4A プロテアーゼ阻害剤と NS5B ポリメラーゼ阻害剤を併用することにより、マウス血中および肝臓内 HCV が消失することを証明した。C 型慢性肝炎・肝癌患者の CD4(+)/CD25(high)/Foxp3(+)制御性 T 細胞 (Treg) が高い抑

制性サイトカイン産生能を示し、肝癌の進展(最大腫瘍径)と関与することを示した。NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系開発のための活性化型 NS2/3 プロテアーゼタンパク質の in vitro 大量合成に成功、NS2をコードした薬剤ハイスループットスクリーニング可能なHCVサブゲノムレプリコン細胞を樹立、Cell based NS2/3プロテアーゼ阻害剤のハイスループットスクリーニング系を樹立した。新たな創薬ライブラリーソースとして海洋生物抽出物を用いて、HCVの増殖を阻害する物質を同定した。

●肝炎ウイルス遺伝子情報を臨床応用するための遺伝子検査・解析法の標準化に関しては、次世代シーケンサーの導入により患者体内でのウイルス遺伝子変異動態を大規模かつ詳細に解析する手法を次年度以降導入する予定である。

A. 研究目的

● HBV および HCV による持続性感染は、無症状の慢性肝炎から高率に肝硬変、肝癌に進展し、日本においては年間 3 万人以上の死亡原因として大きな社会問題となっている。肝炎ウイルスに対する抗ウイルス治療は近年、長足の進歩を見せているが、HBV においては抗ウイルス薬の長期投与とそれによる新たな薬剤耐性ウイルスの出現、HCV においては治療抵抗性ウイルス感染が依然として多数存在することから、肝炎ウイルス持続感染を完全に制御して肝癌の発生を完全に抑制することは困難な状況にある。一方、ウイルス肝炎の自然経過および治療経過には大きな多様性が認められ、病態の進展が極めて緩徐な症例から、肝硬変・肝癌に進展する症例があるがこのような多様性の機序もほとんど解明されていない。肝炎ウイルスは遺伝子変異を高頻度に起こし、上記の治療反応性あるは病態の多様性は肝炎ウイルス遺伝子および宿主遺伝子の多様性を背景としており、ウイルス側因子の解明は難治性ウイルス肝炎の制御に不可欠と考えられる。

● したがって、本研究は以下の目的で実施する。

- (1) 治療抵抗性肝炎ウイルス感染の病態を肝炎ウイルス遺伝子変異から解析し診断・治療法を確立する。
- (2) ウイルス肝炎の多様な病態(病変進展、発癌)に関連する肝炎ウイルス遺伝子変異を明らかとして、宿主因子との相互作用を解明して診断・予防・治療に展開する。
- (3) 病態に関連する肝炎ウイルス遺伝子変異の機能を解明し新規治療法の開

発の基盤とする。

- (4) 肝炎ウイルス遺伝子情報を一般臨床に応用するために遺伝子検査・解析法の標準化を行う。

B.研究方法 C.結果 D.考察

(1)治療抵抗性肝炎ウイルスの病態解明と対策

主任研究者である榎本はハイスループットのHCVおよびHBVゲノムワイド解析システムを構築し、Peginterferon/Ribavirin併用療法を施行した多数症例でHCV全遺伝子配列を網羅的に決定し、HCV NS5A蛋白のISDR、IRRD Rさらにコア蛋白に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明らかとしてきた。本年度はこれらのウイルス遺伝子因子と宿主遺伝子因子、とくにinterferonに対する抵抗性に関与するIL28B SNPおよびribavirinによる貧血に関与するITPA SNPとの関連を検討した。

ウイルスゲノムおよびIL28B SNP解析を用いたHCV動態の検討(榎本)

【方法】(1) PEG-IFN/RBV 療法施行したGenotype1b 103 症例のIL28B TT(メジャー)群において全長HCV解析によりSVRに関連する領域を検討した。(2)IL28B SNP解析312症例におけるIL28B多型と臨床背景因子を検討した。(3)ウイルスゲノムとIL28B SNPの関連について85症例でHCV全長解析を行った。

【結果】(1) 治療開始後のウイルス動態とウイルス配列を検討すると、RVR には ISDR 領域内 NS5Aaa.2224-2248 内のアミノ酸変異数(p=0.0004)、non-EVR にはコア aa.70 多型が著明な相関を示した(p=7.0E-08)。一方、IL28B

TT群においてSVRと関連するウイルスゲノム領域を検索すると(n=59)、IRRDR とほぼ合致するNS5Aaa2340-2382 が抽出された(p=2.6E-06)。(2) IL28B SNP 解析症例 312 例全体でメジャー群 247 例、マイナー群 65 例と 8 割がメジャーであり、メジャー率はゲノタイプ 1 型(80%)、2 型(78%)同様であった。IL28B SNP 毎の治療開始時の臨床背景(年齢/性/ウイルス量/ALT/G-GTP/血小板/F 因子/AFP)を比較すると、G-GTP(p<0.0001)、AFP(p=0.05)、ウイルス量(p=0.08)に相関を認めた。(3) HCV 全長との関連において、コア aa.70 多型と IL28B SNP は顕著な関連を示した(p=9.1E-06)。

【考察】IL28BSNP とウイルス遺伝子は共に PEG-IFN/RBV 治療反応性に強く関連する因子であった。また、両因子の間には、特にコア遺伝子と IL28B SNP に顕著な関連性があることが HCV 全長解析により示された。一方、IL28B SNP とは独立して NS5A-IRRDR が治療効果を規定しているウイルス領域であることが明らかとなった。

ウイルス変異と宿主ゲノムからみたインターフェロン治療効果(榎本)

【方法】PEG-IFN/RBV (PEG-IFN/RBV) 療法 946 例、55.2±10.3 歳(17~80 歳)、M/F=527/419、1b/2a/2b/その他=637/166/116/27 と対象とし、HCV ウイルス変異(とくに ISDR、IRRDR、コアアミノ酸)と宿主の IL28B、貧血に関連する ITPA SNPs と治療成績の関係および肝硬度からみた発癌危険因子を検討した。

【結果】1) 1b/2a/2b 型の治療成績(SVR 率)は ITT 解析で 50%(212/423)、88%(102/116)、80%(61/76)であり、多変量解析による SVR 規定因子は F 因子≤1、IL28B TT、2a+2b(Odds 比 3.9、3.2、7.2)であった(p<0.001)。

2) 1b 型の標準治療期間(≤52W)では SVR を規定する因子は多変量解析の結果 IL28B SNP (rs8099917) T/T、ISDR 変異数≥1もしくは IRRDR 変異数≥4(Odds 比 14.0、11.8、20.0)であり(p<0.001)、ウイルス変異・宿主因子が独立に SVR を規定し、これ以外では SVR は期待できなかった。

3) 1b 型の LVR 例の多くは延長投与(72W)されたが SVR 規定因子は F 因子≤1、ITPA SNP AC+CC で、貧血による薬剤減量なく Adherence が維持できれば SVR が達成された。

4) 一方、Fibroscan による肝硬度の検討では、12.3KPa 以上では 66%(60/91)が発癌し

12.3KPa 未満では発癌したのは 3%(5/161)のみであった。(p<0.0001)。

【考察】C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/RBV 療法は、2a+2b 型、F 因子≤1、IL28B TT (major)では SVR が期待でき、1b 型でも ISDR や IRRDR に一定数の変異があれば標準治療期間(2a/2b では 24W)での SVR が期待でき、LVR 達成例では宿主難治要因はある程度克服できる可能性が示唆された。しかし、肝線維化進展例・肝高硬度化例では発癌リスクが高く早期の治療導入が必要と考えられた。したがって telaprevir を含めた治療法が 24 週間であること、高度の貧血の副作用があることを考慮し、ウイルス変異・宿主ゲノム変異を考慮し治療方針を決定することが好ましいと考えられた。

IL28B SNP、HCV コア変異と肝脂肪化に関する研究(横須賀)

【方法】PEG-IFN/RBV 併用治療を行った C 型慢性肝炎 1 型高ウイルス 101 例(男 55 例、平均年齢 55±11 歳)における肝脂肪化、IL28B SNP(rs8099917)などの宿主因子や HCV コア変異などのウイルス因子を評価し、治療効果との関連について検討した。

【結果】IL28B minor type は肝脂肪化、G-GTP 値、HCV コア変異と有意に関連していた。肝線維化、IL28B minor type は肝脂肪化と有意に関連し、IL28B major type は cEVR と関連する有意な因子であった。IL28B SNP は治療効果と強く関連するのみならず、HCV コア変異や脂質代謝との関連も示唆された。

【考察】インターフェロン治療効果に関係する宿主因子として同定された IL28B SNP が HCV コア遺伝子変異や脂質代謝異常とどのように関連しているのか、今後はその機序を明らかにする必要がある。IL28B SNP は治療効果と強く関連するのみならず、HCV コア変異や脂質代謝との関連も示唆された。

治療抵抗性 HCV 感染のウイルス遺伝子変異測定法の開発と応用(加藤直也)

【方法】治療抵抗性 C 型肝炎のウイルス側要因としてのコアタンパク第 70 番目アミノ酸変異の real-time PCR 法による高感度定量法を開発し、ペグインターフェロン、リバビリン併用療法を行った患者での野生型および変異型 C 型肝炎ウイルスの個別の dynamics を検討した。

【結果】変異型 C 型肝炎ウイルスは、初期の治療感受性は野生型同様であるが、排除されにく

い性質を有している可能性が示唆された。多くの C 型慢性肝炎患者では、コアタンパク第 70 番目アミノ酸の野生型と変異型が混在していることが明らかになった。治療前の変異型の比率が高いほど、ペグインターフェロン、リバビリン併用療法治療効果は低かった。野生型および変異型の C 型肝炎ウイルスは、ペグインターフェロン、リバビリン併用療法に対する初期の感受性は同等であったが、再燃例の解析から、変異型 C 型肝炎ウイルスは、野生型に比し、排除されにくいと考えられた。治療抵抗性の機序を検討中であるが、インターフェロンシグナル伝達、アポトーシスに及ぼす影響に違いは認められていない。

【考察】変異型コアタンパクを有する C 型肝炎ウイルスのペグインターフェロン、リバビリン併用療法への耐性機序を明らかにするため、今後、この機能解析をより進める必要があると考えられた。コアタンパク野生型と変異型 C 型肝炎ウイルスのペグインターフェロン、リバビリン併用療法における動態を明らかにし、変異型 C 型肝炎ウイルスが治療により排除されにくい可能性を示した。

B 型肝炎及び C 型肝炎ウイルスの変異と病態、治療との関係(鈴木文孝)

【方法】C 型慢性肝炎症例 (genotype 1b、高ウイルス量) に対する NS3-4A protease inhibitor である Telaprevir(MP-424)と Pegylated Interferon (PEG-IFN)と Ribavirin (RBV)併用療法の治療効果予測因子を検討した。さらに前回治療 (PEG-IFN+RBV) 無効群における Telaprevir+PEG-IFN+RBV の 3 者併用療法施行例について臨床的、ウイルス学的検討を行った。また B 型慢性肝疾患に使用されている核酸アナログ製剤の長期投与では、多剤耐性ウイルスの出現が問題となっている。現在までの耐性ウイルスの頻度とその後の治療効果について検討した。

【結果】C 型肝炎 ; Telaprevir+PEG-IFN+RBV (24 週間) 治療の SVR 率は、naïve 例 76%、前治療再燃例 90%、前治療無効例 27%であった。効果に関係する因子として、IL28B の遺伝子多型 (SNP)と HCV Core aa70 番の置換が重要であった。また投与初期の Hb 値に関しては、ITPA gene の SNP が関係した。前回治療無効群における Telaprevir+PEG-IFN+RBV の 3 者併用療法では、15 例中 SVR は 4 例であった。SVR 群の特徴は、男性が多く、HCV Core aa70 は全例 wild

type、PEG-IFN と Telaprevir の adherence は全例 100%であった。治療開始時の NS3 領域の遺伝子配列を検討すると、relapser 例の 1 例で T54S の変異を認めた。さらに投与中の NS3 領域の遺伝子変異について検討したところ、relapser 9 例中 7 例、NVR 2 例中 2 例で Telaprevir 耐性ウイルスが検出された。B 型肝炎 ; ラミブジン単独投与中の症例でポリメラーゼ領域の YMDD motif mutation が疑われた症例において YMDD motif 以外の rt 領域のアミノ酸変異を検討した。390 例中 13 例(3%)に YMDD motif 以外でアデフォビルまたはエンテカビル耐性ウイルスの出現を認めた。これら 13 例のうち 8 例でラミブジンとアデフォビルの併用療法を施行した。8 例中 4 例で DNA の再上昇が見られた。またラミブジンとアデフォビル併用療法を施行した 316 例中 9 例(3%)に両剤に対する耐性ウイルスが併用療法後に認められた。これらの多剤耐性ウイルス検出例でその後エンテカビルまたはエンテカビル+アデフォビルを使用した 3 例ではエンテカビル耐性ウイルスが検出された。一方テノフォビルを使用した症例ではウイルスの陰性化が持続している。

【考察】C 型肝炎では、治療効果や副作用を考慮したテーラーメイド医療が必要である。また B 型慢性肝疾患に対する核酸アナログ製剤の長期投与では、多剤耐性ウイルスが出現する症例があり、新規治療薬の効果が期待される。

HCV-1b 及びそれ以外の genotype 症例における PEG-IFN/RBV 治療応答性と相関するウイルス側因子と宿主側因子(堀田)

【方法】HCV-1b 及びそれ以外のサブタイプ、とくに HCV-2a や HCV-2b について、Peg-IFN/RBV 治療応答性を規定するウイルス側因子及び宿主側因子について比較検討した。

【結果】HCV-1b において、IL28B の SNP が T/T (IL28B-Major) かつ IRRDR の変異数が 6 以上 (IRRDR \geq 6) の場合は sustained virological response (SVR)、IL28B-Major かつ IRRDR \leq 5 の場合は Relapse、IL28B SNP が T/G または G/G (IL28B-Minor) かつ IRRDR \leq 5 の場合は Null-response になりやすいことが明らかになった。HCV-2a では IRRDR[2a] \geq 4 が SVR と有意な相関を示したが、HCV-2b では SVR と有意な相関を示すウイルス側因子は抽出されなかった。

【考察】HCV-2a や HCV-2b における IL28B SNP の意義については今後さらに検討する必要があると考えられた。

(2)病変進展・発癌に関与するウイルス因子の 解明と応用

肝病変の進展・発癌に関与するウイルス因子および宿主因子を解明するためウイルスゲノム解析および病変肝のマイクロアレイ解析を行った。今後は両者を統合した解析を進める予定である。

長期経過観察症例および肝癌症例について HCV の全ゲノム変異を経時的および横断的解 析(榎本)

【方法】(1)長期経過観察が可能であった genotype 1b インターフェロン無効症例 43 例 (HCC 群 20 例、非 HCC 群 23 例)を対象とし、各症例 2 時点の HCV 全アミノ酸配列を決定、経時変化を検討した。(2)検証群 232 症例 (HCC 群 65 例、非 HCC 群 167 例)を用いて core と NS5A 領域の配列を検討した。(3)長期経過観察が可能であった 98 例についてコア領域の経時変化を検討した。(4)また 228 例については IL28B SNP を検討した。

【結果】(1)HCC 群と非 HCC 群の経時変化(平均観察期間 HCC 群 10.9 年、非 HCC 群 11.1 年)を全長で比較すると、HCC 群では最も高率に変化していたのは、core aa 70 と NS5A-ISDR aa 2220 を含む 3 アミノ酸であった。(2)新たな 230 例における検討において、core aa 70Q/H は 70R に比して HCC 群で有意に高率であった (Q/H:R, HCC 群 43:22 vs.非 HCC 群 66:99, $p=0.001$)。また、慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと病期が進行するにつれて core aa Q/H は R に比較して高率となった。(3)core aa 70 の経時変化別に背景因子を比較すると、R70Q 群では Q70Q 群と同様に経時的に PLT、Alb 値で有意に低下を認めたのに対し、Q70R 群では R70R 群と同様に経時的に肝病態の悪化は認めなかった。(4)IL28B SNP の解析を行った 228 例の検討では IL28B SNP と core aa 70 の関連では Q/H:R 率が TG/TT 群で有意に高率($p<0.001$)であったが、IL28B SNP と肝発癌率の関連は明らかではなかった。

【考察】肝発癌には、HCV core aa 70 変異が関与しており、IL28B SNP によって誘導されている可能性が考えられた。この core aa 70 変異のメカニズムは肝発癌の機序の解明に最も重要な点であると予想され、次年度以降次世代シーケンサーを用いて詳細に検討する必要があると考えられた。

遺伝子発現プロファイルの解析による C 型慢性 肝炎を背景にした肝細胞癌発癌機構の検討 (藤井)

【方法】これまで複数のグループが癌部の遺伝子発現パターンによる HCC のサブクラス分類を報告してきた。HCV 関連 HCC は炎症や酸化ストレスなど非癌部の因子も発癌に重要な役割を果たしていることを踏まえ、今回我々はこれらのサブクラスに相当する症例の非癌部で特徴的に発現している遺伝子の解析を行った。

【結果】異常な細胞増殖を来すタイプの HCC の非癌部では炎症や線維化といった因子が、 β -カテニンの変異を来すタイプの HCC の非癌部ではアポトーシス関連の因子が関連している可能性が示唆された。

【考察】これらの結果を裏付けるため、さらなる検討が必要であると考えられた。

(3)治療抵抗性・病変進展・発癌に関与するウ イルス側因子を標的とした新規治療法の開発基 盤確立:

インターフェロン、リバビリン、プロテアーゼ阻害剤、MTP 阻害剤などに対する HCV の抵抗性の成立機序を培養系、モデル動物、臨床検体を用いて解析した。発癌に関与する免疫学的異常の検討を行った。また、新規の抗 HCV 薬として NS2/3 プロテアーゼを標的とした阻害剤探索の基礎的研究を進めた。

インターフェロン治療抵抗性に関わる因子の解 析(中川)

【方法】インターフェロン(IFN)治療抵抗性に関わる因子の解析を目的として、申請者らが独自に開発した HCV コア蛋白変異株培養系を用いた IFN シグナル系におけるサイトカイン抑制機構の解析を行った。

【結果】1) HCV コア蛋白変異株ではウイルス細胞内の RNA および蛋白合成は野生株と比較し同等もしくは亢進していた。2) HCV コア蛋白変異株ではウイルス複製は保たれているものの、粒子形成および分泌低下を認めた。3) HCV コア蛋白変異株では小胞体(ER)ストレス蛋白の発現誘導をみた。4)IFN 治療抵抗株では IFN シグナル系の抑制因子である SOCS3 の発現亢進および IFN 誘導遺伝子(ISG)発現低下をみた。5)IFN 治療抵抗株では SOCS3 産生に関与する IL-6 発現も亢進しており、臨床検体でも治療抵抗症例で IL-6 持続高値であることが確認され

た。

【考察】IFN 抵抗性には多機能サイトカインである IL-6 や ER ストレスの関与が示唆された。IL-6 は肝発癌への関与も報告されており、さらに詳細な解析により治療抵抗性症例や発癌リスクの高い症例に対する新規治療法につながる知見を得る可能性が期待される。

IL28B 遺伝子近傍の SNP と宿主自然免疫系遺伝子発現および治療効果の関連(朝比奈)

【方法】IL28B 遺伝子近傍の SNP と宿主自然免疫系遺伝子発現および PEG-IFN/RBV 併用療法の治療効果の関連について検討した。

【結果】PEG-IFN/RBV 併用療法における NVR に、IL28B minor type および RIG-I などの自然免疫系遺伝子や IFN 誘導遺伝子の治療前の肝内高発現が関与していた。また、IL28B 近傍の SNP が minor allele の症例では、これらの遺伝子の高発現を認め NVR に関連していた。一方、同一の IL28B genotype でも NVR の症例では、自然免疫系遺伝子や IFN 誘導遺伝子の治療前の肝内発現が高かった。

【考察】IL28B 近傍の SNP と宿主自然免疫は共に治療抵抗性に関連しており、難治例における新規抗ウイルス療法の治療効果およびその抗ウイルス機構に重要な役割を担っていると考えられた。

HCV のインターフェロン・リバビリン抵抗性の分子機構に関する研究(加藤宣之)

【方法】C 型肝炎ウイルス(HCV)がインターフェロン(IFN)やリバビリン(RBV)に抵抗性を示す分子機構を解明することを目的とした。従来の HCV 研究に多用されてきたヒト肝癌細胞株 HuH-7 とは異なるヒト肝癌細胞株 Li23 を用いて開発した遺伝子型 1b で O 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞(OL8、OL11 および ORL8 細胞など)を用いて検討した。

【結果】(1)全長 HCVRNA 複製細胞(OL8 細胞株などの樹立時と2年間継代培養後)から IFN- α に抵抗性を示す細胞株を得た。(2)RBV の抗 HCV 活性を測定できる Li23 由来の ORL8 細胞(HuH-7 由来の OR6 細胞では RBV は抗 HCV 活性を示さない)において RBV の添加により細胞内の GTP 量が顕著に低下し、IMP の蓄積が起こることを明らかにした。(3)2年間継代培養した OL8 や OL11 細胞から RBV に抵抗性を示す細胞株を得た。

【考察】ORL8 細胞において見出された RBV の

顕著な抗 HCV 活性は、IMPDH の阻害によるものであると考えていたので、今回、RBV を添加した ORL8 細胞において細胞内の GTP のレベルが OR6 細胞の場合と比べて顕著に低下することを確認できたことは、我々の考えを支持するものであると思われる。予想外に IMP が蓄積してくることが分かったので、今後は、IMP の蓄積が HCV の複製にどのような影響を及ぼすかについても検討する必要がある。

培養細胞系を用いた薬剤耐性肝炎ウイルスの解析(鈴木哲朗)

【方法】新規 C 型肝炎治療薬として開発が進められている C 型肝炎ウイルス(HCV)酵素阻害剤また宿主因子を標的とした抗 HCV 化合物に対する耐性ウイルス出現の可能性を HCV 感染増殖細胞系を用いて検討した。今年度は、HCV NS4A アンタゴニストで NS3-4A プロテアーゼ活性を阻害する ACH806 また MTP 阻害剤で HCV 粒子産生を抑制する BMS-201038 について、それぞれ長期間添加による耐性ウイルス出現の可能性を検討した。

【結果】本実験条件下ではいずれも耐性 HCV は観察されなかった。BMS-201038 は、持続感染細胞への3ヶ月間処理により検出限界以下まで HCV 産生が低下した。

【考察】ACH806 は、米国ベンチャー企業が開発した NS4A アンタゴニストで、NS3-4A プロテアーゼの活性を抑え、HCV 複製を阻害する。サブゲノムレプリコンを用いた実験から、ACH806 耐性レプリコン RNA の出現が報告されている。今回、HCV JFH-1 株の感染細胞系で同薬剤の抗 HCV 作用が示された。本実験系での EC50 は 500 nM 程度と推定された。これまで報告されている耐性レプリコンは遺伝子型 1b 由来であることから、遺伝子型 2a の HCV に対しては耐性ウイルスが出現しにくい可能性も考えられる。MTP は、カイロミクロンに中性脂肪を運搬する蛋白でカイロミクロン、VLDL(超低密度リポ蛋白)の産生に重要な蛋白である。最近の研究から HCV の産生に VLDL の産生、分泌系が関与することが知られ、実際に MTP 阻害剤による HCV 粒子産生阻害作用が報告されている。本研究では、それが確認されただけでなく、MTP 阻害剤の一種、BMS-201038 を長期間処理することによって、ウイルス産生をほぼ完全に消失させることが可能であることが初めて示された。抗ウイルス剤の開発研究においては、ウイルス蛋白を標的とする薬剤より、宿主因子を標

的とする薬剤の方が耐性ウイルスが出現しにくい、という考え方がある。今回の BMS-201038 の成績はそれを裏付ける結果といえるかもしれない。

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCVのCoreおよびISDR変異あるいは宿主のIL28B遺伝子多型が、ウイルスの感染、増殖およびIFN感受性に及ぼす影響(今村)

【方法】ヒト肝細胞キメラマウスを用いて、HCVのCoreおよびISDR変異あるいは宿主のIL28B遺伝子多型が、ウイルスの感染、増殖およびIFN感受性に及ぼす影響を検討した。Core領域の70および91番が野生型(Core-Wild)、変異型(Core-Mutant)あるいはISDRに変異を0, 4, 9カ所挿入したHCV全長クローンを作製し、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に投与した。

【結果】Core変異の有無は、感染成立率、血中HCV RNA量、IFN投与による血中HCV RNAの低下量に影響はなかったが、ISDRの変異は感染成立率、血中HCV RNA量を明らかに低下させた。またIL28B遺伝子(rs8099917)がTTの肝細胞を移植したマウスとTGの肝細胞を移植マウスでは、感染の成立率は同程度であったが、前者のマウスでは後者のマウスに比べ、血中HCV RNA量が有意に高値であり、IFN- α 投与による肝臓内ISGs発現量が有意に高く、血中HCV RNA低下量も有意に高かった。

【考察】HCVのCoreの変異はウイルスの感染、増殖、IFN感受性には影響が無いのに対し、ISDR変異は感染および増殖能を低下させるものと考えられ、またrs8099917 TTの症例は、IFN投与による肝臓内ISGs発現量が高く、IFN治療効果が高いことが示唆された。

NS2/3プロテアーゼを標的としたHCV治療の開発(松本)

【方法】HCV NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤に続く新たなC型肝炎治療薬の標的分子をNS2/3プロテアーゼとした阻害剤探索に必要な細胞ベースでの阻害剤スクリーニング系の構築を実施し、スクリーニング系に使用できる細胞を樹立した。

【結果】HCV NS2の膜貫通ドメインをN端に有する全長NS2/3プロテアーゼタンパク質のフォールディングと酵素活性化を細胞内環境において実現させるように、レポーター遺伝子としてGAL4を上流にもつホタルルシフェラーゼタン

パク質と、CMVプロモーターの下流にNS2/3プロテアーゼ、NS3/4Aプロテアーゼおよび核内移行シグナルを付けVP-16/GAL4転写因子DNA結合ドメインが連結する融合タンパク質の両方を経常的に発現するコンストラクトを作成し、その遺伝子を組み込んだ細胞に化合物を投与した後の光学的変化を測定することにより、インシリコスクリーニングで探索された活性候補低分子化合物のスクリーニングを実施した。GAL4を上流にもつレポーター遺伝子としてのホタルルシフェラーゼタンパク質をコードする遺伝子と、CMVプロモーターの下流にNS2/3プロテアーゼ、NS3/4Aプロテアーゼおよび核内移行シグナルを付けたVP-16/GAL4転写因子DNA結合ドメインが連結する融合タンパク質の両方を経常的に発現するコンストラクトを作成した。上記の両遺伝子を浮遊性培養細胞株HeLa S3に導入し、薬剤選択することで20クローンの薬剤耐性株を得た。これらのクローン細胞のルシフェラーゼ活性を測定したところ、クローンNo. 2, 4, 6, 12および24で非常に高いルシフェラーゼ活性を観測できた。さらにNS3/4Aプロテアーゼ阻害剤であるVX-950 (telaprevir) 5 μ M濃度(一昼夜投与)に対するこれらのクローン細胞の感受性を測定した結果、クローンNo.4および6でルシフェラーゼ活性の有意な低下を観測した。

【考察】少なくともクローンNo.6の細胞のルシフェラーゼ活性は、NS3/4Aプロテアーゼ阻害剤であるVX-950に対して、濃度依存性に阻害されること、またNS2/3プロテアーゼによりN端のNS2から切り離され、C端のNS4A以降のペプチドを自らのプロテアーゼ活性で切り離したNS3が免疫沈降で検出されたことから、クローンNo.6の細胞内ではNS2/3プロテアーゼ、NS3/4Aプロテアーゼおよび核内移行シグナルを付けたVP-16/GAL4転写因子DNA結合ドメインが連結する融合タンパク質のプロセッシングが正常に行われており、本細胞はわれわれが計画するNS2/3プロテアーゼ阻害剤探索に使用できると考えられる。

NS2/3プロテアーゼ阻害剤開発基盤の構築と抗HCV剤開発における海洋生物抽出物ライブラリーの創薬ライブラリーとしての可能性(山下)

【方法】NS2/3プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系としてNS2領域を含んだサブゲノムレプリコン細胞の樹立、Cell based NS2/3プロテアーゼ活性測定系を構築を行った。NS3 Helicaseを

ターゲットタンパクとし、海洋生物ライブラリーより活性阻害物質の検索を行った。

【結果】NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング用のサブゲノムレプリコン細胞の樹立に成功した。この細胞を使って薬剤評価が可能かどうかについて、これまでに NS2タンパクの活性阻害剤として報告のある Cyclosporin A および HSP90 阻害剤である 17-AAG を用いて、NS3～NS5B までをコードしたサブゲノムレプリコンと比較・検討を行った。その結果、2つのレプリコン細胞の間に、これら薬剤の HCV の増殖抑制効果の差は見られなかった。海洋生物抽出物ライブラリーより NS3 Helicase および HCV 増殖阻害活性を有する物質を同定した。

【考察】樹立したレプリコン細胞や Cell based NS2/3 プロテアーゼ活性測定系を用いて、In silico screening によりヒットした NS2/3 抑制化合物について、その抑制活性を評価することを計画している。抗HCV剤創薬ライブラリーソースとして、海洋生物が有用なライブラリーソースとなる可能性があることが示唆された。今後は、この精製化合物の抑制メカニズムについて、更に、詳細な解析を検討していく予定である。

ウイルス性肝炎の病態における制御性免疫機構の解析(中本)

【方法】CD4陽性Tリンパ球分画の一部(CD25陽性)は、最近になって免疫反応を抑制する制御性Tリンパ球(regulatory T cell; Treg)として注目されており、慢性肝炎の病態への関与について検討した。

【結果】肝がん患者末梢血中のCD4(+)/CD25(high)/Foxp3(+)制御性 T リンパ球は、非がん患者に比較して増加しており、高い抑制性サイトカイン産生能を示した。なかでもCD45RO 陽性を示す活性化/メモリーTリンパ球サブセットが増加していることが示された。さらに、このサブセットは腫瘍の進展と関連しており、抑制性樹状細胞の頻度との関連がみられた。

【考察】肝がん患者において、制御性 T リンパ球のサブセットが体内環境の構築の中で抗腫瘍免疫の抑制に作用している可能性が示唆された。

(4)肝炎ウイルス遺伝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:

本研究で得られた肝炎ウイルス遺伝子情報(H22)を臨床応用し広く患者診療の向上に役立つ

るために、試薬、検査機器、プロトコルを標準化(H23-24)し、遺伝子情報・機能情報・臨床情報を統合したデータベースを作成し(H23-24)、診療上の有用性を示すエビデンスを集積して一般臨床導入への基盤を確立する。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行においては各研究施設において必要な申請を行い各種倫理規定を遵守している。

E. 結論

本年度の検討により、C型肝炎に対するPeginterferon/Ribavirin治療、さらにはProtease阻害剤治療はウイルス因子である遺伝子型、NS5A遺伝子変異(ISDR, IRRDR)、core遺伝子変異、宿主因子であるIL28BおよびITPA SNPsにより規定されていることが明らかとなった。これらの相互関係の機序の解明を進める予定である。さらに肝病変進展、発癌にもcore遺伝子変異が関与することが明らかとなり、今後これらの動態および機能解析を進める必要があると考えられた。種々のウイルス因子および宿主因子を標的とする阻害剤に対する抵抗性機序の解明、治療抵抗性および病変進展における免疫系の影響についてもウイルス因子との関連を軸として臨床検体、培養細胞系、モデル動物系で検討することが重要と考えられた。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

1) Kurosaki M, Sakamoto N, Iwasaki M, Sakamoto M, Suzuki Y, Hiramatsu N, Sugauchi F, Yatsushashi H, Izumi N. Pretreatment prediction of response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 chronic hepatitis C using data mining analysis.

J Gastroenterol. 2011 Mar;46(3):401-9. Epub 2010 Sep 10.

2) Nishimura-Sasaki Y, Sakamoto N, Mogushi K, Satoshi N, Nakagawa M, Itsui Y, Tasaka-Fujita M, Onuki-Karakama Y, Suda G, Mishima K, Yamamoto M, Ueyama M, Funaoka Y, Watanabe T, Azuma S, Sekine-Osajima Y, Kakinuma S, Tsuchiya K, Enomoto N, Tanaka H,

Watanabe M.

Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells with or without HCV replicon and in replicon-cured cells.

J Gastroenterol. 45: 523-536, 2010

3) Nakagawa M, Sakamoto N, Ueyama M, Mogushi K, Nagaie S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M.

Mutations in the interferon sensitivity determining region and virological response to combination therapy with pegylated-interferon alpha 2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b interferon.

J Gastroenterol. 45: 656-665, 2010

4) 坂本 穰, 榎本信幸.

ウイルス遺伝子から見たC型肝炎治療

Vita 27(2): 32-38, 2010

5) 坂本 穰, 榎本信幸.

遺伝子変異とAdherenceからみたpeg-IFN+RBV療法無効例の対策

消化器内科 50(6): 575-580, 2010

6) 坂本 穰, 榎本信幸.

【シリーズ:検査法の理解と活用】肝臓領域における検査法の進歩と臨床応用

日本内科学会雑誌 99(8): 1959-1964, 2010

7) 榎本信幸. 特集 ウイルス肝炎の病態解明と治療の進歩 序論.

最新医学 65(9); 1831-1832, 2010.9

8) 榎本信幸. 特集 ウイルス肝炎の病態解明と治療の進歩 アプローチ.

最新医学 65(9); 1833-1838, 2010.9

9) 坂本 穰, 榎本信幸. 特集 ウイルス肝炎の病態解明と治療の進歩 HCVゲノム解析から見た治療方針.

最新医学 65(9); 1892-1900, 2010.9

10) 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. アルコール性肝障害 第4章 アルコール性肝障害の診断と治療. ウイルス性肝炎へのアルコール影響の影響.

最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 62 133-140, 2010

11) 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 特集Ⅱ C型肝炎ウイルスの感染・増殖メカニズムと臨床応用 HCV 全アミノ酸解析を用いたPEG-IFN/RBV 併用療法反応性の検討.

消化器内科 51(6): 642-651, 2010

12) 坂本 穰, 榎本信幸. ウイルス遺伝子から

見たC型肝炎治療.

Vita 27(2):32-37,2010

2.学会発表

1) 辰巳明久, 北村敬利, 岩本史光, 高橋英, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. ARFI(Acoustic Radiation Force Impulse)法を用いた肝硬度測定による非侵襲的肝線維化評価. 第96回日本消化器病学会総会(新潟) 2010.4.23

2) 前川伸哉, 三浦美香, 門倉 信, 末木良太, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 金山明日香, 大森高子, 雨宮史武, 進藤邦明, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. ウイルスゲノム解析によるC型肝炎病態および薬剤感受性の解析. 第96回日本消化器病学会総会(新潟) 2010.4.23

3) 坂本 穰, 進藤邦明, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. C型慢性肝炎の診療ガイドラインの検証と個別化医療の可能性. 第96回日本消化器病学会総会(新潟) 2010.4.24

4) Shindo H, Maekawa S, Komase K, Kadokura M, Sueki R, Amemiya F, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Characterization of protease inhibitor resistance mutations in untreated patients infected with genotype 1b HCV. EASL(45th Annual meeting of the European association for the study of the liver)WIEN, 2010.4.15

5) Maekawa S, Sueki R, Kanayama A, Miura M, Kadokura M, Komase K, Shindo H, Omori T, Amemiya F, Kitamura T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of the response to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. EASL(45th Annual meeting of the European association for the study of the liver)WIEN, 2010.4.16

6) 三浦美香, 前川伸哉, 門倉 信, 末木良太, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. HCVゲノム解析による肝発癌に関連するC型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 第20回抗ウイルス療法研究会 2010.5.20 熊本

- 7) 坂本 穰, 前川伸哉, 進藤浩子, 三浦美香, 門倉 信, 進藤邦明, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 岡田俊一, 榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた C 型慢性肝炎に対するインターフェロン治療効果予測. 第 20 回抗ウイルス療法研究会 2010.5.20 熊本
- 8) 進藤浩子, 前川伸哉, 小馬瀬一樹, 末木良太, 門倉 信, 三浦美香, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 金子周一, 泉 並木, 榎本信幸. HCV プロテアーゼ阻害剤未投与例における HCV-NS3 領域変異の検索と PEG-IFN/RBV 治療効果の検討. 第 20 回抗ウイルス療法研究会 2010.5.20 熊本
- 9) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノムからみたインターフェロン治療効果と個別化医療の可能性. 第 46 回日本肝臓学会総会(シンポ) 2010.5.27 山形
- 10) 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. HCV 全アミノ酸解析を用いた PEG-IFN/RBV 併用治療反応性の包括的検討. 第 46 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2010.5.27 山形
- 11) 小松信俊, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. 早期肝細胞癌診断における Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 検査の有用性. 第 46 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2010.5.27 山形
- 12) 進藤浩子, 前川伸哉, 小馬瀬一樹, 末木良太, 門倉 信, 三浦美香, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸, 朝比奈靖浩, 泉 並木, 中本安成, 本多政夫, 金子周一. HCV プロテアーゼ阻害剤未投与例における HCV-NS3 領域変異の検索と PEG-IFN/RBV 治療効果の検討. 第 46 回日本肝臓学会総会 2010.5.27 山形
- 13) 佐藤光明, 土谷 薫, 朝比奈靖浩, 玉城信治, 田中智大, 平山慈子, 安井 豊, 細川貴範, 上田 研, 葛谷貞二, 中西裕之, 板倉 潤, 黒崎雅之, 泉 並木, 北村敬利, 榎本信幸. 肝細胞診断、治療における Gd-EOB-DTPA 造影 MRI の臨床的有用性. 第 46 回日本肝臓学会総会 2010.5.27 山形
- 14) 末木良太, 前川伸哉, 門倉 信, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 三浦美香, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. ラミブジン耐性を規定する HCV ゲノム領域の検討. 第 46 回日本肝臓学会総会 2010.5.28 山形
- 15) 門倉 信, 前川伸哉, 末木良太, 三浦美香, 雨宮史武, 北村敬利, 植竹智義, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸, 中川美奈, 坂本直哉. ゲノム全解析による Genotype 2 型 HCV における治療効果規定の検索. 第 46 回日本肝臓学会総会 2010.5.28 山形
- 16) 小馬瀬一樹, 前川伸哉, 進藤浩子, 門倉信, 末木良太, 三浦美香, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. HCV genotype 1b に対する PEG-IFN+ribavirin 併用療法における cytokine 発現の網羅的解析. 第 46 回日本肝臓学会総会 2010.5.28 山形
- 17) 三浦美香, 前川伸哉, 進藤浩子, 小馬瀬一樹, 末木良太, 門倉 信, 雨宮史武, 北村敬利, 植竹智義, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. HCV ゲノム解析による肝発癌に関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 第 46 回日本肝臓学会総会 2010.5.28 山形
- 18) 雨宮史武, 進藤浩子, 前川伸哉, 金山明日香, 進藤邦明, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. IFN- γ による HCV 増殖抑制効果. 第 46 回日本肝臓学会総会 2010.5.28 山形
- 19) 辰巳明久, 北村敬利, 岩本史光, 高橋英, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. 非浸襲的肝繊維化の評価: ARFI(Acoustic Radiation Force Impulse). 第 46 回日本肝臓学会総会 2010.5.28 山形
- 20) 川上 智, 井上泰輔, 津久井雄也, 小松信俊, 雨宮史武, 中山康弘, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 免疫抑制・化学療法により、再活性化した B 型肝炎の 4 例. 第 46 回日本消化器病学会甲信越支部例会 2010.6.12 甲府
- 21) 浅川幸子, 雨宮史武, 川上 智, 佐藤光明, 小松信俊, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. アルコール性肝障害として経過観察中に発症した急性 E 型肝炎の一例. 第 46 回日本消化器病学会甲信越支部例会 2010.6.12 甲府
- 22) 村岡 優, 小松信俊, 川上 智, 佐藤光明,

- 浅川幸子, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. EOB-MRI の肝細胞相で低信号を呈した肝過形成結節に 1 例. 第 46 回日本消化器病学会甲信越支部例会 2010.6.12 甲府
- 23) 佐藤光明, 中山康弘, 北村敬利, 山崎貴弘, 橋本章吾, 川上 智, 村岡 優, 浅川幸子, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 当科における進行肝細胞癌に対するソラフェニブ療法の治療経験. 第 46 回日本消化器病学会甲信越支部例会 2010.6.12 甲府
- 24) 中山康弘, 坂本 穰, 進藤邦明, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. HCC 定位照射の意義と効果. 第 46 回日本肝癌研究会 2010.7.8 大阪
- 25) 進藤邦明, 井上泰輔, 雨宮史武, 北村敬利, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. 肝細胞癌初発診断時の大きさ, stage, 治療とfollow up期間. 第 46 回日本肝癌研究会 2010.7.8 大阪
- 26) 小松信俊, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. 早期肝細胞癌診断における Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 検査の有用性. 第 46 回日本肝癌研究会 2010.7.8 大阪
- 27) 末木良太, 前川伸哉, 門倉 信, 三浦美香, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. エンテカビル市場導入後の B 型肝炎発症臨床の変化について. 第 46 回日本肝癌研究会 2010.7.8 大阪
- 28) 辰巳明久, 北村敬利, 雨宮史武, 岩本史光, 進藤邦明, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. 肝硬度を用いた肝細胞癌発症のリスクの評価. 第 46 回日本肝癌研究会 2010.7.8 大阪
- 29) 高橋 英, 雨宮史武, 進藤邦明, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. HCC 定位照射の意義と効果. 第 46 回日本肝癌研究会 2010.7.8 大阪
- 30) 佐藤光明, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 進藤邦明, 坂本 穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. Sonazoid 造影超音波検査を用いた肝細胞癌 TACE 後の治療効果判定の検討. 第 46 回日本肝癌研究会 2010.7.8 大阪
- 31) 三浦美香, 前川伸哉, 末木良太, 門倉信, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. HCV ゲノム解析による肝発症に関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 第 46 回日本肝癌研究会 2010.7.8 大阪
- 32) Hiroko Shindo, Shinya Maekawa, Ryota Sueki, Mika Miura, Makoto Kadokura, Kazuki Komase, Kuniaki Shindo, Fumitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Taisuke Inoue, Minoru Sakamoto, Nobuyuki Enomoto. Characterization of Protease Inhibitor Resistance Mutations in Untreated Patients Infected with Genotype 1b Hepatitis C Virus. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Sep.10-14, 2010 Yokohama
- 33) Shinya Maekawa, Ryouta Sueki, Asuka Kanayama, Mika Miura, Makoto Kadokura, Kazuki Komase, Hiroko Shindo, Takako Otori, Fumitake Amemiya, Takatoshi Kitamura, Taisuke Inoue, Minoru Sakamoto, Syun-ichi Okada, Nobuyuki Enomoto. Analysis of the early response and the final outcome to pegylated-interferon plus ribavirin therapy in chronic HCV-1b infection using comprehensive information of viral and host factors. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Sep.10-14, 2010 Yokohama
- 34) Kazuki Komase, Shinya Maekawa, Hiroko Shindo, Makoto Kadokura, Ryota Sueki, Mika Miura, Kuniaki Shindo, Fumitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Taisuke Inoue, Sakamoto Minoru, Nobuyuki Enomoto. Extensive analysis of serum cytokines associated to the response in the PEG-IFN+RBV combination therapy in genotype 1b HCV infection. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Sep.10-14, 2010 Yokohama
- 35) Mika Miura, Shinya Maekawa, Makoto Kadokura, Ryouta Sueki, Kazuki Komase, Hiroko Shindo, Kuniaki Shindo, Fumitake Amemiya, Yasuhiro Nakayama, Takatoshi Kitamura, Tomoyoshi Uetake, Taisuke

- Inoue, Minoru Sakamoto, Syun-ichi Okada, Nobuyuki Enomoto. Investigation for viral genomic regions associated to hepatocarcinogenesis in hepatitis C. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses Sep.10-14, 2010 Yokohama
- 36) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた C 型慢性肝炎に対する治療戦略. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (パネル) 2010.10.14 横浜
- 37) 雨宮史武, 前川伸哉, 榎本信幸. HCV 増殖における細胞内脂質の重要性. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (パネル) 2010.10.14 横浜
- 38) 進藤邦明, 井上泰輔, 榎本信幸. 山梨県における日本住血吸虫症の現状と慢性肝疾患に与える影響. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ワーク) 2010.10.13 横浜
- 39) 佐藤光明, 進藤邦明, 榎本信幸. 初発肝細胞癌早期発見、早期治療のためのスクリーニング期間. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ワーク) 2010.10.14 横浜
- 40) 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. IL28B SNP による PEG-IFN/RBV 療法における HCV 動態変化の検討. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ワーク) 2010.10.14 横浜
- 41) 進藤浩子, 雨宮史武, 小馬瀬一樹, 門倉信, 末木良太, 三浦美香, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. HCV replicon におかる IFN λ の HCV 増殖抑制効果の検討. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ポスター) 2010.10.13 横浜
- 42) 門倉 信, 前川伸哉, 末木良太, 三浦美香, 雨宮史武, 北村敬利, 植竹智義, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 中川美奈, 坂本直哉, 榎本信幸. ゲノム全長解析による genotype2b 型 HCV における治療効果規定の検索. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ポスター) 2010.10.13 横浜
- 43) 辰巳明久, 北村敬利, 雨宮史武, 岩本史光, 進藤邦明, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 肝硬度からみた慢性肝疾患からの発癌リスクの評価. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ポスター) 2010.10.13 横浜
- 44) 三浦美香, 前川伸哉, 末木良太, 門倉信, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. 肝発癌に関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ポスター) 2010.10.13 横浜
- 45) 小松信俊, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 早期肝細胞癌診断における Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 検査の有用性. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ポスター) 2010.10.13 横浜
- 46) 高橋 英, 雨宮史武, 進藤邦明, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. 肝細胞癌に対する放射線治療～放射線治療は肝細胞癌治療のアルゴリズムになり得るか. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ポスター) 2010.10.13 横浜
- 47) 末木良太, 前川伸哉, 三浦美香, 門倉信, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. B 型肝炎における核酸アナログ導入後の肝発癌臨床の変化. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ポスター) 2010.10.14 横浜
- 48) 小馬瀬一樹, 前川伸哉, 進藤浩子, 門倉信, 末木良太, 三浦美香, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 坂本 穰, 岡田俊一, 榎本信幸. Cytokine Array 解析を用いた HCV の PEG-IFN+RBV 治療効果と関連する宿主因子の同定. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ポスター) 2010.10.14 横浜
- 49) 中山康弘, 坂本 穰, 進藤邦明, 雨宮史武, 北村敬利, 井上泰輔, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. 臨床背景、腫瘍因子、背景肝病変からみた非 B 非 C 型肝炎の現状と問題点. JDDW2010 第 14 回日本肝臓学会大会 (ポスター) 2010.10.14 横浜
- 50) 井上泰輔, 末木良太, 雨宮史武, 北村敬利, 植竹智義, 坂本穰, 前川伸哉, 岡田俊一, 榎本信幸. エンテカビル投与症例における HB コア関連抗原値測定による病態の検討. JDDW2010 第 52 回日本消化器病学会大会 (ポスター) 2010.10.14 横浜
- 51) 坂本 穰. C 型肝炎に対する治療のテーラーメイド戦略. JDDW2010 ランチョン 2010.10.16 横浜

- 52) 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異(とくに IRRDR)と宿主ゲノム解析からみた C 型慢性肝炎に対する治療戦略. 第 38 回日本肝臓学会東部会(パネル)2010.12.3 東京
- 53) 小松信俊, 雨宮史武, 榎本信幸. EOB-MRI 肝細胞相で低信号を呈する乏血性結節の治療方針. 第38回日本肝臓学会東部会(ワーク)2010.12.2 東京
- 54) 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. ウイルス肝炎診療ネットワークの構築. 第 38 回日本肝臓学会東部会(ワーク)2010.12.3 東京
- 55) 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 肝細胞癌早期発見のために～適切なサーベイランス期間の検討. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.2 東京
- 56) 雨宮史武, 辰巳明久, 榎本信幸. 肝硬度を用いた肝細胞癌発癌のリスクの評価. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京
- 57) 進藤浩子, 雨宮史武, 小馬瀬一樹, 門倉信, 末木良太, 三浦美香, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 前川伸哉, 榎本信幸. HCV replicon における IFNλ の HCV 増殖抑制効果の検討. 第38回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京
- 58) 三浦美香, 前川伸哉, 門倉 信, 末木良太, 進藤邦明, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 雨宮史武, 中山康弘, 植竹智義, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 肝炎の進展、癌化と関連する C 型肝炎ウイルス遺伝子領域の検索. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京
- 59) 浅川幸子, 坂本 穰, 佐藤光明, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノム解析からみた IFN 単独療法の位置づけ. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京
- 60) 中山康弘, 坂本 穰, 榎本信幸. 非ウイルス性肝細胞癌の予後と背景因子の検討. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京
- 61) 佐藤光明, 中山康弘, 榎本信幸. 進行肝細胞癌に対するソラフェニブ療法の治療経験. 第 38 回日本肝臓学会東部会(一般) 2010.12.3 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

遺伝子発現プロファイルの解析による C 型慢性肝炎を背景にした肝細胞癌発癌機構の検討

分担研究者：藤井秀樹 山梨大学大学院医学工学総合研究部 教授

研究要旨

これまで複数のグループが癌部の遺伝子発現パターンによる HCC のサブクラス分類を報告してきた。HCV 関連 HCC は炎症や酸化ストレスなど非癌部の因子も発癌に重要な役割を果たしていることを踏まえ、今回我々はこれらのサブクラスに相当する症例の非癌部で特徴的に発現している遺伝子の解析を行った。

解析の結果、異常な細胞増殖を来すタイプの HCC の非癌部では炎症や線維化といった因子が、 β -カテニンの変異を来すタイプの HCC の非癌部ではアポトーシス関連の因子が関連している可能性が示唆された。これらの結果を裏付けるため、さらなる検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

近年、癌部の遺伝子発現パターンより肝細胞癌の分類が可能であることが複数の研究グループより報告されてきた^{1)~3)}。本研究では各サブクラスの非腫瘍部での遺伝子発現パターンを比較し、分子生物学的特性を明らかにすることを目的とする。また、非腫瘍部の遺伝子発現パターンからも前述の分類が可能であると考えられ、サブクラスの統計学的予測モデルを作成する。

B. 研究方法

対象は 2000 年から 2007 年までに当科で根治的切除術が行われた HCV 関連 HCC 患者 40 例である。これに加え、転移性肝癌症例 8 例も対照群として含めた。

① イクローアレイを用いて、癌部・非癌部の遺伝子発現プロファイルを得る。

② 癌部遺伝子発現プロファイルを用いて、当研究の症例を既知の 3 つのサブクラスに分類する。

③ 各サブクラスに該当する症例の非癌部での遺伝子発現パターンで比較検討し、各サブクラスに特異的に発現している遺伝子を特定、それをもとに各サブクラスの分子生物学的特徴を探る。

④ 当研究の症例をもちいて②で行ったクラス分類の非癌部の遺伝子発現プロファイルによる予測を行う。この予測に必要な遺伝子を特定する。

⑤ ④で構築された予測モデルの予測性能を別個のサンプルで検証する。別個のサンプルとして (1)すでに発癌した患者の過去の生検サンプル (2)肝細胞癌再発症例の初発時の非癌部組織と再発時の癌部組織を用いる。

- ⑥ 発癌前の HCV 陽性患者からの生検サンプルから将来おこるであろう癌のサブクラスを予測する prospective study を行う。

C. 研究結果

(1) 本研究に用いるサブクラスの定義と対象症例のサブクラス分類

Boyault ら¹⁾、Chiang ら²⁾、および Hoshida ら³⁾の報告を参考にし、癌部遺伝子発現パターンによる HCC のサブクラスを Class 1, Class 2, Class 3 の3つと定義した(図1)。Class 1はChiangらのProliferation Classに、Class 2はCTNNB1 Classに、Class 3はその他に相当する。マイクロアレイに耐えうる十分な quality をもった RNA の抽出が可能であった HCV 関連 HCC40 症例の凍結サンプルを用い、マイクロアレイによる癌部・非癌部の遺伝子発現プロファイルを得た。前述の複数の報告の遺伝子発現データと対象 40 症例の癌部遺伝子発現データを用い、Prediction analysis of microarray(PAM)で対象症例をサブクラス分類したところ、12例がClass 1に、12例がClass 2に、16例がClass 3に分類された。Boyaultらのデータによる分類とChiangらのデータによる分類は1例を除いて一致していた(図2)。

(2) 各サブクラスの臨床学的、腫瘍学的特徴の検討

対象症例の臨床データ、病理データなどを用いて、これらのサブクラスの臨床学的、腫瘍学的特徴を分析した。

α -フェトプロテイン (AFP) が Class 1 で有意に高値であり、この結果は過去の報告と合致するものであった(図3)。その他のパラメータではサブクラス間で統計学的有意差を示すものはなかった。

(3) 非癌部における各サブクラスの特徴的遺伝子の探索

対象症例の非癌部遺伝子発現プロファイルを用いてサブクラスに特徴的に発現している遺伝子を同定した。Significance Analysis of Microarray (SAM) をアルゴリズムとして使用し、目的のサブクラスと他のサブクラス、目的のサブクラスと対照群(転移性肝癌)の両方で有意に発現パターンの異なる遺伝子を目的の遺伝子とした。FDR<0.3 を有意差ありとしたところ、Class 1 で 1855, Class 2 で 12, Class 3 で 165 の遺伝子が選択された(表1~3)。

(4) 各サブクラスの特徴遺伝子からの分子生物学的特性の検討

選択された遺伝子群で overrepresent していると考えられる Gene Ontology (GO) category を Hypergeometric test で検討した。表4に示すようにClass 1では主に炎症や免疫反応に関連するカテゴリーが上位にランクされた。Class 2ではアポトーシスやDNAの修復に関連するカテゴリーが有意差ありとして浮かび上がった(表5)。Class 3ではリンパ球や白血球の活性化に関連するカテゴリーが有意差ありとして選択された(表6)。