

梅山秀明、松本武久、横山茂之．第38回構造活性相関シンポジウム，2010年10月30日，徳島大学工学部共通講義棟

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

厚生労働科学研究費補助金（研究事業）
分担研究報告書

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
研究分担者 朝比奈 靖浩 武蔵野赤十字病院 消化器科部長

研究要旨

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明らかにすることを目的として研究をおこなった。その結果、PEG-IFN/RBV 併用療法における NVR に、IL28B minor type および RIG-1 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。従って、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。

A. 研究目的

これまで我々は、宿主における自然免疫系遺伝子発現が、C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN/RBV 併用療法の難治要因として重要であることを報告してきた (Gastroenterology 2008)。一方最近、宿主 IL28B 遺伝子近傍の SNP が PEG-IFN/RBV 併用療法の NVR に関連していることが、報告されたが、IL28B 遺伝子近傍の SNP と宿主遺伝子発現および抗ウイルス療法の治療効果については不明な点が多い。そこで本年度の研究では、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について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

先ず、C 型慢性肝疾患 865 例を対象として、IL28B 近傍 SNP の genotype の頻度を解析し、PEG-IFN/RBV 施行例について、IL28B genotype 別の HCV 動態およびウイ

ルス学的治療効果を検討した。さらに、IL28B SNP に関連する宿主およびウイルス学的因子を解析し、PEG-IFN/RBV 療法を施行した genotype 1b 高ウイルス量症例を対象として、治療前における肝内宿主自然免疫遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で測定し、IL28B SNP および治療効果との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

理上の問題が生じる場合には、武蔵野赤十字病院の倫理委員会において審議を行い、承認を得ることとした。

C. 研究結果

IL28B SNP は測定例の 73%が major homozygote で、残りは heterozygote および minor homozygote であった。IL28B hetero または minor の症例では、PEG-IFN/RBV 併用療法中の HCV 動態第 1 相・第 2 相双方における HCV 減少率が有

意に低かった。IL28B major の 48 週治療の著効率は 54%であったのに対し、hetero または minor の症例では 54%が NVR であった。IL28B hetero または minor の症例は、肝脂肪化、 γ -GTP 高値、LDL-C 低値および ISDR 野生型、HCV コア変異が関連し、従来から難治要因として報告されている因子と関連があった。一方、年齢、性別および肝線維化とは有意な関連はなく、IL28B で規定されない宿主因子が治療効果に関連することが示唆された。治療前の肝における、細胞内ウイルスセンサー(RIG-I、MDA5、LGP2)、IFN 誘導遺伝子(ISG15、USP18)は IL28B hetero または minor の症例で有意に高発現であった。一方、アダプター分子(IPS-1)および抑制系遺伝子(RNF125)は hetero または minor の症例で低値であった。しかし、IL28B major でも NVR となった症例では細胞内ウイルスセンサーや IFN 誘導遺伝子の発現は高値で、同様に IL28B hetero または minor でもウイルス反応が得られた症例では低値であった。多変量解析では NVR に関与する因子として IL28B SNP 以外に RIG-I 高発現が抽出された。

D. 考察

IL28B minor allele は NVR と関連し、HCV 動態の解析から、IFN の直接ウイルス抑制作用および感染細胞の排除が障害されていることが示唆された。IL28B minor allele は、宿主自然免疫遺伝子と密接に関連し共に PEG-IFN/RBV の難治メカニズムに関与していることが示唆された。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Asahina Y, Tsuchiya K, Tamaki N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 52(2): 518-27, 2010.

2. Itakura J, Asahina Y, Tamaki N, Hirayama I, Yasui Y, Tanaka T, Sato M, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Kurosaki M, Gabriel GS, Schneider, Izumi N. Changes in hepatitis C viral load during first 14 days can predict the undetectable time point of serum viral load by pegylated interferon and ribavirin therapy. *Heptol Res* 2011 in press.

3. Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M. Predictors of virological response to a combination therapy with pegylated interferon plus ribavirin including virus and host factors. *Hepatitis Reserch and Treatment* 2010: 703602, 2010.

4. Namiki I, Nishiguchi S, Hino K,

Suzuki F, Kumada H, Itoh Y, Asahina Y, Tamori A, Hiramatsu N, Hayashi N, Kudo M. Management of hepatitis C; Report of the Consensus Meeting at the 45th Annual Meeting of the Japan Society of Hepatology (2009). *Hepatol Res* 40(4): 347-68, 2010.

5. Kurosaki M, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Nakanishi H, Ikeda H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Higaki M, Enomoto N, Izumi N. A predictive model of response to peginterferon ribavirin in chronic hepatitis C using classification and regression tree analysis. *Hepatol Res* 40(3): 251-60, 2010.

6. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *J Hepatol* 2010.

7. Kurosaki M, Hosokawa T, Matsunaga K, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Tamaki N, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Enomoto N, Izumi N. Hepatic steatosis in chronic hepatitis C is a significant risk factor for developing

hepatocellular carcinoma independent of age, sex, obesity, fibrosis stage and response to interferon therapy. *Hepatol Res* 40(9): 870-7, 2010.

8. 朝比奈靖浩. C型肝炎の最新治療と医療連携. *日本臨床内科医会誌* 25; 9-18, 2010.

9. 朝比奈靖浩. ウイルス肝炎 治療の現状と新しい戦略】 C型肝炎ウイルス感染の病態と治療法 ペグインターフェロンとリバビリン併用療法の治療成績と寄与因子. *治療学* 44; 1016-1021, 2010.

2. 学会発表

1. Asahina Y, Tsuchiya K, Tamaki N, Sato M, Tanaka T, Hirayama I, Yasui Y, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Izumi N. Reducing alpha-fetoprotein with interferon therapy suppresses hepatocarcinogenesis in hepatitis C virus-infected patients who are virological responders and non-responders. The 45th annual meeting of the European association for the study of the liver (EASL The International Liver Congress 2010). Apr 14-18, 2010, Vienna, Austria.

2. Asahina Y, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka T, Katoh T, Tanaka T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N. Gene expression involving innate immunity and IL28B variation: its association with antiviral response in chronic hepatitis

C. The 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2010). 2010 Oct 29–Nov 2, Boston, USA. (Oral Presentation).

3. 朝比奈靖浩, 田中博, 泉並木. シンポジウム C 型肝炎-ウイルス感染の分子免疫機構. PEG-IFN/RBV および Telaprevir 投与中の自然免疫系遺伝子発現プロファイルと治療効果. 第 96 回日本消化器病学会大会, 2010, 新潟.

4. 朝比奈靖浩, 田中博, 泉並木. シンポジウム C 型肝炎における抗ウイルス療法の近未来. PEG-IFN/RBV 併用療法およびプロテアーゼ阻害薬投与中の自然免疫系遺伝子発現プロファイルと治療効果. 第 46 回日本肝臓学会総会, 2010, 山形.

5. 朝比奈靖浩, 泉並木. パネルディスカッション C 型肝炎に対する新たな治療戦略. PEG-IFN/RBV 併用療法における難治要因と新規抗ウイルス薬の治療効果. 第 14 回日本肝臓学会大会, 2010, 横浜.

6. 朝比奈靖浩, 田中博, 泉並木. シンポジウム ウイルス肝炎における免疫応答の研究. 病態解明と治療への応用 PEG-IFN/RBV およびプロテアーゼ阻害薬投与中の宿主因子および自然免疫系遺伝子プロファイルと治療効果. 第 38 回日本肝臓学会東部会, 2010, 東京.

3. その他
なし

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

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（分担）研究報告書（平成22年度）

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班

分担研究者 今村 道雄 広島大学病院消化器・代謝内科 助教

研究要旨： 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。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。これらの結果から、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。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎に対する IFN 治療効果には HCV の Core および ISDR の変異、宿主の IL28B 遺伝子多型が関与している。しかしこれらの因子がどのような機序により治療効果に関与しているのかは明らかでない。今回われわれは、ウイルス変異や IL28B の遺伝子多型がどのように治療効果に関与しているのかを C 型肝炎ウイルス感染モデルマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

Genotype 1b型の急性重症C型肝炎患者の血清よりクローニングしたHCV全長クローン(HCV-KT9)を用いた。HCV-KT9はコ

A領域にR70QおよびL91Mのアミノ酸変異を有していた。一方、NS5AのISDR領域には変異を認めなかった(Core-Mutant-ISDR 0)。このクローンのISDR領域に4カ所(Core-Mutant-ISDR 4)または9カ所(Core-Mutant-ISDR 9)のアミノ酸変異を挿入したクローン、およびコア領域のaa70および91のアミノ酸変異を野生型に置換させたクローン(Core-Wild-ISDR 0)、さらにISDR領域に4カ所(Core-Wild-ISDR 4)または9カ所(Core-Wild-ISDR 9)のアミノ酸変異を挿入した6種類のクローンを作製した。全長cDNAを挿入したplasmidより、in vitro transcription法によりRNAを合

成し、30 ugのRNAをヒト肝細胞キメラマウスの肝臓内に直接注入した。ヒト肝細胞キメラマウスは4種類のヒト肝細胞(Donor A, B, C, D)を移植したマウスを使用した。Donor A, B, C, DのIL28B遺伝子型(rs8099917)はTG, TT, TG, TTであった。注入後、2週おきにマウス血清を採取し、real-time PCRにより血中HCV RNAを定量した。さらに1500 IU/gのIFN- α を2週間連日投与した。

C. 結果

ウイルス変異が感染、増殖、IFN感受性に及ぼす影響：Donor A 肝細胞移植マウスでの検討では、Core-Wild-ISDR 0 と Co-Mutant-ISDR 0 投与マウスにおいて、感染成立率(85% vs 84%)、血中HCV RNAは同程度であった。またIFN投与による血中HCV RNAの低下量も同程度であった。一方、ISDRに4個の変異を挿入したクローンの感染成立率は、Core-Wild-ISDR 4で40% ($p < 0.05$)、Core-Mutant-ISDRで10% ($p < 0.05$)と、ISDRに変異がないクローンに比べ有意に低かった。ISDRに9個の変異を挿入したCore-Wild-ISDR 9、Core-Mutant-ISDR 9ではすべてのマウスにおいて感染は成立しなかった。また感染が成立したISDR 4投与マウスでの血中HCV RNAはISDRに変異がないクローンに比べ、明らかに低値であった。これらの結果から、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変異は感染および複製能を低下させるものと考えられた。

宿主のIL28B遺伝子多型がHCVの感染、増殖、IFN感受性に及ぼす影響：

Core-Wild-ISDR 0 クローンをDonor A肝細胞移植マウスあるいはDonor B肝細胞移植マウスに投与した結果、感染の成立は同程度であったが、マウス血中HCV RNAはDonor B肝細胞移植マウスで有意に高値であった。またIFN- α の投与により、Donor B肝細胞移植マウスではDonor A肝細胞移植マウスに比べ血中HCV RNAは有意に低下した。次にDonor C肝細胞移植マウスおよびDonor D肝細胞移植マウスにHCV陽性患者血清を投与したところ、クローン投与マウスと同様に、感染の成立は同程度であったが、マウス血中HCV RNA量はDonor D肝細胞移植マウスで有意に高値であった。IFN- α の投与においてもクローン投与マウスと同様に、Donor D肝細胞移植マウスは、Donor C肝細胞移植マウスに比べ、血中HCV RNAは有意に低下した。さらにIFN- α 投与後の肝臓内ISGs発現量を検討したところ、Donor D肝細胞移植マウスは、Donor C肝細胞移植マウスに比べ、MxA, OAS, PKRの遺伝子発現量が有意に高値であった。

D. 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た。臨床的に認められるCoreの変異の有無によるIFN治療効果の違いは、ウイルスそのもののIFN感受性よりも、Core変異が宿主にIFN抵抗性を獲得する何らかの影響を与えている可能性が考えられる。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。

E. 結論

HCV感染モデルマウスを用いて、ウイルス (CoreおよびISDR) および宿主因子 (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の検討が可能であった。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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;91:1668-7
- 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 viremia in human hepatocyte chimeric mice. *J Gen Virol*. 2010;91:1854-64
- Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ohishi W, Arihiro K, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. A common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. *J Hepatol* 2010;53:439-43.
- 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;405:361-9.
- Suda G, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, Kiyohashi K, Azuma S, Kakinuma S, Tsuchiya K, Imamura M, Hiraga N, Chayama K, Watanabe M. IL-6-mediated intersubgenotypic variation of interferon sensitivity in hepatitis C virus genotype 2a/2b chimeric clones. *Virology* 2010;407:80-90
- Hayes CN, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H, Abe H, Miki D, Imamura M, Ochi H, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K. HCV substitutions and IL28B polymorphisms on outcome of peg-interferon plus ribavirin combination therapy. *Gut*, in press
- Kawaoka T, Hayes CN, Ohishi W, Ochi H, Maekawa T, Abe H, Tsuge M, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Tsunoda T, Nakamura Y, Kumada H, Chayama K. Predictive value of the IL28B polymorphism on the effect of interferon therapy in chronic hepatitis C patients with genotypes 2a and 2b. *J Hepatol*, in press
- Abe H, Hayes CN, Ochi H, Maekawa T, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. IL28 Variation Affects Expression of Interferon Stimulated Genes and Effect of Peg-Interferon and Ribavirin Therapy. *J Hepatol*, in press
- 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*, in press
- 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*, in press
- Kitamura S, Tsuge M, Hatakeyama T, Abe H, Imamura M, Mori N, Saneto H, Kawaoka T, Mitsui F, Hiraga N, Takaki S, Kawakami Y, Aikata H, Takahashi S, Ohishi W, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Amino acid substitutions in core and NS5A regions of the HCV genome can predict virological decrease with pegylated interferon plus ribavirin therapy. *Antivir Ther* 2010;15:1087-1097
- Chayama K, Hayes CN, Hiraga N, Abe H,

Tsuge M, Imamura M. Animal model for study of human hepatitis viruses. J Gastroenterol Hepatol. 26:13-18, 2011.

• Ochi H, Maekawa T, Abe H, Hayashida Y, Nakano R, Imamura M, Hiraga N, Kawakami Y, Aimitsu S, Kao JH, Kubo M, Tsunoda T, Kumada H, Nakamura Y, Hayes CN, Chayama K. IL-28B predicts response to chronic hepatitis C therapy -fine-mapping and replication study in Asian populations. J Gen Virol, in press

2. 学会発表

• 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 IL28B 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 平成 22 年 4 月 23 日.

• 今村道雄, 越智秀典, 茶山一彰. C型慢性肝炎患者における IL28B 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 平成 22 年 6 月 27 日.

• 今村道雄, 平賀信彦, 茶山一彰. HCV 感染マウスを用いた NS3/4A protease 阻害剤および NS5B polymerase 阻害剤併用療法の有用性の検討. 第 14 回日本肝臓学会大会 横浜 平成 22 年 10 月 14 日.

• Michio Imamura, Hidenori Ochi, Hiromi Abe, Tomokazu Kawaoka, Yoshimasa Hashimoto, Shoichi Takahashi, C. Nelson Hayes, Kazuaki Chayama. IL-28B predicts response to peginterferon-alfa-2b plus ribavirin therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. HCV 2010, Yokohama, September 10-14, 2010.

• Michio Imamura, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Shoichi Takahashi, Hiromi Abe, C. Nelson Hayes, Hidenori Ochi and Kazuaki Chayama. The influences of viral mutations on HCV infectivity, replication ability and the susceptibility to interferon in human hepatocyte chimeric mice. The 7th APASL Single Topic Conference, Chiba, December 17-18, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（肝炎等克服緊急対策研究事業）
分担研究報告書

ウイルス性肝炎の病態における制御性免疫機構の解析

分担研究者 中本 安成 福井大学医学部第二内科 教授

研究要旨： 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。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相関しており、抑制性樹状細胞の頻度との関連がみられた。これより、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。

A. 研究目的

ウイルス性肝炎における肝細胞障害は、ウイルスによる直接的な作用ではなく、ウイルス抗原に反応する宿主の免疫反応によって引き起こされる。なかでも、CD4陽性Tリンパ球分画の一部（CD25 ; Foxp3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）として注目されているが、慢性肝炎の病態における役割は不明のままである。さらに、C型肝炎ウイルス（HCV）はウイルス側因子（ゲノム、ウイルス量など）に多様性がありそれぞれウイルス株によって病原性が異なるために、病態研究における正確な免疫反応の評価を困難なものとしている。そこで、C型慢性肝炎患者の免疫環境をウイルス側、宿主側背景を併せて検討する目的で、HCVのウイルス側因子とともに末梢血Tregの頻度、亜分画、機能解析を行った。

B. 研究方法

慢性肝炎の組織学的進展度の異なる患者について、ウイルス側因子（ゲノム、ウイルス量など）を背景として、採取された末梢血単核球（PBMC）からMACSシステム、セルソーターを用いてCD4(+)CD25(high / low / negative)の3分画に分離した。これらの細胞分画について表面マーカー（CD45RO、CTLA-4、CD62L、CCR7、HLA-DR、CD45RA、GITR）、Foxp3やPMA/ionomycin刺激後の細胞質サイトカイン（IL-2、IFN- γ 、IL-4、IL-10）産生を検討した。また同時に得られた樹状細胞（DC）分画の頻度、病態との関連について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたっては、倫理性・安

全性の確保に十分配慮した。そのため、世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び各法令に従うとともに、実施機関である「金沢大学医学倫理委員会」の審査体制のもとに行った。また、個人情報保護の観点からすべてのサンプル及び結果は番号化した。

C. 研究結果

- 1) 肝がん患者末梢血中のCD4(+)CD25(high)Foxp3(+)制御性Tリンパ球(2.65%)は、非がん患者(健常人0.65%、慢性肝炎0.73%、肝硬変1.12%)に比較して増加していた($p < 0.01$)。
- 2) 肝がん患者の同CD25(high)分画では細胞質IL-4とIL-10陽性細胞の割合が増加しており、非がん患者の同分画での割合よりも有意に高かった($p < 0.001$)。
- 3) 肝がん患者の同CD25(high)分画ではCD45RO陽性細胞の頻度が増加していた。
- 4) 肝がん患者の病態との関連について、最大腫瘍径、腫瘍数、腫瘍マーカー、TNM分類、Child-Pughスコア、線維化の程度（F因子）に関して解析したところ、CD45RO陽性細胞の頻度が高い群では、腫瘍最大径が大きく($p < 0.05$)、腫瘍マーカーAFP、DCPとの相関($p < 0.05$)がみられた。
- 5) 同CD45RO陽性細胞の頻度が高い肝がん群において、免疫寛容性(plasmacytoid) DCの頻度が増加していた($p < 0.05$)。

D. 考察

本研究の結果から肝がん患者のCD4(+)CD25(high)Foxp3(+)制御性Tリンパ球は高い抑制性サイトカイン産生能を示し、なかでもCD45RO陽性を示す活性化/メモリーTリンパ球分画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

の進展と相関しており、抑制性樹状細胞の頻度との関連がみられた。

これまで、他の悪性腫瘍においても制御性Tリンパ球が増加していることが観察されており免疫病態との関連が示唆されてきた。制御性Tリンパ球は単一の細胞ではなく、いくつかの異なる細胞サブセットの集合体と考えられており、既報のサブセットに関する表面マーカーを用いて検討した。その結果、活性化/メモリーTリンパ球に特徴的なCD45RO分画が病態の進展と関連していた。さらに、抑制性樹状細胞との相関を認めることから、生体の抗腫瘍作用を抑制するような免疫環境の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

本年度の研究では、肝がんの病態における制御性Tリンパ球の関与は示唆されたものの、発がんから腫瘍の進展に至る各病態における詳細な関与については不明のままであり、今後はウイルス側及び宿主側因子を加味して病態に応じた検討を進める必要性が示唆された。

E. 結論

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関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 論文発表
1. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S. Prolonged recurrence-free survival following ok432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin. Exp. Immunol.* 2011; 163: 165-177.
2. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O and Kaneko S: Enhancement of tumor-specific T-cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 2010; 126: 2164-2174.
3. Kawano M, Nishida H, Nakamoto Y, Tsumura H and Tsuchiya H: Cryoimmunologic antitumor effects enhanced by dendritic cells in osteosarcoma. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2010; 468: 1373-1383.

4. Iida N, Nakamoto Y, Baba T, Nakagawa H, Mizukoshi E, Naito M, Mukaida N and Kaneko S: Antitumor effect after radio-frequency ablation of murine hepatoma is augmented by an active variant of cc chemokine ligand 3/macrophage inflammatory protein-1alpha. *Cancer Res.* 2010; 70: 6556-6565.
5. Kakinoki K, Nakamoto Y, Kagaya T, Tsuchiyama T, Sakai Y, Nakahama T, Fujita Y, Mukaida N and Kaneko S: Prevention of intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma by combination of suicide gene therapy and monocyte chemoattractant protein-1 delivery in mice. *J. Gene Med.* 2010; 12: 1002-1013.

2. 学会発表

1. Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: #1725: NFkB activation precedes dynamics of oxidative stress-related procarcinogenic signalings in a mouse model of chronic hepatitis B.; 第61回American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (Boston, Massachusetts): Hepatology 52 (4, Suppl.) 935A; 一般; poster: Nov. 1, 2010
2. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, Kaneko S: Dendritic Cell Transfer during Locoregional Treatments Induces Prolonged Recurrence-Free Survival in Patients with Hepatocellular Carcinoma.; International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa "Cancer and Host Response" (Satellite Symposium of 14th International Congress of Immunology - Kanazawa, Japan): Abstract p33-34; session; oral: Aug. 29, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

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

研究分担者：堀田 博 神戸大学大学院医学研究科微生物学分野

研究要旨

我々はこれまでに、C型肝炎ウイルスサブタイプ 1b (HCV-1b) による慢性肝炎患者のペグインターフェロン (Peg-IFN) /リバビリン (RBV) 併用療法に対する感受性または抵抗性を規定するウイルス側因子として、HCV 非構造タンパク質 NS5A の IRRDR (aa 362~407) と名付けた領域のアミノ酸配列の多様性を同定し、報告してきた。また、HCV コア蛋白質の 70 位の変異も同治療応答性を規定するウイルス側因子として重要であることが報告されている。一方、同治療応答性を規定する宿主側因子として、IFN- λ 3 をコードする IL28B の遺伝子多型 (SNP) が注目されている。本研究では、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。その結果、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。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。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス (HCV) による慢性肝炎の治療にペグインターフェロン (Peg-IFN) とリバビリン (RBV) の併用療法が用いられており、HCV genotype 1b (HCV-1b) で高ウイルス血症の症例の約半数で、持続的なウイルス排除 (SVR) が得られるようになってきた。しかし、なお半数近い症例でウイルスの完全排除が望めない (Non-SVR)。また、比較的 IFN 治療に感受性が高いといわれる HCV-2a の症例でも、約 10%の症例が Non-SVR となる。治療応答性を規定する因子は患者側とウイルス側の双方

にあると考えられるが、その具体的な指標の全容は未だ明確ではない。

我々はこれまでに、Peg-IFN/RBV 治療応答性と相関するウイルス側の重要な因子として、HCV 非構造タンパク質 NS5A の特定領域 (IRRDR; IFN/RBV resistance-determining region; aa 362~407) のアミノ酸配列の多様性を報告してきた^{1,2)}。同様に、NS5A の中央部の ISDR の多様性³⁾や、コア蛋白質の 70 位のアミノ酸変異が Peg-IFN/RBV 治療応答性と相関することも報告されている^{2,4)}。一方、HCV-1b 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療抵抗性を

規定する宿主側因子として、IL28B 遺伝子の single nucleotide polymorphism (SNP) が注目されている⁵⁻⁷⁾。

HCV-1b 以外に、HCV-2a や HCV-2b でも、NS5A の多様性、とくに IRRDR や ISDR の多様性、及びコア蛋白質の変異の関与について、我々は検討を重ねている。

本研究では、HCV-1b 高ウイルス血症の患者症例において、Peg-IFN/RBV 治療応答性を規定するウイルス側因子(とくに NS5A の IRRDR や ISDR、コア蛋白質 70 位の変異)、及び宿主側因子 (IL28B SNP)、並びにそれらの組み合わせについて検討した。また、HCV-2a、HCV-2b についても、ウイルス側因子 (NS5A、コア蛋白質) 及び少数例であるが宿主側因子についても検討した。

B. 研究方法

1) 患者及び治療応答性の判定: HCV-1b 感染慢性肝炎の治療のため、48 週間の Peg-IFN/RBV 併用療法を受け、その後 24 週間の経過観察により治療効果を判定できた患者。HCV-2a 及び HCV-2b 感染慢性肝炎症例では、24 週間の Peg-IFN/RBV 併用療法を受け、その後 24 週間の経過観察により治療効果を判定できた患者。最終的な治療応答性として、併用療法後 24 週間の経過観察でウイルスが排除されて陰性の者 (SVR) とそうでない者 (Non-SVR)、及び Non-SVR の中でもいったんウイルス血症が消失したがやがて再び陽性になった者 (Relapse) と、治療期間中～経過観察期間中は常にウイルス血症陽性の者 (Null-response) に分類した。同様に、治療開始後 4 週間でウイルス消失が見られた rapid virological response (RVR) と Non-RVR、あるいは 12 週間でウイルス消失が見られた early virological response (EVR) と Non-EVR に分類した。

2) HCV 遺伝子の解析: 治療開始前の患者血清について、RT-PCR 法により HCV の NS5A 及びコア遺伝子領域を増幅し、その塩基配列と

推定アミノ酸配列を求め、コンセンサス配列と比較して変異の有無を調べた。

3) IL28B SNP の解析: 治療開始前の患者血清に混入残存する DNA を抽出し、IL28B 遺伝子領域を PCR 法により増幅して、SNP

(rs8099917)⁷⁾ を同定した。(名古屋市立大学・田中靖人教授との共同研究)

(倫理面への配慮)

患者からの血清の採取と解析はインフォームドコンセントを得て行った。すべての実験はバイオセーフティー指針に準拠して行った。

C. 研究結果

1) HCV-1b 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性に及ぼすウイルス側因子 (とくに IRRDR 多様性) と宿主側因子 (とくに IL28B SNP) の影響:

HCV-1b 感染慢性肝炎患者においては、SVR は 43% (29/68)、Non-SVR は 57% (39/68) であった。Null-response は 25% (17/68)、Relapse は 32% (22/68) であった。また、RVR は 12% (28/68)、EVR は 53% (36/68)、ETR は 69% (47/68) であった。

多変量解析により、SVR と相関する因子は IRRDR の変異が 6 つ以上 (IRRDR \geq 6)、及び血中ヘモグロビン値であった。Null-response と相関する因子は IL28B SNP が T/G または G/G (IL28B-Minor)、及び血小板数であり、Relapse と相関する因子は IRRDR \geq 6 であった。また、RVR と相関する因子は ISDR \geq 2 で、EVR と相関する因子は IL28B-Major であった。

これらの因子を組み合わせると多変量解析を行うと、SVR と最も相関が強いのは IL28B-Major かつ IRRDR \geq 6 であり、Relapse と最も相関が強いのは IL28B-Major かつ IRRDR \leq 5 であった。また、Null-response と最も相関が強いのは IL28B-Minor かつ IRRDR \leq 5 であった。

2) HCV-2a 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性に及ぼすウイルス側因子と宿主側

因子の影響：

HCV-2a 感染慢性肝炎患者においては、SVR は 89% (41/46)、Non-SVR は 11% (5/46) であった。Null-response はなく、全症例が EVR になり、Non-SVR はすべて Relapse であった。

多変量解析により、SVR 及び RVR と関連する因子は IRRDR の変異が 4 つ以上

(IRRDR[2a]≥4) であった。一方、コア蛋白質変異と SVR あるいは RVR の相関は見出せなかった。IL28B SNP 解析では、SVR に比べて Non-SVR で IL28B-Minor が多い傾向が見られたが、有意差は見られなかった。

3) HCV-2b 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性に及ぼすウイルス側因子と宿主側因子の影響：

HCV-2b 感染慢性肝炎患者においては、SVR は 78% (25/32)、Non-SVR は 22% (7/32) であった。HCV-2a と同じく、Null-response はなく、全症例が EVR になり、Non-SVR はすべて Relapse であった。

HCV-2b では単変量解析、多変量解析いずれにおいても、SVR と関連する因子は見出されなかった。

D. 考察

HCV-1b 感染慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性と関連する因子としてウイルス NS5A (IRRDR^{1,2)}、ISDR³⁾ の変異数、コア蛋白質 70 位のアミノ酸変異^{2,4)}、及び宿主因子 IL28B SNP^{5,7)}が知られている。本研究では、多変量解析によりそれらの関連の有無を調べるとともに、各因子を組み合わせることによって、より正確な予測が可能か否かについて検討した。その結果、HCV-1b 感染慢性肝炎患者においては、IL28B-Major かつ IRRDR≥6 の場合は SVR に、IL28B-Major かつ IRRDR≤5 の場合は Relapse に、また、IL28B-Minor かつ IRRDR≤5 の場合は Null-response になりやすいことが明らかになった。

また、HCV-2a 感染においては IRRDR[2a]≥

4 の場合に SVR になりやすいことがわかった。一方、IL28B SNP については、IL28B-Minor が SVR に比べて Non-SVR で多い傾向が見られたが、症例数が少ないため有意差は見られなかった。

HCV-2b 感染では SVR と有意な相関を示すウイルス側因子は見出されなかった。IL28B SNP との組み合わせも含めて、症例数を増やして今後さらに検討する必要がある。

E. 結論

HCV-1b 感染慢性肝炎患者において、IL28B-Major かつ IRRDR≥6 の場合は SVR に、IL28B-Major かつ IRRDR≤5 の場合は Relapse に、また、IL28B-Minor かつ IRRDR≤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 感染においては IRRDR[2a]≥4 の場合は SVR になりやすいことがわかったが、HCV-2b 感染では SVR と有意な相関を示す因子は見出されなかった。HCV-2a や HCV-2b における IL28B SNP の意義について今後さらに検討する必要がある。

[参考文献]

- 1) 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*, 48:38-47, 2008.
- 2) El-Shamy A, Kim S-R, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated interferon/ribavirin combination therapy. *Intervirology*, 2011 (in press)
- 3) Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C,

- Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C. 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.
- 4) Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: Amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol*, 46:403-410, 2007.
- 5) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461:399-401, 2009.
- 6) Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nat Genet*, 41:1100-1104, 2009.
- 7) Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*, 41:1105-1109, 2009.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
1. El-Shamy A, Kim SR, Ide YH, Sasase N, Imoto S, Deng L, Shoji I, Hotta H. Polymorphisms of hepatitis C virus NS5A and core proteins and clinical outcome of pegylated Interferon/Ribavirin combination therapy. *Intervirology*, (in press), 2011.
 2. Sasase N, Kim SR, Kudo M, Kim KI, Taniguchi M, Imoto S, Mita K, Hayashi Y, Shoji I, El-Shamy A, Hotta H. Outcome and early viral dynamics with viral mutation in PEG-IFN/RBV therapy for chronic hepatitis in patients with high viral loads of serum HCV RNA genotype 1b. *Intervirology*, 53(1):49-54, 2010.
 3. Sanjo M, Saito T, Ishii R, Nishise Y, Haga H, Okumoto K, Ito J, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Fukuda K, Imai Y, El-Shamy A, Deng L, Shoji I, Hotta H, Kawata S. Secondary structure of the amino-terminal region of HCV NS3 and virological response to pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 82(8): 1364–1370, 2010.
 4. Kim SR, Imoto S, Kudo M, Nakajima T, Ando K, Mita K, Fukuda K, Hong HS, Lee YH, Nakashima K, Shoji I, Nagano-Fujii M, Hotta H, Hayashi Y. Autoimmune thrombocytopenic purpura

- during pegylated interferon alpha treatment for chronic hepatitis C. *Intern Med*, 49(12): 1119-1122, 2010.
5. Kim SR, Imoto S, Kudo M, Mita K, Taniguchi M, Kim KI, Sasase N, Shoji I, Nagano-Fujii M, El-Shamy A, Hotta H, Nagai T, Nagata Y, Hayashi Y. Double-filtration plasmapheresis plus IFN for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy: early viral dynamics. *Intervirology*, 53(1):44-48, 2010
 6. Hayashida K, Shoji I, Deng L, Jiang D-P, Ide Y-H, Hotta H. 17 β -Estradiol inhibits the production of infectious particles of hepatitis C virus. *Microbiol Immunol*. 54(11): 684–690, 2010.
 7. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem*. 111(3): 676–685, 2010.
2. 学会発表
1. Hotta H, El-Shamy A, Kim SR, Imoto S, Aoki C, Ide Y, Shoji I. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 45th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 2010, Vienna.
 2. El-Shamy A, Kim SR, Ide Y, Deng L, Shoji I, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A of HCV genotypes 2a and 2b affects RVR and SVR to PEG-IFN/RBV combination therapy. 17th International meeting on hepatitis C virus and related viruses, 2010. Yokohama.
 3. 堀田博, El-Shamy Ahmed, 金守良, 井本勉, 金啓二, 谷口美幸, 井出良浩, 勝二郁夫. 慢性C型肝炎に対するPEG-IFN/RBV治療効果に及ぼすウイルス側因子のさらなる検討 HCV-2a及びHCV-2bのNS5A多様性は治療効果と相関する. 第46回日本肝臓学会総会, 2010. 山形.
 4. 金守良, 井本勉, 堀田博, 三田敬二, 前川陽子, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良弘. 1b型高ウイルスC型慢性肝炎のPEG-IFN+リバビリン併用療法(併用療法)無効例に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFN- β 4週間連続投与の試み. 第46回日本肝臓学会総会, 2010. 山形.
 5. El-Shamy Ahmed, 金守良, 井出良浩, Deng Lin, 勝二郁夫, 堀田博. HCV genotype 2a および 2b の NS5A 多様性はペグインターフェロン/リバビリン併用療法の治療効果と相関する. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010. 徳島.
 6. 矢野嘉彦, 堀田博, 東健. C型肝炎に対する新たな治療戦略 慢性C型肝炎1型高ウイルス例におけるNS5A領域変異と治療効果の関係. 第14回日本肝臓学会大会, 2010. 横浜.
 7. 瀬尾靖, 三木章, 矢野嘉彦, 勝二郁夫, 堀田博, 東健. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN α -2a/RBV併用療法の早期治療効果に関与する因子の検討. 第14回日本肝臓学会大会, 2010. 横浜.
 8. 井本勉, 金守良, 堀田博, 三田敬二, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良浩, 前川陽子. C型慢性肝炎1b型高ウイルス量併用療法無効患者に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFN β 2~4週連続投与後PEG-IFN α -2a+RBV併用療法の早期ウイルスダイナミクスによるEVR予測. 第14回日本肝臓学会大会, 2010. 横

浜.

9. 井本勉, 金守良, 堀田博. 1b 型高ウイルス量 C 型慢性肝炎の PEG-IFN+Rivabirin 併用療法(併用療法)無効例に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)+IFN- β 4 週間連続投与後 PEG-IFN α -2a+Rivabirin の試み. 第 14 回日本肝臓学会大会, 2010. 横浜.
10. 進藤道子, El-Shamy Ahmed, 森川輝久, 原野雄一, 中島知明, 勝二郁夫, 奥野忠雄, 堀田博. C 型慢性肝炎から肝癌発生まで経時的観察が可能であった症例におけるウイルス遺伝子多様性の解析. 第 14 回日本肝臓学会大会, 2010. 横浜.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

培養細胞系を用いた薬剤耐性肝炎ウイルスの解析

分担研究者 鈴木 哲朗 浜松医科大学医学部 教授

研究要旨 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。しかしながら、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。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)の複製増殖機構に関する研究が進み、HCVの遺伝子発現、蛋白プロセッシング、ゲノム複製などの分子メカニズムが明らかになるに従い、HCV蛋白を標的とした、あるいは複製調節を担う宿主因子を標的とした抗ウイルス薬が開発されるようになった。ウイルス感染症の治療にあたっては、抗ウイルス剤に対する耐性ウイルスの出現、増殖がしばしば問題になる。C型肝炎治療においても薬剤の長期間投与に伴う耐性ウイルスの出現が懸念されているものの、各治療薬に対する耐性HCVの特徴は十分には明らかにされていない。

本研究では、新規C型肝炎治療薬として開発が進められているウイルス酵素阻害剤、また今後、創薬化の可能性のある化合物に対する耐性HCVを培養細胞によるHCV複製系または感染増殖系を用いて同定し、薬剤耐性獲得の分子機構を解析する。本研究成果は、近い将来問題となることが予想される薬剤耐性HCVを克服するための治療法の開発に資すものと期待される。

B. 研究方法

HCV遺伝子型2a JFH-1株のゲノムcDNAブラ

スミド(pJFH1)を基に、直鎖化合成RNAのHuh-7細胞への導入によって作製した感染性ウイルスを、naïve Huh-7細胞へ感染させ持続感染細胞株を作製した(SL2細胞)。

SL2細胞へ抗HCV化合物を種々の濃度で添加し、その抗HCV作用を評価した。HCVレベルの指標として、細胞内外のHCV Core蛋白質及びRNAをELISA法、リアルタイムRT-PCR法でそれぞれ定量した。

HCV遺伝子の解析は、薬剤処理SL2細胞から抽出したtotal RNAをRT-PCRによってcDNA増幅し直接塩基配列を決定した。

C. 研究結果

本年度はHCV特異的な阻害剤及び宿主脂質合成系の阻害剤各一種類ずつの解析を行った。

まずNS4AアンタゴニストACH806に対する耐性HCVが出現するかどうかを検討した。感染性HCV産生系でのACH806の阻害活性を明らかにするため、SL2細胞に終濃度0.01~10 microMになるようにACH806を加え3日間培養後、培養上清中のHCV Core蛋白質量を測定した。その結果、ACH806 0.1, 1, 10 microMそれぞれによりHCVレベルは20%, 60%, 95%低下した。そ

ここで、終濃度 1 microM になるように ACH806 を SL2 細胞へ添加し 2 ヶ月間培養を行った。3 乃至 4 日毎の細胞継代時に培養上清の HCV Core 蛋白を測定し、培地交換の際 ACH806 を同濃度で添加した。ACH806 添加細胞では実験開始後約 1 ヶ月まで HCV レベルが低下し、開始時の約 100 分の 1 に至ったが、その後 HCV レベルの低下は見られなかった。そこで、薬剤耐性ウイルスが出現したか否かを調べるため、ACH806 長期間添加細胞中の HCV 遺伝子配列 (NS3~NS4A 領域) を解析した。しかしながらコントロールの薬剤非添加細胞中の HCV 遺伝子との違いは認められなかった。

つぎに、リポ蛋白の合成に関与する microsomal TG transfer protein (MTP) の働きを阻害する BMS-201038 について耐性ウイルス解析を行った。前述と同様、まず種々の濃度で BMS-201038 を SL2 細胞へ添加し 3 日間培養後に抗 HCV 活性を評価した。終濃度 0.1~10 microM の広い範囲で 65~75% の HCV 産生阻害活性が認められた。次に、終濃度 1 microM で BMS-201038 を SL2 細胞に加え 3 ヶ月間、培養を行った。BMS-201038 添加細胞では、培養開始後からウイルスレベルは漸減し、培養 64 日以降では上清中の HCV は検出限界以下まで低下した。すなわち、耐性ウイルスの出現は観察されなかった。

D. 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。

E. 結論

HCV 持続感染細胞系を使って、HCV NS4A 阻害剤 ACH806 また MTP 阻害剤 BMS-201038 の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。本実験条件下では耐性 HCV は観察されなかった。

F. 研究発表

論文発表

1. Hmwe SS, Aizaki H, Date T, Murakami K, Ishii K, Miyamura T, Koike K, Wakita T, Suzuki T: Identification of hepatitis C virus genotype 2a replicon variants with reduced susceptibility to ribavirin. *Antiviral Res* 85: 520-524, 2010.
2. 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* 84; 5824-5835, 2010.
3. Braconi C, Valeri N, Gasparini P, Huang N, Taccioli C, Nuovo G, Suzuki T, Croce CM, Patel T. Hepatitis C virus proteins modulate microRNA expression and chemosensitivity in malignant hepatocytes. *Clin Cancer*

Res 16: 957-966, 2010.

4. Tanaka Y, Mori Y, Tani H, Abe T, Moriishi K, Kojima H, Nagano T, Okabe T, Suzuki T, Tatsumi M, Matsuura Y. Establishment of an indicator cell system for hepatitis C virus. *Microbiol Immunol.* 54:206-220, 2010.
5. 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.* 395: 565-571, 2010.
6. Ito M, Murakami K, Suzuki T, Mochida K, Suzuki M, Ikebuchi K, Yamaguchi K, Mizuochi T. Enhanced expression of lymphomagenesis-related genes in peripheral blood B cells of chronic hepatitis C patients. *Clin Immunol* 135: 459-465, 2010.
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.* 6; e1000885, 2010.
8. Nasu J, Murakami K, Miyagawa S, Yamashita R, Ichimura T, Wakita T, Hotta H, Miyamura T, Suzuki T, Satoh T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1. *J Cell Biochem.* 111: 676-685, 2010.
9. Moriishi K, Shoji I, Mori Y, Suzuki R, Suzuki T, Kataoka C, Matsuura Y. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology.* 52: 411-420, 2010.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。