

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
分担研究報告書

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

分担研究者 鈴木文孝 国家公務員共済組合連合会虎の門病院 肝臓センター 医長

研究要旨;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。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。C 型慢性肝炎では、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。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎の治療の主体は、Pegylated Interferon (PEG-IFN) と Ribavirin (RBV) の併用療法である。しかし本邦で多い genotype 1b 型、高ウイルス量症例に対する PEG-IFN と RBV 併用48週間投与の完全著効 (SVR) 率は、40-50%で

あり、十分な治療効果を得ていない。そこで新規治療薬であるプロテアーゼ阻害剤と PEG-IFN+RBV 併用療法の臨床研究が行われた。このプロテアーゼ阻害剤の成績と効果に関係するウイルス側因子、生体側因子についても検討し

た。

B型慢性肝疾患の治療は、インターフェロン(IFN)と核酸アナログ製剤が中心である。IFN療法は35歳以上の症例には効果が少ないため、35歳以上の症例では、核酸アナログ製剤の使用が主体となっている。核酸アナログ製剤は、抗ウイルス効果が高く、副作用も少ないため多くの症例で使用されている。しかし核酸アナログ製剤の長期使用においては薬剤耐性ウイルスの出現が認められる。現在までに本邦で使用されている核酸アナログ製剤にはラミブジン、アデフォビル、エンテカビル の3種類がある。このうちラミブジンの単独投与は高率に耐性ウイルスの変異を認めるが、ラミブジン単独投与中にアデフォビルまたはエンテカビルの耐性ウイルスが出現する症例がある。さらにラミブジン耐性ウイルスに対するアデフォビル併用療法中に両剤耐性ウイルスが出現する症例がある。さらに多剤耐性ウイルスに対する治療成績も明らかになっていない。このような多剤耐性ウイルス出現例の頻度とその後の治療経過について検討した。

B. 研究方法

虎の門病院にて Telaprevir (MP-424)とPEG-IFN+RBV 併用療法 12週間投与(T12PR12)を施行した 20例と24週間投与(T12PR24 ; Telaprevir (MP-424)とPEG-IFN+RBV 併用療法 12週間投与しその後PEG-IFN+RBV 併用療法 12週間を継続)を施行した 61例において効果とウイルス側因子、生体側因子について検討した。さらに前治療無効例において3者併用療法を施行した症例の治療効果と耐性ウイルスについて検討した。

また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アデフォビルまたはエンテカビル耐性ウイルスの出現率を390例で検討した。またラミブジン耐性ウイルスに対してアデフォビル使用した症例でのアデフォビル耐性ウイルス出現についても検討した。さらにその後DNA上昇を認めた症

例でエンテカビルまたはテノフォビル使用の成績を検討した。

(倫理面への配慮)

臨床試験の目的・方法、副作用、患者に関する個人情報 の守秘義務、患者の権利保護等について説明し同意を文章または口頭にて取得し研究を行った。

C. 研究結果

(1) Telaprevir (MP-424)とPEG-IFN+RBV 3者併用療法 の成績と治療効果に 関係する因子

T12PR12 の治療の SVR 率は、naïve 例 70%、IFN 単 独 無 効 例 33%、PEG+RBV の NVR(non-responder;null)は 0%であった。一方 T12PR24 の治療の 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多変量解析では、*IL28B* の遺伝子多型(SNP;rs8099917 が major homo)と HCV Core aa70 番の置換(wild type)が抽出された。また投与中の Hb 値に関しては、*ITPA* gene の SNP (rs1127354)が major homo の症例で治療開始2週目、4週目で有意に低下していた。4週目に Hb 値が11g/dL 未満に低下することに関 係する因子は、性別(女性)、BMI(23 以下)、*ITPA* gene(CC genotype)、年齢(50 歳以上)であった。

次に、前回治療無効群における Telaprevir+PEG-IFN+RBV の3者併用療法施行 15例についてウイルス学的検討を行った。この群は、前治療無効例であるためウイルス学的には HCV core aa70 は mutant が多く(57%)、*IL28B* は minor allele を持つ症例が 93%であった。15例中3者併用療法での SVR は4例、relapser が 9例、NVRが2例であった。SVR群の特徴は、男性が多く HCV RNA の陰性化時期は 2-6 週、HCV Core aa70 は全例 wild type、*IL28B* gene は1例が TT(major homo)、3例が TG、*ITPA* gene は全例 CC、PEG-IFN と Telaprevir の adherence は全例 100%であった。一方 RBV の adherence は 51-93%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。検出された耐性ウイルスのタイプは、V36A, T54S/A, A156S/T, T54S+R155K, T54S+A156S, V36M+R155K であった。検出時期は治療開始後 8-32 週(終了後8週)であった。

(2) ラミブジン単独投与中にアデフォビルまたはエンテカビル耐性ウイルスの出現した症例

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に耐性であると報告されている領域にアミノ酸変異を認めた。その内訳は、rtA181T が 6 例、rtA181T+rtM204I が 1 例、rtA181S が 1 例、rtL180M+rtS202G+rtM204V が 3 例、rtL180M+rtM204V/I+rtM250L が 2 例であった。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 2 例ではエンテカビルへの治療薬の変更が行われた。

(3) ラミブジン耐性ウイルスに対するアデフォビル併用療法における耐性ウイルスの検討

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認められた。全例 genotype C で rtA181T/S/V の変異を認めた。そのうち 1 例で rtA181T+rtN236T が認められた。これらうち 5 例で DNA 量の再上昇を認めた。2 例で治療法の変更が行われ 1 例ではエンテカビル+アデフォビル、1 例ではテノフォビルの投与が行われた。

(4) アデフォビル耐性ウイルスに対する治療の検討

上記 4 例の治療効果を検討した。2 例でエンテカビル単独への変更、1 例でエンテカビル+アデフォビル併用、1 例でテノフォビルの投与が行われた。エンテカビルを使用した 3 例ではその後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。

D. 考察

現在治療の基本である C 型慢性肝炎 (genotype 1b、高ウイルス量) に対する PEG-IFN と RBV 併用療法 48-72 週間投与の治療効果は 45-60% である。依然約半数の患者では SVR に至っていない。プロテアーゼ阻害剤である Telaprevir (MP-424) と PEG-IFN+RBV の 3 者併用療法は、高い SVR 率を認めている。この効果の予測因子には、*IL28B* の SNP と HCV core aa70 の置換が関係していることを報告した。(Hepatology; 2010; 52: 421-9) 3 者併用療法においてこれらの因子を測定することは、効果予測に重要なことである。さらに、この 3 者併用療法中に出現する Hb の低下 (2 週目、4 週目) には *ITPA* gene の SNP が関係することも明らかにした。(Hepatology; 2011; in press) したがって *ITPA* gene が CC genotype の場合は、貧血の出現に注意し慎重な減量が望まれる。

さらに、最も難治である PEG-IFN+RBV 併用療法無効例に対する 3 者併用療法の効果を検討した。4 例が SVR になったが、男性が多く、HCV Core aa70 は全例 wild type、*IL28B* gene は TT の 1 例は SVR、PEG-IFN と Telaprevir の adherence は全例 100% であった。またウイルス学的には、治療前から Telaprevir 耐性ウイルスを認めた症例は再燃 (relapse) した。また relapser および NVR の 1 1 例中 9 例で Telaprevir 耐性ウイルスが検出され、治療効果低下の原因と考えられた。

B 型慢性肝疾患の治療は、核酸アナログ製剤の投与が主体となっているが、長期投与は耐性ウイルスの出現をもたらす。とくにラミブジンは、YMDD motif 以外の rt 領域にも種々の変異を起こす。今回の我々の検討では、頻度は少ないもののアデフォビルまたはエンテカビル耐性と関係する変異が認められた。このような症例では、アデフォビルまたはエンテカビルの効果が少ない。このような多剤耐性ウイルスが認められた症例で

は新規の抗ウイルス剤(テノフォビルなど)の効果が期待される。

E. 結論

C型慢性肝炎に対する新規薬剤である Telaprevir と PEG-IFN+RBV の3者併用療法 24 週間投与の治療効果は高い。また効果予測には *IL28B* の SNP と Core 領域のアミノ酸置換が関係する。また難治例である PEG-IFN+RBV での NVR 例に対する Telaprevir と PEG-IFN+RBV 併用療法では、十分な薬剤の投与量が必要であり Core 領域のアミノ酸置換も重要な因子である。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。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1.論文発表

1. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to Telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology*. 2010;52:421-9.
2. Kawamura Y, Arase Y, Ikeda K, Hirakawa M, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Yatsuji H, Sezaki H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Kumada H. Diabetes enhances hepatocarcinogenesis in noncirrhotic, interferon-treated hepatitis C patients. *Am J Med*. 2010 ;123:951-956.
3. Kawamura Y, Ikeda K, Hirakawa M, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y,

Arase Y, Kumada H. New classification of dynamic computed tomography images predictive of malignant characteristics of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2010;40:1006-14.

4. Ikeda K, Kobayashi M, Seko Y, Imai N, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Saitoh S, Suzuki F, Suzuki Y, Arase Y, Kumada H. Administration of interferon for two or more years decreases early stage hepatocellular carcinoma recurrence rate after radical ablation: A retrospective study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatol Res*. 2010 ;40:1168-75.
5. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. HBcrAg is a predictor of post-treatment recurrence of hepatocellular carcinoma during antiviral therapy. *Liver Int*. 2010;30:1461-70.
6. Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, Yatsuji H, Sezaki H, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Kumada H. Efficacy of switching to entecavir monotherapy in Japanese lamivudine-pretreated patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25:892-8.
7. Arase Y, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Kawamura Y, Kobayashi M, Hosaka T, Yatsuji H, Hirakawa M, Matsumoto N, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Efficacy and safety of combination therapy of natural human interferon beta and ribavirin in chronic hepatitis C patients with genotype 2 and high virus load. *Intern Med*. 2010;49:965-70.
8. Arase Y, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Kawamura Y, Kobayashi M,

- Hosaka T, Yatsuji H, Hirakawa M, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Efficacy and safety of combination therapy of natural human interferon beta and ribavirin in chronic hepatitis C patients with genotype 1b and high virus load. *Intern Med.* 2010;49:957-63.
9. 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). *Hepato Res.* 2010;40:347-68.
 10. Akuta N, Suzuki F, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kumada H. Extending combination therapy with peginterferon plus ribavirin for genotype 2 chronic hepatitis C virological responders: a pilot study of 7 cases. *Intervirology.* 2010;53:188-92.
 11. Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region of genotype 1b affect very early viral dynamics during treatment with telaprevir, peginterferon, and ribavirin. *J Med Virol.* 2010;82:575-82.
 12. Hashimoto Y, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Saito S, Suzuki Y, Kobayashi M, Arase Y, Ikeda K, Kumada H. Clinical and virological effects of long-term (over 5 years) lamivudine therapy. *J Med Virol.* 2010;82:684-91.
 13. Kumada H, Okanoue T, Onji M, Moriwaki H, Izumi N, Tanaka E, Chayama K, Sakisaka S, Takehara T, Oketani M, Suzuki F, Toyota J, Nomura H, Yoshioka K, Seike M, Yotsuyanagi H, Ueno Y; The Study Group for the Standardization of Treatment of Viral Hepatitis Including Cirrhosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Guidelines for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis due to hepatitis C virus infection for the fiscal year 2008 in Japan. *Hepato Res.* 2010;40:8-13.
 14. Kumada H, Okanoue T, Onji M, Moriwaki H, Izumi N, Tanaka E, Chayama K, Sakisaka S, Takehara T, Oketani M, Suzuki F, Toyota J, Nomura H, Yoshioka K, Seike M, Yotsuyanagi H, Ueno Y; The Study Group for the Standardization of Treatment of Viral Hepatitis Including Cirrhosis, Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan. Guidelines for the treatment of chronic hepatitis and cirrhosis due to hepatitis B virus infection for the fiscal year 2008 in Japan. *Hepato Res.* 2010;40:1-7. Suzuki Y, Ikeda K, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Akuta N, Kobayashi M, Suzuki F, Saitoh S, Arase Y, Kobayashi M, Miyakawa Y, Kumada H. Association of HLA-DR14 with the treatment response in Japanese patients with autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2010;55:2070-6.
 15. Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Sezaki H, Hosaka T, Kawamura Y, Yatsuji H, Hirakawa M, Ikeda K, Hsieh SD, Oomoto Y, Amakawa K, Kato H, Kazawa T, Tsuji H, Kobayashi T, Kumada H. Virus clearance reduces bone fracture in postmenopausal women with osteoporosis and chronic liver disease caused by hepatitis C virus. *J Med Virol.* 2010;82:390-5.
 16. Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Hosaka T, Sezaki H, Kobayashi M, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Watahiki S, Mineta R, Iwasaki S,

- Miyakawa Y, Kumada H. Influence of amino-acid polymorphism in the core protein on progression of liver disease in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. *J Med Virol.* 2010 ;82:41-8.
17. Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Yatsuji H, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S, Mineta R, Iwasaki S, Kumada H. Sustained virological response in a patient with chronic hepatitis C treated by monotherapy with the NS3-4A protease inhibitor telaprevir. *J Clin Virol.* 2010;47:76-8.
18. Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Yatsuji H, Hosaka T, Sezaki H, Kobayashi M, Kawamura Y, Suzuki Y, Arase Y, Ikeda K, Mineta R, Iwasaki S, Watahiki S, Kumada H. Correlation of YMDD mutation and breakthrough hepatitis with hepatitis B virus DNA and serum ALT during lamivudine treatment. *Hepatology Res.* 2010;40:125-34.
19. Hosaka T, Suzuki F, Kobayashi M, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Akuta N, Suzuki Y, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Miyakawa Y, Kumada H. Development of HCC in patients receiving adefovir dipivoxil for lamivudine-resistant hepatitis B virus mutants. *Hepatology Res.* 2010;40:145-52.
20. 八辻寛美、鈴木文孝、平川美晴、川村祐介、瀬崎ひとみ、保坂哲也、芥田憲夫、小林正宏、鈴木義之、斉藤 聡、荒瀬康司、池田健次、岩崎里美、峰田理恵、綿引祥予、小林万利子、熊田博光。核酸アナログ未使用の B 型慢性肝炎症例へのエンテカビル治療中に rtA181T 変異ウイルスが増殖した 1 症例。 *肝臓* 2010; 51: 196-198.
21. 小林 万利子、鈴木文孝、芥田憲夫、鈴木義之、瀬崎ひとみ、八辻寛美、保坂哲也、小林正宏、川村祐介、平川美晴、荒瀬康司、池田健次、峰田理恵、岩崎里美、綿引祥予、中村祐輔、茶山一彰、熊田博光。 *IL28B* と HCV Core aa70 置換との関係。 *肝臓* 2010; 51: 322-323.
22. 瀬崎ひとみ、鈴木文孝、芥田憲夫、平川美晴、川村祐介、八辻寛美、保坂哲也、小林正宏、鈴木義之、斉藤 聡、荒瀬康司、池田健次、熊田博光。 C 型慢性肝炎に対するペグインターフェロンとリバビリン併用療法における NS3-4A プロテアーゼ阻害剤(Telaprevir)併用 12 週間治療のウイルス学的効の検討。 *肝臓* 2010; 51: 394-396.
- 2.学会発表
1. 鈴木 文孝、芥田 憲夫、熊田 博光。シンポジウム 1: C 型慢性肝炎に対する PEG-IFN+RBV+Telaprevir (MP-424)の治療成績及び PEG-IFN+RBV 併用療法における *IL28B* 遺伝子多型と効果の関係、第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010.5.27.
2. 鈴木 文孝、鈴木 義之、熊田 博光。ワークショップ 8: B 型慢性肝炎に対するエンテカビル治療の効果と耐性ウイルスの検討、第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010.5.28.
3. 鈴木 文孝、鈴木 義之、熊田 博光。ワークショップ 19:C 型慢性肝炎の治療効果に関係するウイルス側、生体側因子の検討、第 52 回日本消化器病学会大会、JDDW、横浜、2010.10.15.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
今回の研究内容については特になし。

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

分担研究者 中川 美奈 東京医科歯科大学・消化器内科・助教

研究要旨：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い、以下の結果を得た。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。以上より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。

A. 研究目的

C型慢性肝炎に対するインターフェロ(IFN)を基軸とした治療は、IFN治療不応例や、再燃例により治療効果はいまだ十分とはいえない。IFN治療抵抗性に関わる分子の特定は、治療効果の事前予測に利用できる可能性があると同時に、新規薬剤の開発につながる可能性があることから、HCVコア蛋白変異株培養系を用いた解析を通じてIFN治療抵抗性に関する因子の検討を行った。

B. 研究方法

(1) HCV-JFH1プラスミドに、臨床的にIFN抵抗性が指摘されているコアアミノ酸70番変異および91番変異、さらに既報によりウイルス粒子の形成を認めなかった77-80番アミノ酸の変異株をnegative controlとして作成した。

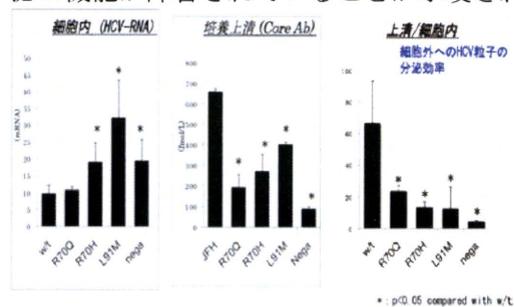
(2) 合成したHCV-RNAをHuh7細胞中に導入し、培養上清中のコア抗原および上清・細胞内のHCV-RNA、コア蛋白を測定した。

(3) HCVコア野生株と変異株のIFN感受性を比較し、種々のIFN誘導遺伝子(ISG)、SOCS、ERストレス蛋白を検出、比較した。

なお本研究は東京医科歯科大学組み換えDNA実験安全管理規定に準拠して行われる。また、ヒトの細胞および組織を用いた研究にあたっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」に準じて当該施設倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得た上で、人権及び利益の確保を行うよう配慮する。

C. 研究結果

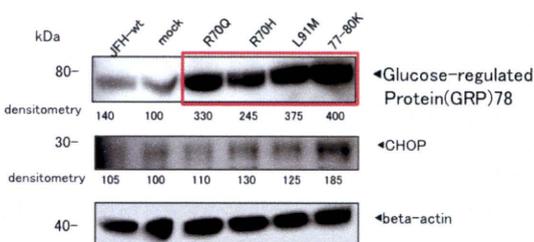
1) HCVコア蛋白変異株ではウイルス細胞内のRNA合成は野生株と比較し同等もしくは亢進していたが、細胞外へのウイルス粒子の放出、分泌効率は低下しており、コア変異株ではウイルス複製以降の粒子形成や分泌の機能が障害されていることが示唆された。



2) 細胞内のウイルス蛋白の発現量をウェスタンブロッティングで評価したところ、コア変異株では野生株に比較してコア蛋白の発現増強を認めた。

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ISG発現低下をみた。

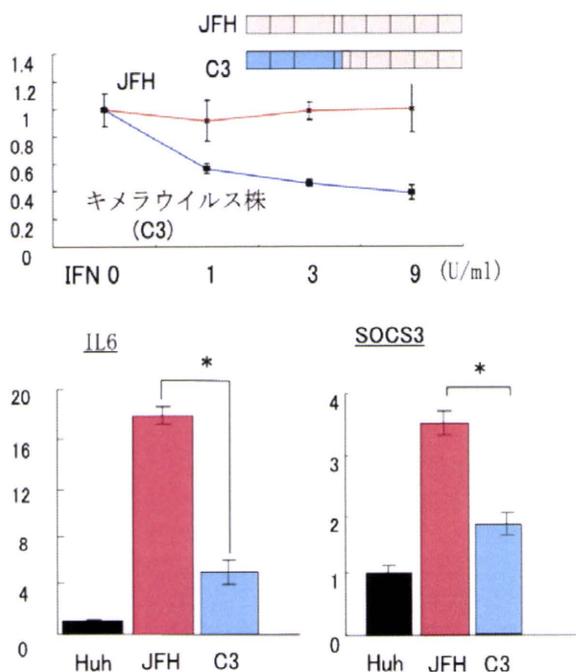


厚生労働科学研究費補助金（肝炎緊急対策研究事業）
分担研究報告書

C. 研究結果（つづき）

5) HCVレプリコンシステムの検討ではIFN治療抵抗株ではSOCS3、IL-6発現が亢進していた。臨床検体で治癒例と非治癒例を比較すると、非治癒治療抵抗例でIL-6が持続高値であることが確認された。

(Suda, *Virology*, 2010)



D. 考察

生体内の防御機構とHCVウイルス蛋白の相互作用がウイルス排除あるいは持続感染に関与していると考えられているが、IFN治療抵抗性に強く関与しているIL28B宿主遺伝子多型がISG発現に強い相関があるとも報告されている(Honda 2010, *Gastroenterology*)。本研究の結果から、コア変異株ではウイルス複製以降の粒子形成や分泌の機能が障害されているために、細胞内のHCV蛋白が蓄積し、ERストレスが惹起されていることが示唆される。また、ERストレスに関連する何らかのシグナルを介して持続高値となったIL-6によりIFNシグナル系やインスリンシグナル系の抑制因子であるSOCS3の発現亢進がもたらされ、IFN応答性の低下、インスリン抵抗性をはじめとした各種代謝異常がもたらされるものと推測される。

E. 結論

IFN抵抗性の分子機構について、治療抵抗株であるコア変異株を用いた解析よりERストレスの関与が考えられる。IL6持続高値による各種シグナル系の破綻やERストレスの病態、発癌への関与については引き続き培養細胞および臨床検体を用いて検討を行う予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mina Nakagawa, Naoya Sakamoto, Yasuhito Tanaka, Yuko Sekine-Osajima, Mayumi Ueyama, Masayuki Kurosaki, Nao Nishida, Akihiro Tamori, Yuki Nishimura-Sakurai, Yasuhiro Itsui, Seishin Azuma, Sei Kakinuma, Shuhei Hige, Yoshito Ito, Eiji Tanaka, Yoichi Hiasa, Namiki Izumi, Katsushi Tokunaga, Masashi Mizokami, Mamoru Watanabe: Association of IL28B polymorphism with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy in patients with chronic genotype 2 hepatitis C. *J Medical Virol* 2010; in press.
2. Machi Yamamoto, Naoya Sakamoto, Tetsuya Nakamura, Yasuhiro Itsui, Mina Nakagawa, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Seishin Azuma, Takanobu Kato, Takaji Wakita and Mamoru Watanabe: Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatology Research* 2011; in press.
3. Naoya Sakamoto, Yasuhito Tanaka, Mina Nakagawa, Hiroshi Yatsushashi, Shuhei Nishiguchi, Nobuyuki Enomoto, Seishin Azuma, Yuki Nishimura-Sakurai, Sei Kakinuma, Nao Nishida, Katsushi Tokunaga, Masao Honda, Kiyooki Ito, Masashi Mizokami and Mamoru Watanabe: ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon-a and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Res* 2010; 40: 1063-1071
4. Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Asahina Y, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Watanabe M, Sakai A, Honda M, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M: Pretreatment Prediction of Response to Pegylated-Interferon Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C using Genetic Polymorphism in IL28B and Viral Factors. *J Hepatol* 2010 in press
5. 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*. 407: 80-90, 2010
6. 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*. 405: 361-369, 2010

7. Karakama Y, Sakamoto N, Itsui Y, Nakagawa M, Tasaka-Fujita M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Oooka M, Azuma S, Tsuchiya K, Onogi H, Hagiwara M, Watanabe M: Inhibition of HCV replication by a specific inhibitor of serine-arginine-rich protein kinase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 3179-3186, 2010
8. Nakagawa M, Sakamoto N, Ueyama M, Mogushi K, Nagaie S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka H, Enomoto N, and 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 infection. **J Gastroentero** 2010; 45(6):656-65

2. 学会発表

1. 第46回日本肝臓学会総会一般(0-218) 優秀演題、C型慢性肝炎のインターフェロン治療効果とIL28B遺伝子多型の解析、2009. 5. 28. 山形
2. 第46回日本肝臓学会総会シンポジウム(S1-11) ウイルス遺伝子および宿主IL28B遺伝子情報を統合したC型慢性肝炎治療のオーダーメイド化、2009. 5. 27. 山形
3. 第46回日本肝臓学会総会一般(0-246)、C型慢性肝炎のPEGインターフェロン治療効果と治療後発癌に関する検討、2009. 5. 28. 山形
4. 第14回日本肝臓学会大会(JDDW2010)ポスター(P-56) 優秀演題、C型慢性肝炎のインターフェロン治療効果とIL28B遺伝子多型の解析、2010. 10. 13. 横浜
5. 第14回日本肝臓学会大会(JDDW2010)パネルディスカッション(PD7-6)、C型慢性肝炎患者におけるインターフェロン治療効果におけるインターロイキン-6 (IL-6) の関与、2010. 10. 13. 横浜
6. 第38回日本肝臓学会東部会パネルディスカッション(PD2-2)、ウイルスおよび宿主遺伝子情報に基づくC型慢性肝炎の治療戦略、2010. 12. 3. 東京
7. 第38回日本肝臓学会東部会シンポジウム(S2-6)、IL28B遺伝子多型と治療抵抗性ウイルス変異からみたC型慢性肝炎の治療抵抗メカニズムの解析、2010. 12. 2. 東京
8. The 7th APASL Single Topic Conference
“Hepatitis C” Poster Award,
IL-28B SNPs and HCV genetic profiles are significant predictors of PEG-interferon plus ribavirin treatment outcomes,
Dec. 17. 2010. Chiba, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特記すべきことなし

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

分担研究者 加藤 直也 東京大学医科学研究所疾患制御ゲノム医学ユニット

特任准教授

研究要旨

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。その結果、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。

A. 研究目的

C 型慢性肝炎の標準治療として、ペグインターフェロンとリバビリンの併用療法が行われている。ジェノタイプ（セロタイプ）1 型高ウイルス量症例では、その奏功率はたかだか 50%に過ぎないが、治療抵抗性を規定するウイルス側因子として、コアタンパク第 70 番目アミノ酸の置換が重要であることが明らかになっている。すなわち、野生型アミノ酸（Arg）を有する患者では、変異型アミノ酸（Gln）を有する患者より EVR（early virological response）や SVR（sustained virological response）率が高い。しかしながら、野生型 HCV と変異型 HCV では本当にペグインターフェロン、リバビリン併用療法に対する感受性が異なるかどうかについては未だ明らかではない。そこで、1) まず、Taqman MGB (minor groove binding) probe を応用した real-time PCR 法により、コアタンパク第 70 番目アミノ酸野生型および変異型を個別に高感度に定量する系を確立する、2) ペグイ

ンターフェロン、リバビリン併用療法を受ける患者において、治療前の野生型および変異型 C 型肝炎ウイルスの存在状態を明らかにする、3) また、ペグインターフェロン、リバビリン併用療法治療中および治療後（再燃例）の野生型および変異型 C 型肝炎ウイルスの個別の動態を明らかにする、4) 野生型および変異型コアタンパクの機能を明らかにする、ことを目的とした。

B. 研究方法

まず、C 型肝炎ウイルスコアタンパク第 70 番目アミノ酸の Arg→Gln 変異を高感度に検出・定量する系を Taqman MGB probe を用いた real time PCR 法にて確立する。その感度や特異度を野生型および変異型コアをインサートとして有するプラスミドを鋳型として検証する。次に、本定量法を用いて、ペグインターフェロン、リバビリン併用療法を受ける C 型慢性肝炎患者における野生型（Arg）および変異型（Gln）の存在状態を明らかに

する。加えて、野生型と変異型の両者を有するペグインターフェロン、リバビリン併用療法を受けた C 型慢性肝炎患者での野生型および変異型の個別の動態につき解析し、治療効果との関連につき検討する。最後に、再燃した症例における野生型と変異型の C 型肝炎ウイルスの動態につき検討する。

また、野生型と変異型のコアタンパクを肝癌細胞株に発現させ、インターフェロン α や IL-28B シグナル伝達経路に及ぼす影響や、アポトーシスに及ぼす影響を解析する。

(倫理面への配慮)

C 型肝炎患者血清を用いた本解析については、東京大学の倫理委員会の承認を受けている。また、C 型肝炎患者からは書面による同意を得ている。検体は匿名化され、個人情報厳格に保護される。

C. 研究結果

Taqman MGB probe を用いた real time PCR 法による C 型肝炎ウイルスコアタンパク第 70 番目アミノ酸野生型と変異型の個別高感度定量法を開発した。野生型 MGB probe の検出感度は 5 コピー中の 50%、50 コピー中では 10%、変異型 MGB probe の検出感度は 5 コピー中の 50%、50 コピー中では 10% であった。

ペグインターフェロン、リバビリン併用療法を行った 36 例の C 型肝炎患者において、治療前血清を用いて野生型と変異型の存在比率を検討したところ、実に 36 例中 26 例 (72%) が野生型と変異型の両者を有する混在型であった。

ペグインターフェロン、リバビリン併用療法の治療効果を検討したところ、変異型の比率が高くなるほど、併用療法による EVR およ

び SVR が得られにくいことが明らかとなった。

野生型と変異型の両者を有する患者において、その治療中の動態を解析したところ、ペグインターフェロン、リバビリン併用療法により、ウイルスが減少した症例では、野生型、変異型の両者共に減少したが、減少率は野生型と変異型で変わりがなく、初期の野生型および変異型 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感受性は同等と考えられた。

また、併用療法によりウイルスが減少しなかった症例でも、両者の比率には変化がなかった。

ところが、再燃例の解析で、治療前・治療中には野生型が優位であったにもかかわらず、再燃早期 (治療終了後第 4 週前後) では、変異型 C 型肝炎ウイルスが優位になっていることが認められた。すなわち、変異型 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の感受性は野生型と同等であるが、野生型より排除されにくい性質を有する可能性が示唆された。

そこで、野生型および変異型のコアタンパクを Huh7 細胞に発現させ、1) インターフェロン α シグナル伝達経路に及ぼす影響、2) IL-28B シグナル伝達経路に及ぼす影響、3) アポトーシスに及ぼす影響、につき検討した。既報に反し、野生型、変異型のコアタンパク共、インターフェロン α および IL-28B シグナル伝達経路を僅かに活性化したが、その活性化の程度に差はなかった。また、アポトーシス関連分子の発現誘導に両者の違いはなかった。

D. 考察

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。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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chang J-H, Kato N, Muroyama R, Taniguchi H, Guleng B, Dharel N, Shao R-X, Tateishi K, Jazag A, Kawabe T, Omata M. Double-stranded-RNA-activated protein kinase inhibits hepatitis C virus replication but may be not essential in interferon treatment. *Liver Int* 2010; 30: 311-318
- 2) 加藤直也, 室山良介. 今後有望なウイル

ス肝炎の新規治療薬. *medicina* 2010; 47 (3): 2010-2013.

- 3) 加藤直也, 室山良介. C型肝炎の近未来治療. *Medical Science Digest* 2010; 36 (8): 916-919.

2. 学会発表

- 1) 加藤直也, 室山良介, 五藤 忠. C型肝炎ウイルスコア領域 70 の置換によりペグインターフェロン/リバビリン併用療法に対する感受性は変わるか? 第46回日本肝臓学会総会. 2010/5/27. 山形
- 2) 加藤直也. C型肝炎の治療～最新の話～. 第12回東葛ペガシス研究会. 2010/5/20. 柏
- 3) Kato N. Quantification of hepatitis C virus genotype 1b codon 70 wild and mutant types and their response to PEG-IFN/RBV treatment. BIT's 1st Annual Inaugurate. Symposium of Hepatitis (SHV-2010). 2010/8/1. Busan, Korea
- 4) 加藤直也. 東大医科研病院における消化器疾患の病診連携の取り組み～肝臓病の最新の話と共に～. 第2回肝疾患を研鑽する会. 2010/7/7. 東京
- 5) Kato N. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. 2010/7/9. GuangZhou, China
- 6) Kato N. Viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. 2010/7/12. Yichang, China
- 7) 加藤直也. 確かな知識があなたを救う肝臓病. 東京大学医科学研究所附属病院市民公開医療懇談会. 2010/8/25. 東京
- 8) Li W, Muroyama R, Hu Z, Kowatari N, Goto T, Chang J-H, Yoshida H, Omata M, Koike K, Kato N. Amino acid substitutions in genotype 1b HCV core protein and

response to PEG-IFN/RBV treatment. 17th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2010/9/10-14. Yokohama, Japan

9) 加藤直也. 元気が出るウイルス肝炎と肝癌の話. 2010/10/26. 横浜

10) 加藤直也. C型肝炎とはどんな病気? 第1回疾患医科学ミニシンポジウム. C型肝炎の最前線～基礎と臨床～. 2010/10/28. 東京

11) 加藤直也. 最新のC型肝炎治療. 肝臓病医療講演会. 2010/11/27. 東京

12) Li W, Muroyama R, Hu Z, Kowatari N, Goto T, Yoshida H, Li Q, Omata M, Koike K, Kato N. Mutant ratio of amino acid 70 in genotype 1b HCV core protein is associated with response to PEG-IFN/RBV treatment. 2010/12/17-18. Chiba, Japan

13) 加藤直也, Kumar V, 室山良介, 古渡礼恵, 李 雯雯, 大塚基之, 建石良介, 吉田晴彦, 小池和彦, 小俣政男, 中村祐輔, 松田浩一. ゲノムワイド関連解析によるC型肝炎における肝発癌関連遺伝子の同定. 第18回浜名湖シンポジウム. 2010/12/25-26. 浜松

14) 加藤直也. C型肝炎研究最新の話題－治療と発癌－. 第5回 Tama Liver Forum. 2011/1/22. 東京

15) Li W, Muroyama R, Hu Z, Kowatari N, Goto T, Yoshida H, Li Q, Omata M, Koike K, Kato N. Core mutant ratio is associated with response to PEG-IFN/RBV treatment in HCV genotype 1b patients. The 21st conference of the asian pacific association for the study of the liver (APASL). 2011/2/17-20. Bangkok, Thailand

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

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

分担研究者 加藤 宣之 岡山大学 教授

研究要旨: 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)を用いて実験を行い、以下に示すような成果を得た。(1)全長 HCV RNA 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。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス(HCV)の感染は肝がん患者の8割に認められており、HCV の持続感染状態である C 型慢性肝炎は肝細胞のがん化の重要な因子である。肝発がんを予防するためには、HCV を体内から排除して持続感染状態を脱することが必須である。しかしながら、C 型慢性肝炎に対する有効な治療薬はインターフェロン(IFN)しかなく、ペグ IFN とリバビリン(RBV)との併用療法により半数は治癒するようになったものの依然として残りの半数は現行治療に抵抗性を示す。本研究は、HCV がどのような分子機構により IFN や RBV に耐性を示すのかを明らかにすることを目的とした。IFN については、これまで HuH-7 細胞株由来の全長 HCV RNA 複製細胞(遺伝子型 1b の O 株)を用いて研究を行い、IFN- α に抵抗性を示す細胞内で複製している HCV 分子種は遺伝的に均一化する傾向にあることをこれ迄に示

している。その一方で、IFN- α 抵抗性の獲得には、HCV 側と宿主側因子の両方が関与していることを示唆する結果も得た。

2008 から 2009 年にかけて、我々は従来の HCV 研究に多用されてきたヒト肝癌細胞株 HuH-7 とは遺伝的背景も異なるヒト肝癌細胞株 Li23 を用いて遺伝子型 1b で O 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞(OL8 や OL11 細胞など)を開発した。抗 HCV 活性の簡便な定量的アッセイ系(ORL8 と ORL11)も開発して、各種抗 HCV 剤の評価を行った。その結果、HuH-7 由来のアッセイ系(OR6 細胞)で得られていた各種抗 HCV 剤の活性は、IFN- α やスタチン剤を含めて多くの場合、Li23 由来の ORL8 や ORL11 アッセイ系の方で高いことが分り、ORL8 や ORL11 は優れたアッセイ系であることが示唆された。特に RBV については、OR6 アッセイ系では EC₅₀ 値が 100 μ M 以上であったのとは対照的に、ORL8 や ORL11 アッセイ系で

はそれぞれ 8.7 μM と 15.9 μM となり患者血中濃度附近の値が得られた。そこで、我々は IFN- α や RBV に感受性の高い Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞からそれぞれの薬剤に抵抗性を示す細胞株を得ることができれば、これらの薬剤の耐性機構を解明できるのではないかと考え、今年度、以下に示すような実験を行った。

B. 研究方法

(1) Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株から IFN 抵抗性株の樹立

全長 HCV RNA 複製細胞株である OL8, OL11 および OL14 細胞 (それぞれ 2×10^4 個) を 10 cm プレートに播き、翌日 IFN- α (0, 50 および 100 IU/ml) を添加した。4 日ごとに IFN- α を添加しながら G418 存在下培養した。最初のプレートはそれぞれ 2 枚 (染色用と得られると予想される細胞コロニーの増殖用) 用意した。比較対照として HuH-7 由来の全長 HCV RNA 複製細胞である O 細胞も同様に IFN- α にて処理をした。

HCV の遺伝的多様性と IFN- α 抵抗性との関係を調べるため、2 年間継代培養した OL8(2Y)、OL11(2Y) および OL14(2Y) 細胞についても同様に IFN- α

処理を行った。また、比較対照として、HuH-7 由来の O 細胞を 2 年間継代培養した O(2Y) 細胞も用いた。1 プレートについては、IFN- α 投与を開始してから 26 日目に出現したコロニーをクマシーブリリアントブルー (CBB) にて染色した。残りのプレートについては、それぞれの細胞株ごとに細胞をプールして増殖させ IFN 抵抗性機構についての実験解析用とした。

(2) RBV の抗 HCV 活性の作用機序の解析

ORL8 細胞と OR6 細胞をそれぞれ 10 cm プレート 4 枚に培養して、全体として約 5×10^6 個相当になった時点で、RBV (最終濃度 50 μM) を添加、8 時間後に、トリク

ロ酢酸 (TCA) 抽出法により細胞内のヌクレオチドを抽出し HPLC 解析を行った。RBV を加えない場合を対照サンプルとした。それぞれの細胞で得られた GTP のピークの定量を行った (岡山大学薬学部の綿矢有佑教授、平本晃子助教、就実大学薬学部の平岡修准教授との共同研究)。

(3) Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株から RBV 抵抗性の樹立

全長 HCV RNA 複製細胞である ORL8 や OL8 ならびに OL8(2Y) や OL11(2Y) 細胞に RBV を数日ごとに添加し (1 μM から濃度を徐々に上げて添加していく方法と 50 μM 或は 100 μM の一定濃度を添加する方法)、RBV に抵抗性になるかどうかを検討した。検討方法として ORL8 細胞の場合は、定期的にルシフェラーゼ活性を測定して、RBV の EC_{50} 値が上昇してくるかどうかを調べた。また、OL8 や OL8(2Y) 細胞の場合は、G418 存在下で RBV を連続添加して、G418 耐性のコロニーの単離を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究においては、実験及び解析に用いた材料は全てこれまでに確立されているものであり、本年度の研究にはヒトの臨床材料を用いたものがない。そのために倫理面への特段の配慮はなかった。但し、実験に使用した細胞および核酸については蒸気滅菌を施した後に廃棄した。

C. 研究結果

(1) Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株から IFN 抵抗性株の樹立

Li23 由来の OL8 や OL11 細胞では、以前 HuH-7 由来の O 細胞で観察されたように、IFN- α を連続的に投与した場合においても G418 耐性のコロニーが出現した。こ

これらの細胞コロニーは IFN 抵抗性の形質を有するものと判断した。OL8 細胞では O 細胞と同程度にプレートあたり数十個の G418 耐性コロニーが得られた。しかし、OL11 細胞では、2,3 個と少なく、OL14 細胞ではまったく得られなかった。これらの結果から、細胞クローンにより IFN- α に対する感受性が異なることが分った。

2年間継代培養した OL8(2Y)、OL11(2Y) および OL14(2Y)細胞を用いた場合は、樹立時の OL8 細胞などを用いた場合に得られた結果とは一部異なる結果が得られた。以前の結果では、HuH-7 由来の O 細胞を 2年間継代培養した O(2Y)細胞では IFN- α 抵抗性のコロニーが O 細胞より多く認められるようになることが分っていた。しかしながら、今回 OL8(2Y)細胞を用いた場合は OL8 細胞と比べて得られた IFN- α 抵抗性のコロニー数は O(2Y)細胞の場合とは逆に顕著に低下し、プレートあたりわずか 1-2 個であった。それとは対照的に OL11(2Y)細胞では OL11 細胞と比べて IFN- α 抵抗性のコロニー数は増加した。それでも、プレートあたり 10 個程度であった。OL14(2Y)細胞は OL14 細胞の場合と同様、IFN- α 抵抗性コロニーはまったく得られなかった。

OL8、OL11、OL8(2Y)および OL11(2Y)細胞から得られた IFN- α 抵抗性の細胞コロニーをそれぞれプールしてオリゴクローナルな細胞集団として細胞を増殖させた。今後、これらの細胞の性質および HCV の遺伝的解析を行う予定である。

(2) RBV の抗 HCV 活性の作用機序の解析

最近、我々は ORL8 細胞で観察された

RBV の顕著な抗 HCV 活性がグアノシンの添加によりキャンセルされることを見出した。この現象から、我々は RBV の抗 HCV 活性はイノシンーリン酸脱水素酵素 (IMPDH) が阻害され、それに伴い GTP のレベルが急速に低下することに起因するのではないかと考えた。IMPDH 特異的 siRNA を用いて ORL8 細胞における IMPDH の機能を阻害すると、細胞内の HCV RNA の複製レベルが顕著に低下することも確認した。

そこで、我々は、RBV 処理により細胞内の GTP 量が実際に低下することを実験的に確かめることとした。RBV の抗 HCV 活性が顕著な ORL8 細胞と RBV の抗 HCV 活性があまり観察されない HuH-7 由来の OR6 細胞について、RBV 添加後に細胞内のヌクレオチドを抽出して HPLC 法により GTP を定量する実験を行った。

ORL8 細胞と OR6 細胞に RBV (ORL8 細胞で EC₉₀ に相当する 50 μ M) を添加して 8 時間後に細胞からヌクレオチドを抽出し、HPLC 解析を行った。対照として、RBV を添加しない細胞を用いた。

その結果、ORL8 細胞では RBV 処理(8 時間)により GTP が約 60%低下することが明らかとなった。同条件での OR6 細胞における GTP の低下率は 30%弱であることから ORL8 細胞では GTP レベルが有意に低下することが示された。さらに、それに伴って、ORL8 細胞では IMP の蓄積が顕著に起っていることが明らかとなった。ORL8 細胞での IMP のレベルは RBV 添加前に比べて約 30 倍亢進した。これとは対照的に OR6 細胞では IMP レベルの顕著な上昇はほとんど認められなかった。

(3) Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株から RBV 抵抗性の樹立

ORL8 細胞に RBV を長期間添加して RBV 抵抗性株の樹立を試みた。まず、RBV を 1 μ M で 3日間処理して、その後 3日間 RBV をフリーにして培養、次に RBV を 2 μ M にして 3日間処理、そしてまた 3日間 RBV をフリーにするという操作を繰り返した。RBV を添加する際に濃度を 1 μ M ず

つ上昇させていくやり方で10 μM まで上昇させた。しかしながら、期待した程、RBV に対する EC_{50} 値は上昇せず、この方法では RBV 抵抗性の細胞株が得られないことが分った。

次に同様の行程ではあるが、RBV の濃度を最初から50 μM での処理を試みた。この場合でも、RBV 添加3、4回目位からルシフェラーゼ活性が下がってきてしまい、RBV に対する EC_{50} 値が上昇することはなかった。

これらの結果から、ORL8 細胞を断念して、ルシフェラーゼ遺伝子を含まない全長 HCV RNA 複製細胞である OL8 細胞や OL11 細胞を用いて、G418 存在下で RBV 処理をすることにより RBV 耐性コロニーを選択する方式で実験を行うこととした。別途、我々は OL8 細胞や OL11 細胞を2年間継代培養して、HCV の遺伝的多様性が増した細胞を得ていたため、これらの細胞を使う方が RBV 耐性株がとれる可能性が高まるのではないかと考えた。RBV の濃度も細胞毒性が顕著にならない限界濃度である 100 μM とし4日毎に培地交換を行う際に RBV を添加した。G418 存在下、26 日間培養した。

その結果、RBV を加えない場合には細胞は早期に confluent の状態になった。しかしながら、RBV 処理した細胞のほとんどは、RBV を添加し始めてから2週間ほどから接着性を失い、26 日目にはほとんど死滅した。しかしながら、G418 耐性コロニーとして OL8 細胞から3個のコロニー、OL11 細胞から10 数個のコロニーが得られた。これらのコロニーを単離して、G418 存在下増殖させた。その過程で脱落するコロニーもあった。最終的に OL8 細胞から1コロニー、OL11 細胞から10コロニーを RBV 抵抗性細胞株として得た。今後、これらの細胞の性質および HCV の遺伝的解析を行う予定である。

D. 考察

(1) Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株から IFN 抵抗性株の樹立

Li23 由来の OL8 細胞等からは、HuH-7 由来の細胞を用いた解析結果から予想されていたほどの IFN 抵抗性株が得られなかった。また、HCV の遺伝的多様性を生じていると考えられる2年間培養した細胞においても、予想外に IFN 抵抗性となったコロニー数が少なかった。HuH-7 細胞と Li23 細胞では最近明らかになっている IFN と RBV との併用療法における治療効果を規定すると考えられる IL28B の遺伝子多型が異なり、HuH-7 細胞では治療抵抗性、Li23 細胞では治療感受性の遺伝子型であった。この違いが、今回の実験において得られたような IFN 抵抗性コロニーの出現頻度の違いになっている可能性がある。

また、IFN 抵抗性コロニーとして得られて細胞株として樹立した細胞については、親株と比較することにより IFN に対する応答性の違いや複製している HCV 遺伝子の違いを解析する予定である。

(2) RBV の抗 HCV 活性の作用機序の解析

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。

(3) Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞株から RBV 抵抗性の樹立

今回、ORL8 細胞からは RBV 抵抗性細

胞株は得られなかったが、OL8(2Y)やOL11(2Y)細胞から容易に RBV 抵抗性細胞株が得られた。これは、HCV の遺伝的多様性が関与しているのか、あるいは使用した RBV の濃度(100 μM)が功を奏したのかは定かではない。この点を明らかにするためには、添加する RBV の濃度を低くして始めるとか、OL8 細胞を用いて同様の実験を行う必要がある。

今回、RBV 抵抗性コロニーとして得られて細胞株として樹立した細胞については、親株と再度比較することにより RBV に対する感受性にどの程度の違いがあるかを検討する予定である。また、RBV 抵抗性細胞において複製している HCV 遺伝子に RBV に特異的な変異が認められるかどうかについても検討する予定である。

E. 結論

今年度の成果として(1)Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞から 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 細胞では、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)Li23 由来の全長 HCV RNA 複製細胞(2年間継代培養した細胞)から RBV に抵抗性を示す細胞株を得た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Kato N. Gene expression profile of Li23, a new human hepatoma cell line that enables robust hepatitis C virus replication: Comparison with HuH-7 and other

hepatic cell lines. *Hepatol. Res.* 40:1248-1253 (2010).

- 2)Ikeda F, Dansako H, Nishimura G, Mori K, Kawai Y, Ariumi Y, Miyake Y, Takaki A, Nouse K, Iwasaki Y, Ikeda M, Kato N, Yamamoto K. Amino acid substitutions of hepatitis C virus core protein are not associated with intracellular antiviral response to interferon-α in vitro. *Liver Int.* 30:1324-1331 (2010).
- 3) Nozaki A, Morimoto M, Kondo M, Oshima T, Numata K, Fujisawa, Kaneko T, Miyajima E, Morita S, Mori K, Ikeda M, Kato N, Tanaka K. Hydroxyurea as an inhibitor of hepatitis C virus RNA replication. *Arch. Virol.* 155:601-605 (2010).
- 4) Nozaki A, Numata K, Morimoto M, Kondo M, Sugimori K, Morita S, Miyajima E, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Tanaka K. Hydroxyurea Suppresses Hepatitis C Virus Replication in Human: A Phase I Trial of Oral Hydroxyurea in Chronic Hepatitis C Patients. *Antiviral Therapy* 15:1179-1183 (2010).
- 5)Nakamura M, Saito H, Ikeda M, Hokari R, Kato N, Hibi T, Miura S. An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. *World J. Gastroenterol.*16:184-192 (2010).
- 6)Shigoka M, Tsuchida A, Matsudo T, Nagakawa Y, Saito H, Suzuki Y, Aoki T, Murakami Y, Toyoda H, Kumada T,

- Bartenschlager R, Kato N, Ikeda M, Takashina T, Tanaka M, Suzuki R, Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Path. Int.* 60:351-357 (2010).
- 7) Yu S, Chen J, Wu M, Chen H, Kato N, Yuan Z. Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKKepsilon and DDX3. *J. Gen. Virol.* 91:2080-2090 (2010).
- 8) Tanaka T, Hasegawa Y, Saito M, Ikeda M, Kato N. Generation of single-chain Fvs against detergent-solubilized recombinant antigens with a simple coating procedure. *J. Biosci. Bioeng.* 110, 374-376 (2010).
- 9) Oshiumi H, Ikeda M, Matsumoto M, Watanabe A, Takeuchi O, Akira S, Kato N, Shimotohno K, and Seya T. Hepatitis C virus core protein abrogates the DDX3 function that enhances IPS-1-mediated IFN- β induction. *PLoS One* 5(12):e14258 (2010).
- 10) Ariumi Y, Kuroki M, Maki M, Ikeda M, Dansako H, Wakita T, Kato N. The ESCRT system is required for hepatitis C virus production. *PLoS One* 6(1):e14517 (2011).
- 11) Wen X, Abe T, Kukihara H, Tagawa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, and Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One* 6(1): e15967 (2011).
2. 学会発表
- 1) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Anti-HCV mechanism of ribavirin in novel HCV replication cell systems. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.
- 2) Ikeda M, Mori K, Nakazawa T, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Development of genome-length HCV RNA replication assay systems derived from different HCV strains using HuH-7 and Li23 cells. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.
- 3) Shinohara Y, Fujita K, Mawatari H, Yoneda M, Nozaki Y, Kirikoshi H, Imajo K, Suzuki K, Funakoshi K, Ikeda M, Kato N, Maeda S, Nakajima A, Saito S. Clearance of the hepatitis C virus replicon by interferon-alpha treatment restored the signal pathway involving JNK. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Yokohama, September 2010.
- 4) Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H,

Kato N. Mechanism of Anti-HCV of Ribavirin in a Novel HCV Replication Cell System. 第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月.

なし

- 5) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. ヒト肝癌細胞株 Li23 由来の新しい HCV-RNA 複製システムを用いたリバビリンの作用機序の解明. 第 18 回日本消化器関連学会週間(JDDW 2010) / 第 14 回日本肝臓学会大会、横浜、2010年10月.
- 6) 池田 正徳、森 京子、中澤 貴秀、有海 康雄、團迫 浩方、加藤 宣之. C 型肝炎ウイルスに対する新しい抗ウイルス剤スクリーニング系の開発. 第 18 回日本消化器関連学会週間(JDDW 20110) / 第 14 回日本肝臓学会大会、横浜、2010年10月.
- 7) 森 京子、池田 正徳、有海 康雄、團迫 浩方、脇田 隆宇、加藤 宣之. リバビリンの抗 HCV 活性を決定する因子の解析. 第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月.
- 8) 温 暁玉、阿部 隆之、久木原 博、田 鋏 修平、谷 英樹、加藤 宣之、鈴木 哲朗、巽 正志、森石 恆司、松浦 善治. C 型肝炎ウイルス感染細胞特異的なウイルス排除システム
第58回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010年11月.

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