

201125022A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 榎本 信幸

平成24 (2012) 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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 榎本 信幸

平成24 (2012) 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	----- 32
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	----- 35
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	----- 39
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	----- 42
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	----- 44
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	----- 50
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	----- 53
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	----- 58
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	----- 61
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	----- 65
13. IL28B SNP、HCVコア変異と肝脂肪化に関する研究	横須賀 収	----- 72
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		----- 75
IV. 研究成果の刊行物・別刷		----- 100

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

(1)治療抵抗性肝炎ウイルスの病態解明と対策、および

(2)病変進展・発癌に関与するウイルス因子の解明と応用:

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、IL28B 遺伝子とは独立に NS5A 遺伝子領域変異が Peginterferon/Ribavirin 併用療法およびプロテアーゼ阻害剤の治療効果を決定することを解明した。次世代シーケンサーによる肝炎ウイルス遺伝子解析法を開発、HCV core 遺伝子変異が肝癌発症に関連する一方 IL28B は関連しないこと、プロテアーゼ阻害剤耐性変異を持つ HCV が治療前から存在することを明らかとした。IL28B は遷延性の ISG 誘導を引き起こすことにより interferon の効果を増強することを見出した。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。また Stat1 核染色が SVR の予測に有用であることを明らかとした。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。さらに IL28B SNP が IFN 治療後の発がん・リスクが関連していることを明らかとした。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とテノフォビル効果を明らかにした。C 型肝炎に対する PEG-IFN/RBV/プロテアーゼ阻害剤の効果に關係する HCV 遺伝子変異を解明した。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、治療抵抗性 HCV の存在比率に寄与するコア蛋白アミノ酸置換を明らかにした。HCV-2a,-2b,-4a 等の PEG-IFN/RBV の治療効果が、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多施設共同研究により確認した。C型慢性肝炎・肝がん患者の Treg および MDSC は高い抑制性サイトカイン産生能を示して、肝がんの進展(最大腫瘍径)あるいは肝がんの病期と相関していた。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するとともに、それぞれのサブクラスの非癌部に特徴的に発現している遺伝子を同定しその分子生物学的特徴を推定した。

(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:

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が HCV 持続増殖の一因と考えられた。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。Li23 由来の HCV 複製細胞からインターフェロン抵抗性細胞株を樹立、HCV RNA の塩基配列は均一化傾向になることが分かった。新規開発中の HCV NS2 阻害剤を HCV 持続感染細胞に長期間添加することにより NS2 変異の出現を明らかにした。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 が消失した。IL28B 遺伝子型の異なる肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスを用いて、IL28B マイナータイプはメジャータイプに比べ、IFN 投与後の肝内 IFN 誘導遺伝子発現量が低いため、抗ウイルス効果が弱いことを見いだした。In silico スクリーニング法を用いて検索した NS23 プロテアーゼ阻害剤候補化合物について、HCV レプリコン細胞にてその効果を検討した結果、HCV の増殖を抑制する化合物を見出した。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の検討をすすめた。

(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:

次世代シーケンサーの導入により患者体内での HCV 遺伝子変異動態を大規模かつ詳細に解析する手法を導入した。

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) 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を行う。
- (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
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】(1) ペグインターフェロン+リバビリン(P+R)療法を開始した 1b 型の C 型慢性肝炎患者 678 例、56.1±9.5 歳(19~74 歳)、M/F=387/291 を対象とし、HCV ウイルス変異(ISDR、IRRDR、コアアミノ酸、PI 耐性変異)と宿主の IL28B、ITPA SNPs と治療成績の関係を検討した。(2)1990 年以降の IFN 治療例のうち長期経過観察しえた 715 例を対象とし発癌リスクを検討した。

【結果】(1)標準治療期間では、多変量解析による SVR 規定因子は IL28B T/T、ISDR 変異数 ≥ 1 、IRRDR ≥ 4 、 < 60 歳(Odds 比 14.4、4.9、5.1、2.9)であった($p < 0.005$)。一方 P+R+PI の新規治療法でも難治が予測される P+R 療法 NVR 規定因子は IL28 TG+GG、IRRDR ≤ 2 、AFP ≥ 4.8 (Odds 比 13.9、6.3、19.3)であった。(2)60 歳以上/未満に分けて検討すると、 < 60 歳では IL28B TG+GG でも 47%(7/15)、ISDR01 でも 49%(74/151)の SVR 率であったが、 ≥ 60 歳では 7%(1/15)、29%(27/93)であり、より難治であった。一方、 ≥ 60 歳でも IL28B TT かつ ISDR ≥ 2 では全例(13/13)が SVR であった。(3)一方、LVR 例に対しては治療期間を 53W 以上に延長したが、 ≥ 60 歳では 32%が延長投与されており、SVR は IL28B TG+GG では IRRDR ≥ 3 で 0%(0/20)から 60%(2/3)に、IL28 TT では IRRDR ≤ 3 でも 36%(6/22)から 53%(15/23)に改善し、ウイルス・宿主変異が治療効果と関連した。(4)IFN コホートのうち発癌例は 9.8%(70/715、観察期間 8.9 年)で、20 年累積発癌率は SVR 例 7.9%、非 SVR 例 26.2%($p < 0.001$)であった。発癌リスクを SVR 例に限り検討すると IFN 開始時 ≥ 60 歳、男性、F ≥ 3 (HR10.0、10.6、2.5)であった。また Fibroscan 12.3KPa 以上では有意に発癌リスクが高かった($p < 0.001$)。

【考察】P+R 療法は IL28B TT、 < 60 歳、ISDR・IRRDR 変異例で SVR が期待できる、一方高齢・肝線維化進展例では発癌リスクが高いため、IL28B と IRRDR の検討により新規治療法の効果予測を行うことが重要で、SVR が期待できない症例では発癌リスクを考慮した治療法の検討と介入

が必要と考えられた。

IL28B SNP、HCV コア変異と肝脂肪化に関する研究(横須賀)

【方法】(1) IFN 非著効または IFN 未施行例のうち 10 年以上経過観察され少なくとも 10 年間は肝発癌を認めなかった HCV G1 持続感染例 108 例を対象とした。IL28B genotype (rs8099917)別に経過観察開始時と長期経過観察後の HCV コア 70 アミノ酸の変化、肝発癌等について検討した。HCV コア 70 アミノ酸配列は直接塩基配列決定法にて、70Arg、70 non-Arg をそれぞれ野生型、変異型と判定し、IL28B genotype は TaqMan SNP 法にて決定した。(2) 治療前に肝生検を施行した 79 例の肝組織標本で STAT1 の免疫組織学的染色を DAB 法で行い、IL28B genotype および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比較検討した。核小体が判別出来ないほど核が濃染したものを STAT1 の核内移行と判断して肝細胞 STAT1 の活性化と定義した。

【結果】1)IL28B Minor genotype 症例では HCV コア 70 変異型の割合が高かった。2)長期経過観察例の約 70%で HCV コア 70 アミノ酸に変化はみられず、特定のアミノ酸への変化はみられなかった。3)IL28B Major genotype の症例では、HCV コア 70 野生型の頻度が高かった。4)HCV コア 70 変異型の場合には肝発癌リスクが高い可能性が示唆された。5)SVR の正診率は IL28B genotype が 57%, STAT1 核染色陰性(<5%)が 63%,両者を合わせると 71%であり、治療効果予測に有用であった。

【考察】HCV G1 高ウイルス量症例の治療効果予測において IL28B Genotyping と治療前肝細胞内 STAT1 の核内移行を評価することにより正診率の向上がみられ有用であることを明らかにした。

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】1) HCV 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 Taqman MGB probe を用いた real time PCR 法により、PEG-IFN/RBV を受ける C 型慢性肝炎患者における野生型および変異型の存在状態を明らかにし、治療効果との関連につき検討する。2) 野生型と変異型の両者を有する PEG-IFN/RBV を受けた C 型慢性肝炎患者再燃例で野生型および変異型の個別の動態につき解析し、治療抵抗性の機序を検討する。加えて、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、アポトーシス関連分子に及ぼす影響を解析する。3) C 型肝炎患者における IL28B 遺伝子 rs8099917 の遺伝子型を決定し、病態との関連を検討する。また、ゲノ

ムワイド関連解析を行い、肝発癌と関連する遺伝子多型を同定する。

【結果】1) コアタンパク第 70 番目アミノ酸野生型と変異型の高感度定量により、PEG-IFN/RBV を行った 36 例の C 型慢性肝炎患者において存在比率を検討したところ、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。変異型の比率が高くなるほど、EVR および SVR が得られにくかった。また、null virological responder (NVR) の予測には、ダイレクトシーケンスよりも変異型 HCV 比が有用であった。また、変異型 HCV 存在比率は IL28B マイナー型、血小板数低下と関連していた。2) 野生型と変異型の両者を有する治療再燃例の解析で、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 HCV が優位になっていることが認められ、変異型 HCV は、PEG-IFN/RBV 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 HepG2 細胞に発現させ、アポトーシスに及ぼす影響につき検討したところ、変異型 HCV は、Bcl-xL の発現を野生型より強く誘導し、排除されにくい性質を獲得している可能性が示された。

3) PEG-IFN/RBV 感受性の IL28B メジャー型は、マイナー型に比し、より炎症が強く、より線維化が進んでいるが、発癌時年齢が高いことが明らかになった。また、ゲノムワイド関連解析を行い、C 型肝炎患者における肝癌感受性遺伝子多型として MICA(MHC class I polypeptide-related sequence A) 遺伝子多型を同定した。G が発癌の protective allele であり、A が risk allele であったが、G allele を有する患者において、A allele を有する患者と比較し、有意に血中可溶性 MICA が上昇しており、MICA 発現が肝癌の発症を抑える可能性が示された。

【考察】NVR の予測には、現在主に行われているダイレクトシーケンス法より、変異型 HCV 比率が有用であった。治療抵抗性の機序として、変異型は Bcl-xL の発現を野生型より強く誘導し、変異型 HCV 感染肝細胞がアポトーシスにより排除されにくい性質を獲得している可能性が示された。また、ウイルス側因子のみならず、PEG-IFN/RBV 感受性を規定する IL28B の遺伝子多型が、発癌にも影響していることが明らかになった。ゲノムワイド関連解析により、MICA 遺伝子が肝発癌に重要な役割を担っており、NK (natural killer) 細胞が肝発癌に重要なことが判明した。

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】1) C型慢性肝炎(genotype 1型高ウイルス量症例)症例に対してNS5A阻害剤(BMS790052)とPEG-IFN+RBV併用療法24週間投与(一部症例で48週間投与)を施行した17例とBMS790052とプロテアーゼ阻害剤(BMS650032)併用24週間投与を施行した23例を対象とした。治療効果と効果に関係するウイルス学的因子、生体側因子を検討した。2) B型肝炎症例においてラミブジン単独投与中に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を488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485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。さらにエンテカビルを投与したnaïve例474例でその後DNA上昇を認めた症例のウイルス学的検討をおこなった。

【結果】(1) NS5A阻害剤(BMS790052)とPEG-IFN+RBV併用療法

Naïve例9例、PEG-IFN/RBVのnon-responder8例に対して治療が行われた。NS5A阻害剤(BMS790052)の投与量は1日60mg群と10mg群の2群比較にて行われた。naïve例では、9例中6例がSVRとなった。このうち60mg群では4例全例がSVRとなった。開始時のNS5A領域の遺伝子配列を検討(PCR-direct sequence法)するとBMS790052に対する耐性変異は検出されなかった。non-responder例では、8例中2例がSVRとなった。SVRの2例はいずれもIL28B TTでCore aa70がmutantであった。治療開始時BMS790052に対する耐性変異が認められた1例は、relapseした。

(2) NS5A阻害剤(BMS790052)とプロテアーゼ阻害剤(BMS650032)併用24週間投与前治療null responderの11例と、標準治療(SOC)不適格例、不耐用例12例で行われた。前治療null responder群では、1例がBil上昇で中止(最終的にはSVR)、1例が4週目にウイルスが陰性化しなかったためにSOC併用に移行したが、残りの9症例はSVRとなった。IL28BやCoreのaa70番に関しては、治療効果と関係なかった。標準治療(SOC)不適格例、不耐用例12例では、7例がSVRとなった。治療開始時BMS790052に対する耐性変異が認められた3例は、relapseまたは投与中にvirological breakthroughをおこした。

(3) 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。488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10例でラミブジンとアデフォビルの併用療法を施行した。4年目でのHBV DNAの陰性化は8例中3例であった。

(4) 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485例中10例(2%)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。これらのうち5例でDNA量の再上昇を認めた。3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、2例ではテノフォビルの投与が行われた。(5) naïve例に対するエンテカビルの耐性ウイルスの検討

474例中6例でHBV DNA量が最低値(nadir)から1 log copy以上の上昇を認めた。このうち3例はエンテカビル耐性ウイルスを認めた。残り3例は、L180M+M204VとM204I, A181T, A181S+T184A+M204Iの変異であった。

【考察】従来治療の基本であった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。さらにプロテアーゼ阻害剤であるTelaprevir(TVR)とPEG-IFN+RBVの3者併用療法は、高いSVR率を認めている。しかしTVR+PEG-IFN+RBVの3者併用療法には、貧血や皮膚障害などの副作用が認められる。またIFN療法であるため、精神症状、間質性肺炎などの合併症のある症例や高齢者には使用できない。またIL28Bがminor alleleのある症例やCore aa70がmutantの症例では3者併用量療法でSVRに至らない症例も存在する。そこでより効果が高く副作用が少ない治療が望まれている。NS5A阻害剤は、プロテアーゼ阻害剤とは作用機序の異なる新規治療薬である。今回の検討からNS5A阻害剤とPEG-IFN/RBV併用療法やプロテアーゼ阻害剤との併用療法は、副作用が少なく効果の高い治療法であった。特に内服2剤の治療は、IFNの使用できない症例でも高い効果を認めている。さらに多数例での効果判定が必要であり、また効果に関係する因子についても今後検討する必要がある。

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】1) 患者及び治療応答性の判定:HCV-2a、-2b 及び-4a 感染慢性肝炎の治療のため、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を対象として、HCV の NS5A 並びにコア遺伝子領域の推定アミノ酸配列、さらに宿主の IL28B SNP の解析を行った。

【結果】1) HCV-2a 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性に及ぼす因子の同定:

HCV-2a 感染慢性肝炎患者においては、RVR は 75% (46/61)、Non-RVR は 25% (15/61)、また、SVR は 84% (49/58)、Non-SVR は 16% (9/58) であった。Null-response はなく、全症例が EVR 及び ETR (48 週間の Peg-IFN/RBV 投与終了時にウイルス血症が陰性) になり、Non-SVR はすべて Peg-IFN/RBV 投与終了後経過観察中の Relapse であった。

SVR と相関する因子として、単変量解析により、年齢 (55 歳以下) とウイルスの IRRDR の変異が 4 ヶ所以上あること (IRRDR[2a]≥4) 及び ISDR とその C 末端周辺領域を合わせた領域の変異が 1 ヶ所以上あること (ISDR/+C[2a] ≥1) が抽出された。そして、多変量解析により、SVR と相関する因子として IRRDR[2a]≥4 のみが同定された。

一方、RVR と相関する宿主因子として、単変量解析により IRRDR[2a]≥4、年齢、性別、ALT 値、HCV コア抗原量が抽出された。多変量解析により IRRDR[2a]≥4 のみが RVR と相関する因子として同定された。

コア蛋白質変異と SVR の相関について解析したが、HCV-1b で重要なアミノ酸と考えられている 70 位及び 91 位は、解析した HCV-2a 症例のすべてにおいてそれぞれ Arg 及び Leu であり、SVR/Non-SVR との相関は認められなかった。なお、70 位の Arg 及び 91 位の Leu はいずれも Peg-IFN/RBV 感受性と相関することが報告されているアミノ酸残基である。一方、統計学的有意差は認められないものの、SVR では 48 位の Ala が Thr に置換していることが多い傾向が見られた。

IL28B SNP 解析では、これまでに解析し得た HCV-2a 症例数が少なく統計学的に有意差は見られなかったが、SVR に比べて Non-SVR で IL28B-Minor が多い傾向が見られた (6% vs. 25%)。

2) HCV-2b 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療応答性に及ぼす因子の同定:

HCV-2b 感染慢性肝炎患者においては、RVR は 67% (34/51)、Non-RVR は 33% (17/51)、また、SVR は 72% (34/47)、Non-SVR は 28% (13/

47) であった。Null-response はなく、全症例が EVR になり、Non-SVR は 1 例が Peg-IFN/RBV 投与中、残りはすべて投与終了後経過観察中の Relapse であった。

SVR と相関する因子として、単変量解析及び多変量解析により、いずれも \log_{10} -GTP 値のみが抽出された。HCV-2b の SVR に関してはウイルス側因子は抽出されなかった。

一方、RVR と相関する因子として、単変量解析により IRRDR のアミノ末端領域の一部に変異が 3 ヶ所以上あること (IRRDR/N[2b]≥3) 及び年齢が抽出された。多変量解析により IRRDR/N[2b]≥3 のみが RVR と相関する因子として同定された。

コア蛋白質については、解析した HCV-2b の全症例で、70 位及び 91 位はそれぞれ Arg 及び Leu であり、SVR/Non-SVR との相関は認められなかった。また、HCV-2a の場合と異なり、SVR の 2 症例を除いてコア 48 位はすべて Ala であり、Thr が SVR に多い傾向は認められなかった。

IL28B SNP 解析では、これまでに解析し得た HCV-2b 症例数が少なく統計学的に有意差は見られなかったが、SVR に比べて Non-SVR で IL28B-Minor が多い傾向が認められた (0% vs. 14%)。

3) HCV-4a 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の同定:

HCV-4a 感染慢性肝炎患者においては、SVR は 57% (24/42)、Non-SVR は 43% (18/42) であった。SVR と相関する因子として、単変量解析により、ウイルスの IRRDR の変異が 4 ヶ所以上あること (IRRDR[4a]≥4) が同定された。その他のウイルス側因子及び宿主側因子については現在解析中である。

【考察】

HCV-1b 慢性肝炎患者の Peg-IFN/RBV 治療に際して、その治療応答性を予測し得る因子としてウイルス NS5A の IRRDR (1,2) 及び ISDR (3) の変異数、コア蛋白質 70 位のアミノ酸変異 (2,4)、並びに宿主因子 IL28B SNP (5-7) が報告されている。本研究では、HCV-1b 以外の genotype、とくに HCV-2a、-2b、-4a について、NS5A の IRRDR や ISDR の変異数、コア蛋白質 70 位の変異、及び IL28B SNP の意義について検討した。まず、HCV-2a 感染においては、HCV-1b の場合と同様に、IRRDR[2a]≥4 と ISDR/+C[2a]≥1 の場合にウイルスを排除して SVR になりやすいことが明らかになった。一方、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が、早期ウイルス排除である RVR と IRRDR/N[2b]≥3 が有意の相関を示した。これらのことは、HCV-2a や -2b 感染においても、IRRDR 領域が Peg-IFN/RBV

RBV 応答性に関与している可能性を示唆しているものと思われる。さらに HCV-4a 感染においても IRRDR[4a] \geq 4 と SVR の有意の相関が示され、IRRDR の重要性が genotype を越えて普遍的なものであることが明らかになった。また、HCV-2a や -2b 感染における IL28B SNP の意義については、解析し得た症例数が少なく、統計学的に有意差は見られなかったが、Non-SVR に IL28B-Minor が多い傾向が見られた。HCV-1b の場合ほど強い相関ではないかもしれないが、IL28B-Minor が Non-SVR の予測因子として用いられる可能性がある。今後、症例数を増やして更に検討する必要があると思われる。将来的には、HCV-2a や -2b 感染においても、IRRDR 変異と IL28B SNP を併用して Peg-IFN/RBV 応答性を予測し、IRRDR 変異が少なく且つ IL28B-Minor の症例には当初から 24 週間以上の延長投与を推奨することも考えられる。

(2)病変進展・発癌に関与するウイルス因子の解明と応用

次世代シーケンサーを用いた C 型肝発癌に関連するウイルス遺伝子領域の解析(榎本)

【方法】肝発癌と関連が指摘されている core 領域に着目、(1) genotype 1b273 症例(HCC 群 85 例、非 HCC 群 190 例)を対象とし、core 領域の配列をダイレクトシーケンスにて検討した。(2)長期経過観察 98 症例について core 領域の経時変化をダイレクトシーケンスで検討した。(3)228 例については IL28B SNP を検討した。(4)83 例については次世代シーケンサーを用いて deep sequence 解析を行った。

【成績】(1)core 領域全長で HCC 群と非 HCC 群を比較すると、core aa 70Q/H は 70R に比して HCC 群で有意に高率(HCC 群 66% vs.非 HCC 群 39%, $p=0.001$)であった。(2)経時変化をみると HCC 発症群では core aa70Q が観察開始時 44% から発症時 61% に増加し、肝発癌に伴って core aa 70Q に変異が生じると考えられた。(3)IL28B SNP は肝発癌とは明らかな関連を認めなかった。また、IL28B SNP 別に比較するとマイナーアレルで core aa 70 変異 ($p<0.001$)が有意に高率であった。(4)次世代シーケンサーを用いることにより、83 検体の HCV core 遺伝子について各症例最大 1,000 リードを 1run 10 時間で同時解析可能であった。Deep sequence でも core aa 70 変異は病期の進行に伴い Q/H が増加した。IL28B メジャーアレル症例においては core aa 70 変異は R 優位に混在しているのに対し、マイナーアレル症例では Q/H 優位に混在していた。

【結語】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考えられ、次世代シーケンスによる deep sequence によってさらに明らかとなった。

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から発現遺伝子パターンによる HCC サブクラス分類が報告されている。一方、HCV 関連 HCC では非 HCC 部分においても炎症、脂質代謝、酸化ストレスなどに関連した遺伝子発現が亢進することが知られている。これらの点を踏まえ、HCV 関連 HCC 部、非 HCC 部のマイクロアレイによる HCC 分類を行い、臨床的特徴との関連を検討した。

【結果】既存の報告を参考に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 つと定義したところ、Class 1 では主に炎症や免疫反応、Class 2 ではアポトーシスや DNA、Class 3 ではリンパ球や白血球の活性化に関連する遺伝子カテゴリーの亢進が各群における HCC の特徴として捉えられた。一方、非 HCC 部における解析で、Class 1 の非癌部では線維化、炎症に関連する遺伝子が有意に発現、Class 2 の非癌部ではアポトーシスに関連する遺伝子が特徴的に発現していた。

【考察】これらの結果を踏まえて、さらなる検討が必要である。

(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:

HCV replicon における IFN λ の HCV 増殖抑制効果および遺伝子誘導の検討(榎本)

【方法】HCV-1b、HCV-2a replicon 培養細胞を用い、IFN λ 1-3 の抗ウイルス効果を検討した。また IFN λ 添加に伴う細胞内発現遺伝子群の変化をマイクロアレイによって解析した。

【結果】各 IFN λ 添加により 1ng/ml 以上で HCV は濃度依存性に抑制された。HCV-1b full-genomic replicon, HCV-1b sub-genomic replicon, HCV-2a replicon (JFH-1)において各 IFN 1000ng/ml 投与後 48 時間での HCV RNA 量はそれぞれ、IFN α : 0、1、6%、 λ 1: 29、53、11%、 λ 2: 52、43、11%、 λ 3: 38、45、11%と、増殖抑制効果は IFN λ が IFN α に比べて弱く、各 IFN λ 間での差はみられなかった。また HCV-1b full-genomic replicon においては、各 IFN λ と α の相乗的な HCV 増殖抑制を認めた。ISRE 活性は各 IFN λ 投与でもほとんど濃度依存性の活性

上昇はみられなかった。マイクロアレイ解析では $\lambda 3$ の 1ng/ml 添加により IFN α の 0.01ng/ml 添加時と同等以上のインターフェロン誘導遺伝子群の発現増強を認め、特に MX1、IFIT1、OAS3 において著明であった(無添加時と比して各々 24.4 倍、12.2 倍、5.6 倍)。

【考察】IFN λ 1、2、3 は in vitro において 1ng/ml 以上では濃度依存性に HCV 増殖抑制効果を示し、さらに IFN α との相乗作用を認めることが示された。

C 型慢性肝炎の治療抵抗性および肝発癌におけるインターロイキン 6(IL-6)の関与(中川)

【方法】IFN 治療抵抗性に関わる分子の解析を目的として、申請者が独自に開発した HCV コア変異培養系を用いた 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。さらに本検討で病態との関連が示されたサイトカインと HCC の関連について臨床的に検討した。

【結果】1) 臨床的に治療抵抗型である HCV コア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、小胞体ストレス蛋白の発現誘導、IL-6 上昇をみた。さらに、コア変異株では 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。

2) IFN 治療抵抗株である JFH 株では IL-6 およびその下流の SOCS3 発現が亢進し、ISG 抑制をみた。3) 臨床検体でも男性においては治療抵抗症例で IL-6 持続高値であることが確認された。4) C 型慢性肝炎を含む慢性肝疾患 391 例で IL-6 値と硬変肝および肝発癌の有無を検討すると、硬変および肝細胞癌では有意に IL-6 高値であった。

【考察】治療抵抗 HCV では ER ストレス IL-6 により 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。臨床的な発癌への関与も示唆され、引き続き検討が必要と考えられる。

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 近傍の SNP と自然免疫機構との関連及び治療効果について PEG-IFN/RBV 併用療法を施行した 88 例を対象として検討した。

【結果】IL28B タイプ別の検討では IL28B minor 例の RIG-I、ISG15 の遺伝子発現は major に比し有意に高値であったが、IPS-1 及び RNF125 は IL28B minor で低かった。治療効果別検討では、NVR 例では治療中ウイルス反応(VR)が得られた症例に比し有意に RIG-I、ISG15 の遺伝子発現が

高値で、IL28B minor に限っても NVR 例では VR 例に比し有意に高値であった。多変量解析では RIG-I 高発現が NVR に独立して関与していた。

【考察】宿主自然免疫遺伝子発現プロファイルと IL28B SNP は密接に関連していたが、同一の IL28B SNP 症例における検討でも宿主自然免疫遺伝子発現プロファイルは治療効果と関連しているため、自然免疫遺伝子は難治要因により本質的に関与している可能性が考えられた。

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 HCV O 株由来の全長 HCV RNA 複製細胞(OL8、OL11 および OL14 細胞)を用いて検討を行った。

【結果】(1) Li23 細胞株由来の全長 HCV RNA 複製細胞(樹立時と 2 年間継代培養)から IFN- α (50 IU/mL)に抵抗性を示す細胞を選別し、それらの細胞における HCV の遺伝子解析を行った結果、遺伝的系統樹上クラスターを形成し、かつ特定の amino 置換を有する HCV RNA 分子種に収束していた。(2) Li23 細胞株由来の全長 HCV RNA 複製細胞(3 年以上継代培養)から RBV (100 μ M 以上)に抵抗性を示す複数の細胞株を樹立した。これらの細胞における HCV の遺伝子解析を行った結果、遺伝的系統樹上クラスターを形成し、IFN 抵抗性細胞株を用いたこれまでの遺伝子解析からは得られたことのない特定の amino 置換を有する HCV RNA 分子種に収束していた。

【考察】Li23 細胞株を用い、IFN- α 、あるいは RBV に抵抗性を示す全長 HCV RNA 複製細胞が得られた。今後は、抵抗性に関与するこれらのウイルス変異、あるいは宿主因子の関与を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 型肝炎治療薬開発のため、HCV NS2 タンパクに着目して HCV 感染増殖細胞系を用いて検討した。

【結果】理化学研究所松本博士らと共同で、NS2 結合性化合物の抗 HCV 活性評価を行い、HCV 粒子産生阻害活性を有する抗 NS2 化合物を見出した。さらに、最も抗 HCV 活性の高かった化合物においては、HCV 持続感染細胞への長期間添加により耐性ウイルスが出現する可能性が示唆さ

れた。

【考察】NS2 は、そのシステインプロテアーゼ活性が NS2/3 切断に重要であるだけでなく、近年では構造タンパク質、非構造タンパク質の結合性から HCV 感染性粒子形成にも重要な役割を果たすこと明らかとなっており、抗 HCV 薬開発の標的として有望である。今後、NS2 阻害剤に対してどのようなメカニズムで HCV が耐性を獲得するかを明らかにして行く予定である。

HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスモデルを用いた抗 HCV 薬治療効果の検討(今村)

【方法】IFN 抵抗性の C 型肝炎患者に対して将来的には IFN 製剤を使用しない経口薬のみの治療が期待されている。本研究では HCV を感染させたヒト肝細胞キメラマウスを用いて第二世代 protease 阻害剤、NS5A 阻害剤および NS5B 阻害剤の有効性を検討した。Genotype 1b 型、2a 型あるいは 2b 型 HCV を感染させたヒト肝細胞キメラマウスに第二世代 protease 阻害剤、NS5A 阻害剤および非核酸型 NS5B 阻害剤を単独あるいは併用し 4 週間連日経口投与した。

【結果】1b 型 HCV 感染マウスに対しては、いずれの薬剤も単独投与では、耐性株による viral breakthrough を生じたが、NS5A 阻害剤 + 第二世代 protease 阻害剤あるいは NS5A 阻害剤 + NS5B 阻害剤の併用投与により HCV の排除が可能であった。一方、genotype 2a および 2 型感染マウスは治療前にすでにこれらの薬剤耐性変異を有しており、これらの併用療法は無効であった。

【考察】Genotype 1b 型 HCV に対して、NS5A 阻害剤 + 第二世代 protease 阻害剤あるいは NS5A 阻害剤 + NS5B 阻害剤の併用療法は有効な治療法になり得るが、genotype 2 型に対しては有効性が低い可能性があると思われた。

NS2/3 プロテアーゼを標的とした HCV 治療の開発(松本)

【方法】本研究の目的は NS2/3 プロテアーゼ阻害剤のスクリーニング系を構築し、新たな C 型肝炎治療薬の開発につなげることである。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、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有用性を検討した。

【結果】

創出された細胞のホタルルシフェラーゼ活性に対

する NS3/4A プロテアーゼ阻害剤である VX-950 の IC50 値は 1.6 μ M であった。一方、リファレンスリポーターであるウミシイタケルシフェラーゼ活性に対する VX-950 の IC50 値は 30 μ M で、両値の比率で示す selectivity Index は 18.8 であった。インシリコスクリーニングでデータベースから探索した NS2/3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物 56 種類のうち、山梨大が実施した全長ゲノムレプリコンアッセイでヒットした 4 化合物(#6, #25, #44, #47)と浜松医科大で実施した HCV trans-packaging system によるアッセイでヒットした NS2/3 プロテアーゼに依存しない HCV 産生阻害化合物 2 種類(#41, #42)を、我々が創出したレポーターアッセイ系で評価した。上記 6 化合物のうち 2 化合物(#42, #47)は、レポーターアッセイで測定した IC50 値は 50 μ M 以下で、ほぼ同等の阻害活性を示した。ただし #42 は 50 μ M でもリファレンスリポーターであるウミシイタケルシフェラーゼ活性を阻害しなかったのに対して、#47 は 50 μ M でウミシイタケルシフェラーゼ活性を約 30%阻害した。

【考察】NS2/3 プロテアーゼおよび NS3/4A プロテアーゼの阻害剤をスクリーニングするのに非常に適したリポーターアッセイ系を確立した。また NS2 の立体構造情報に基づいてインシリコスクリーニングで探索した化合物 56 種類のうち、構造が非常に類似した 2 種類の化合物は、HCV 増殖を阻害すること、リポーターアッセイ系でヒットしたから、NS2/3 プロテアーゼ阻害剤のリードになりうる。

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】1) In silico screening 法により、57 種の NS2/3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物を選び、HCVレプリコン細胞による抑制効果の検討を行う。2) NS3 Helicase をターゲットタンパクとし、海洋生物抽出物ライブラリーよりその活性を阻害する物質の検索を In vitro NS3 Helicase assay による NS3 Helicase 活性測定および HCV レプリコン細胞を用いて行う。

【結果】1) In silico screening 法により、57 種の NS2/3 プロテアーゼ阻害剤候補化合物を選び、これら化合物の実際の効果についてレプリコン細胞を用いて検討を行い、候補化合物 1 種類を同定した。2) 海洋生物抽出物ライブラリーソースを用いた検討を行い、ウミシイダ類に属する *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画 SG1-23-1 に強い、NS3 Helicase の阻害活性と HCV 増殖阻害活性抑制があることを見出した。

【考察】

1). In silico screening 法により、1 種類の NS2/3

プロテアーゼ阻害剤候補化合物を見出した。これをリード化合物として、さらにより効果の高い化合物を見出してゆく。

2).海洋生物 ウミシダ類に属する *Alloeocomatella polycladia* の酢酸エチル抽出分画中に、NS3 Helicase の活性阻害により、HCVのウイルス増殖を抑制する物質が存在することを見出した。今後はこの抽出物より分画・精製を行い、抑制化合物の単離を進めていく。

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、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、C型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(+)/Treg は、非がん患者に比較して増加しており、がんの進展(最大腫瘍径)との関与が示された。さらに、Tregの制御にかかわる骨髄由来抑制細胞(MDSC)について、肝がんの病期(stages I-II / III-IV)と関連していた。

【結果】肝がん患者において、制御性 T 細胞(Treg)および骨髄由来抑制細胞(MDSC)が抗腫瘍免疫の抑制、がんの進展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を臨床応用し広く患者診療の向上に役立てるために、遺伝子情報・機能情報・臨床情報を統合した知見を集積した。今後、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、ハイスループットの HCV ゲノムワイド解析システムを用い、IL28B 遺伝子とは独立に HCV core、あるいは NS5A 遺伝子領域変異が PEG-IFN/Ribavirin 併用療法およびプロテアーゼ阻害剤の治療効果を規定することを解明、特に core 変異については定量法を確立し、治療抵抗性 HCV の治療中・後の動態を明らかにした。

HCV-2a,-2b,-4a の NS5A の特定領域 (IRRDR 及び ISDR) のアミノ酸配列の多様性と治療反応性の関連を確認した。次世代シーケンサーによる肝炎ウイルス遺伝子解析法を開発、HCV core 遺伝子変異が肝癌発症に関連することを明らかにした。一方、IL28B SNP は PEG-IFN/Ribavirin 治療効果と強く関連するとともに、自然免疫系遺伝子発現変化、HCVcore 変異や肝脂肪化、IFN 治療後の発がんリスクと関連していること、さらに IL28B が遷延性の ISG 誘導を引き起こすことにより interferon の効果を増強することを示した。C型慢性肝炎・肝がん患者の Treg および MDSC は高い抑制性サイトカイン産生能を示し、肝がんの進展と関連することを示した。HCV 関連 HCC をマイクロアレイによる遺伝子発現パターンで分類し臨床学的特徴を解析し、さらに各サブクラスの非癌部に特徴的に発現している遺伝子を同定しその分子生物学的特徴を推定した。NS2protease、あるいは Helicase 等をターゲットとして効果のある海洋抽出物を含む候補物質を見出した。今後ウイルスと IL28B の関連をさらに明らかにして病態の理解を深めるとともに、さらに創薬に結びつけてゆく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sueki R, Enomoto N, et al
Correlation between Pretreatment Viral Sequences and the Emergence of Lamivudine Resistance in Hepatitis B Virus Infection
Journal of Medical Virology, 2012

2) Maekawa S, Enomoto N, et al
Comprehensive analysis for viral elements and il28b polymorphisms in response to peginterferon plus ribavirin therapy in hcv-1b infection
Hepatology, 2012

3) Asahina Y, Enomoto N, et al.
Association of Gene Expression Involving Innate Immunity and Genetic Variation in Interleukin 28B With Antiviral Response
Hepatology, 2012, 55:20-29

4) Asahina Y, Enomoto N, et al.
Association of Gene Expression Involving Innate Immunity and Genetic Variation in Interleukin 28B With Antiviral Response
J Hepatol, 2011, 54:439-448

5) Kurosaki M, Enomoto N, et al.

Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Human Molecular Genetics* 2011, 20:3507-3516

6) Miura M, Enomoto N, et al. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Hepatology Int.*, 2011

7) Kadokura M, Enomoto N, et al. Analysis of the Complete Open Reading Frame of Genotype 2b Hepatitis C Virus in Association with the Response to Peginterferon and Ribavirin Therapy. *PLoS ONE* 2011, 6:1-9

8) Shindo H, Enomoto N, et al. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. *Hepatology Int.*, 2011

9) Tanaka D, Enomoto N, et al. A new method for induced fit docking (GENIUS) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011

10) Wakita T, Enomoto N, et al. Will There Be an HCV Meeting in 2020? Summary of the 17th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. *Gastroenterology* 2011, 141

11) Kurosaki M, Enomoto N, et al. Sequences in the interferon sensitivity-determining region and core region of hepatitis C virus impact pretreatment prediction of response to PEG-interferon plus ribavirin: data mining analysis. *J Med Virol* 2011, Mar;83(3):445-52.

12) Kurosaki M, Enomoto N, et al. Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antiviral Therapy* 2011;16: 685-694

13) 坂本 穰, 榎本信幸. 特集 ウイルス肝炎診療の変貌: 近づく疾患克服 (C型肝炎: 治療効果予測とオーダーメイド治療) ウイルス変異からみた PEG-IFN+RBV 療法の治療効果予測

肝胆膵 62(2)307-313, 2011

14) 進藤浩子, 前川伸哉, 榎本信幸. 特集 ウイルス肝炎診療の変貌: 近づく疾患克服 (C型肝炎: 治療効果予測とオーダーメイド治療) NS5A inhibitor 肝胆膵 62(2)413-420, 2011

15) 井上泰輔, 榎本信幸. シグナル伝達を理解するために必要な知識 mTOR を介したシグナル伝達 分子消化器病 8(1): 75-78, 2011

16) 坂本 穰, 榎本信幸. 新時代のウイルス型肝炎学—基礎・臨床研究の進歩— II. C型肝炎 C型肝炎に対する治療学の進歩 C型肝炎に対する抗ウイルス療法反応性因子とその効果予測 「HCV の NS5A 遺伝子変異 (ISDR・IRRDR) とインターフェロン治療反応性」日本臨床 69 巻増刊号 4: 234-238, 2011/05/11

17) 坂本 穰, 榎本信幸. 肝炎診療に必要な遺伝子検査 C型肝炎の遺伝子解析と診療への応用 *Medical Practic* 28(8): 1383-1388, 2011

2. 学会発表

1) 進藤邦明, 佐藤光明, 中山康弘, 坂本穰, 小松信俊, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. 腫瘍マーカーを併用したソラフェニブ治療効果の検討. 第3回日本肝癌分子標的治療研究会 2011.1.1.15, 下関

2) 中山康弘, 坂本 穰, 深澤佳満, 川上 智, 村岡 優, 小松信俊, 佐藤光明, 小林祥司, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. Sorafenib 投与後に脳出血を来した肝細胞癌の2症例. 第3回日本肝癌分子標的治療研究会 2011.1.1.15, 下関

3) 進藤邦明, 坂本 穰, 榎本信幸. 非代償性肝硬変の生命予後に関する因子の検討. 第97回日本消化器病学会総会(ワーク) 2011.5.15 東京

4) 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. C型肝炎の病態形成におけるIL28 SNPとウイルス因子関与の検討. 第97回日本消化器病学会総会(ミニシンポ) 2011.5.14 東京

5) 坂本 穰, 前川伸哉, 小松信俊, 雨宮史武, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 榎本信幸. ウイルス変異と宿主ゲノムからみた C型肝炎に対するインターフェロン治療効果と将来像. 第97回日本消化器病学会総会(ミニシンポ) 2011.5.14 東京

6) 中山康弘, 坂本 穰, 川上 智, 村岡 優,

- 小林祥司, 高橋 英, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. 進行肝細胞癌に対する病態に応じた治療法の選択と予後の検討. 第 97 回日本消化器病学会総会(ポスター) 2011.5.13 東京
- 7) 小馬瀬一樹, 前川伸哉, 進藤浩子, 門倉信, 末木良太, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 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. 第 97 回日本消化器病学会総会(ミニシンポ) 2011.5.14 東京
- 8) 横田雄大, 坂本 穰, 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. 鬱を合併した C 型慢性肝炎患者に対する IFN- β +RBV 併用療法. 第 48 回日本消化器病学会甲信越支部例 2011.5.21 新潟
- 9) 石田泰章, 雨宮史武, 村岡 優, 進藤浩子, 小松信俊, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 膵原発悪性 glucagonoma の肝転移に対し TACE を行い、治療効果良好な一例. 第 48 回日本消化器病学会甲信越支部例 2011.5.21 新潟
- 10) 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新規治療法への期待. 第 47 回日本肝臓学会総会(パネル) 2011.6.3 東京
- 11) 進藤邦明, 坂本 穰, 榎本信幸. NBNC 肝癌のサーベイランスの現状と Fibroscan を用いた発癌高危険群の囲い込み. 第 47 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2011.6.2 東京
- 12) 小松信俊, 雨宮史武, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 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 47 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2011.6.2 東京
- 13) 三浦美香, 前川伸哉, 末木良太, 門倉 信, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析. 第 47 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2011.6.3 東京
- 14) 小林祥司, 中山康弘, 川上 智, 村岡 優, 小松信俊, 高橋 英, 進藤 邦明, 雨宮史武, 井上泰輔. 坂本 穰, 榎本信幸. 肝細胞癌の描出における Volume-Navigation の有用性と経験年数による有用性の差異の検討. 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6.2 東京
- 15) 小馬瀬一樹, 前川伸哉, 進藤浩子, 門倉信, 末木良太, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 中山康弘, 坂本 穰, 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. 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6.2
- 16) 井上泰輔, 末木良太, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 植竹智義, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 核酸アナログ製剤投与例における HBV 遺伝子変異の検討 発癌と HB コア関連抗原への治療効果への影響. 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6.2 東京
- 17) 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. ウイルスゲノム、および IL28B SNP 解析を用いた HCV 肝病態の検討. 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6.3 東京
- 18) 進藤浩子, 前川伸哉, 小馬瀬一樹, 門倉信, 末木良太, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. HCV replicon における IFN λ の HCV 増殖抑制効果および遺伝子誘導の検討. 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6.3 東京
- 19) 小林祥司, 坂本 穰, 川上 智, 村岡 優, 小松信俊, 高橋 英, 中山康弘, 井上泰輔, 榎本信幸. 新しい国際基準に基づいた自己免疫性肝炎の再検討. 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6.3 東京
- 20) 中山康弘, 坂本 穰, 榎本信幸. 肝細胞癌治療の実際とテーラーメイド医療の可能性. 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6.2 東京
- 21) 雨宮史武, 辰巳明久, 小松信俊, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 本杉宇太郎, 佐野勝廣, 荒木 力, 榎本信幸. 肝硬度を用いた肝細胞癌発癌リスクの評価. 第 47 回日本肝臓学会総会 2011.6.2 東京
- 22) 坂本 穰, 飯田龍一, 榎本信幸. 地域がん登録からみた肝癌の実態と専門医による個別化医療の可能性. 第 47 回日本肝臓学会総会(ポスター) 2011.6.3 東京
- 23) 中山康弘, 坂本 穰, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. アルコール性管細胞癌の臨床的特徴とファイブロスキャンによる高危険群の抽出. 第 47 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2011.7.28 静岡
- 24) 雨宮史武, 小松信俊, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. Budd-chiari 症候群から HCC を発症した一例. 第 47 回日本肝臓学会総会(ワーク) 2011.7.29 静岡
- 25) 坂本 穰, 中山康弘, 小林祥司, 小松信俊,

- 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. 自己免疫性肝炎に合併した肝細胞癌の特徴. 第 47 回日本肝癌研究会(ワーク) 2011.7.28 静岡
- 26) 井上泰輔, 小松信俊, 雨宮史武, 進藤邦明, 中山康弘, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 原発性胆汁性肝硬変に合併した肝細胞癌の特徴. 第 47 回日本肝癌研究会(ワーク) 2011.7.29 静岡
- 27) 坂本 穰, 中山康弘, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. C型慢性肝炎の IFN 治療後に発癌した肝癌の疫学的・ウイルス学的検討. 第 47 回日本肝癌研究会(ワーク) 2011.7.28 静岡
- 28) 三浦美香, 前川伸哉, 門倉 信, 末木良太, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 植竹智義, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析. 第 47 回日本肝癌研究会(シンポ) 2011.7.29 静岡
- 29) 進藤邦明, 小松信俊, 雨宮史武, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 高感度 AFP-L3 を使用した肝発癌、再発予測の検討. 第 47 回日本肝癌研究会(シンポ) 2011.7.29 静岡
- 30) 中山康弘, 坂本 穰, 小松信俊, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸. 血管近傍病変に対する RFA-根治性と安全性のバランス. 第 47 回日本肝癌研究会(ビデオ) 2011.7.29 静岡
- 31) 吉田貴史, 雨宮史武, 小松信俊, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. Sonazoid 造影超音波を用いた肝細胞癌 RFA 後の治療効果判定. 第 47 回日本肝癌研究会(ポスター) 2011.7.28 静岡
- 32) 小松信俊, 中山康弘, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 肝細胞癌に対する RFA における Volume navigation system(V-navi)の有用性. 第 47 回日本肝癌研究会(ポスター) 2011.7.28 静岡
- 33) 本杉宇多郎, 市川智章, 松田政徳, ムヒ アリ, 佐野勝廣, 曹 博信, 榎本信幸, 藤井秀樹, 荒木 力. 肝細胞癌の MR 拡散強調像: 外科切除後の早期再発および予後予測のバイオマーカーとして. 第 47 回日本肝癌研究会(ポスター) 2011.7.28 静岡
- 34) 津久井雄也, 望月 仁, 川上 智, 久野 徹, 深澤佳満, 岩本史光, 廣瀬純穂, 吉田貴史, 細田健司, 鈴木洋司, 星野裕治, 細田和彦, 小嶋裕一郎, 廣瀬雄一, 三井照夫, 進藤邦明, 松田政徳, 矢川彰治, 俵 章夫, 小林正史, 小西利幸, 山崎貴久, 高橋正一郎, 藤井秀樹, 榎本信幸, 小俣政男. Sorafenib 投与例の Child-pugh score と生存期間の検討. 第 47 回日本肝癌研究会(ポスター) 2011.7.28 静岡
- 35) 津久井雄也, 望月 仁, 川上 智, 久野 徹, 深澤佳満, 岩本史光, 廣瀬純穂, 吉田貴史, 細田健司, 鈴木洋司, 星野裕治, 細田和彦, 小嶋裕一郎, 廣瀬雄一, 三井照夫, 進藤邦明, 松田政徳, 矢川彰治, 俵 章夫, 小林正史, 小西利幸, 山崎貴久, 高橋正一郎, 藤井秀樹, 榎本信幸, 小俣政男. Sorafenib 投与例における全生存期間に寄与する因子;治療前パラメーターからの検討. 第 47 回日本肝癌研究会(ポスター) 2011.7.28 静岡
- 36) 雨宮史武, 小松信俊, 進藤邦明, 中山康弘, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸. 症例. 第 47 回日本肝癌研究会(治療) 2011.7.29 静岡
- 37) 中山康弘, 大西 洋, 榎本信幸. 進行肝癌に対する放射線治療の役割. JDDW2011(シンポ) 2011.10.20 福岡
- 38) 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. ウイルス肝炎ネットワークの構築と診療均てん化への取り組み. JDDW2011(パネル) 2011.10.20 福岡
- 39) 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欠乏性結節の治療方針. JDDW2011(ワーク) 2011.10.20 福岡
- 40) 三浦美香, 前川伸哉, 門倉 信, 末木良太, 小馬瀬一樹, 進藤浩子, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山康弘, 植竹智義, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. 次世代シーケンサーを用いた肝発癌に関連する HCV 遺伝子変異の解析. JDDW2011(ポスター) 2011.10.20 福岡
- 41) 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見た PEG-IFN+RBV 療法と protease 阻害剤の適応の検討. JDDW2011(シンポ) 2011.10.21 福岡
- 42) 雨宮史武, 井上泰輔, 榎本信幸. 当科における非 B 非 C 肝硬変の実態. JDDW2011(特企) 2011.10.21 福岡
- 43) 小馬瀬一樹, 前川伸哉, 進藤浩子, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 井上泰輔, 中山康弘, 坂本 穰, 榎本信幸. HCV の PEG-IFN+RBV 治療効果と関連する宿主免疫としての cytokine の同定. JDDW2011(ポスター) 2011.10.21 福岡
- 44) 中山康弘, 坂本 穰, 小松信俊, 進藤邦明,

- 雨宮史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 榎本信幸.
RFA 後に局所再発に関わる因子と脈管近傍
病変に対する治療の標準化. JDDW2011(ポ
スター) 2011.10.21 福岡
- 45) 横田雄大, 坂本 穰, 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. 腹部超音波検査による肝がん検
診. JDDW2011(ポスター) 2011.10.21 福岡
- 46) 辰巳明久, 高野伸一, 深澤光晴, 門倉 信,
進藤浩子, 高橋 英, 佐藤 公, 榎本信幸.
自己免疫性膵炎ステロイド治療例における再
燃予測の検討. JDDW2011(ポスター)
2011.10.21 福岡
- 47) 進藤邦明, 小松信俊, 雨宮史武, 中山康弘,
井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸.
肝硬変を用いた肝癌高リスク群の囲い込み.
JDDW2011(ポスター) 2011.10.21 福岡
- 48) 進藤浩子, 前川伸哉, 小松信俊, 小馬瀬一
樹, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮史武, 中山
康弘, 井上泰輔, 坂本 穰, 榎本信幸. HCV
replicon における IFN λ の HCV 増殖抑制効
果および遺伝子誘導の検討. JDDW2011(ポ
スター) 2011.10.21 福岡
- 49) 進藤邦明, 小松信俊, 雨宮史武, 中山康弘,
井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎本信幸.
初発肝細胞癌の腫瘍径とサーベイランス期間
の検討. JDDW2011(ポスター) 2011.10.22
福岡
- 50) 中嶋奈津子, 中山康弘, 早川 宏, 辰巳明
久, 小松信俊, 三浦美香, 進藤邦明, 雨宮
史武, 井上泰輔, 前川伸哉, 坂本 穰, 榎
本信幸. C 型慢性肝炎ウイルス学的著効
(SVR)後に発症した肝内胆肝癌の2例. 第 49
回日本消化器病学会甲信越支部例会、第 71
回日本消化器内視鏡学会甲信越地方会合
同地方会 2011.11.12 新潟

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。特に非癌部 MAGEH1 の低発現と癌部 β -カテニンの変異との関連が示唆された。非癌部遺伝子発現パターンによる癌部サブクラスの予測モデルの構築を行ったところ、Class1 の予測について良好なモデルが得られた。

B. 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。

C. 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 マイクロアレイを用いて、癌部・非癌部の遺伝子発現プロファイルを得る。

- ① 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。
- ② 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。
- ③ 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。
- ④ 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。

- ② 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。

D. 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 1 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。

(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2)。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的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)。