

れた症例に比し有意に RIG-I、ISG15 の遺伝子発現が高値で (RIG-I, 0.77 vs. 0.50, $p < 0.001$; ISG15, 0.77 vs. 0.43, $p < 0.001$)、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 (RIG-I, 0.86 vs. 0.59, $p = 0.02$; ISG15, 0.86 vs. 0.34, $p < 0.001$)。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。一方、IFN λ 遺伝子発現は治療効果別には有意差がなかった (1.13 vs. 1.27, $p = 0.85$)。

D. 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る。しかし、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、難治要因により本質的に関与している可能性があると考えられた。

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. Yasuhiro Asahina, Kaoru Tsuchiya, Masaru Muraoka, Keisuke Tanaka, Yuichiro Suzuki, Nobuharu Tamaki, Yoshihide Hoshioka, Yutaka Yasui, Tomoji Katoh, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Hiroyuki

Nakanishi, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Masayuki Kurosaki, Nobuyuki Enomoto, Sayuri Nitta, Naoya Sakamoto, Namiki Izumi. Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in *IL28B* with antiviral response.

Hepatology 2012 ; 55 : 20-29.

2. Masayuki Kurosaki, Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, et., al.

Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. Journal of Hepatology 2011;54:439-448.

3. Yasuhiro Asahina, Namiki Izumi, et al. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients.

Hepatology International 2011.

4. 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.

5. Kaoru Tsuchiya, Mina Komuta, Yutaka Yasui, Nobuharu Tamaki, Takanori Hosokawa, Ken Ueda, Teiji Kuzuya, Jun Itakura, Hiroyuki Nakanishi, Yuka Takahashi, Masayuki Kurosaki, Yasuihiro Asahina, Nobuyuki Enomoto, Michiie Sakamoto, Namiki Izumi
Expression of Keratin 19 Is Related to High Recurrence of Hepatocellular Carcinoma after Radiofrequency Ablation.
Oncology 2011:278-288.

6. Teiji Kuzuya, Yasuihiro Asahina, Kaoru Tsuchiya, Keisuke Tanaka, Yuichiro Suzuki, Takahide Hoshioka, Shinji Tamaki, Tomoji Kato, Yutaka Yasui, Takahiro Hosokawa, Ken Ueda, Hiroyuki Nakanishi, Jun Itakura, Yuka Takahashi, Masayuki Kurosaki, Namiki Izumi.
Early Decrease in α -Fetoprotein, but Not Des- γ -Carboxy Prothrombin, Predicts Sorafenib Efficacy in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma.
Oncology 2011;81:251-258.

7. 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 2011;44:1016-1021.

8. 朝比奈靖浩
C型肝炎抗ウイルス治療と自然免疫系
臨床消化器内科 2011;Vol. 26(11):545-552.

9. 朝比奈靖浩
MK7009
肝胆膵 2011;Vol. 62(2):385-388.

10. 朝比奈靖浩、泉並木
C型肝炎治療の pitfall
MedicalPractice 2011; Vol. 28(8):
1430-1434

2. 学会発表

1. Asahina Y, Tsuchiya K, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka T, Katoh T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Izumi N:
Association between IL28B gene variation and development of hepatocellular carcinoma after interferon therapy in patients with chronic hepatitis C.
The 46th annual meeting of the European association for the study or the liver (EASL The International Liver Congress 2011), Berlin, Germany, April 2011.

2. Asahina Y, Tsuchiya K, Suzuki Y, Tamaki N, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Kurosaki M, Izumi N:
Effect of IL28B Variation on Progression of Liver Fibrosis and Hepatocarcinogenesis in Chronic Hepatitis C
The 62st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD The Liver Meeting 2011),

San Fransisco, USA, November 2011.

3. 朝比奈靖浩, 泉並木.

シンポジウム ウイルス性肝炎の標準治療の変遷と将来像. これまでの標準治療の成績及び発癌抑止効果の検証と新規 HCV 特異的阻害薬の効果.

第 97 回日本消化器病学会総会, 東京, 2011 年 5 月.

4. 朝比奈靖浩, 土谷薫, 泉並木.

シンポジウム ウイルス肝炎・肝癌制圧の分子基盤. C 型肝炎における IL28B 近傍の遺伝子多型と自然免疫分子機構および発癌に与える影響.

第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011 年 6 月.

5. 朝比奈靖浩, 加藤知爾, 泉並木.

パネルディスカッション C 型肝炎治療新たな時代へ. 特異的 HCV 増殖阻害剤の導入を踏まえた C 型肝炎治療 発がん抑止を目指した治療戦略.

第 47 回日本肝臓学会総会, 東京, 2011 年 6 月.

6. 朝比奈靖浩, 土谷薫, 泉並木.

シンポジウム C 型肝炎治療の新たな展開. これまでの標準治療の治療効果と発癌リスクの検証に基づく C 型肝炎の新規治療戦略.

第 15 回日本肝臓学会大会, 福岡, 2011 年 10 月.

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（肝炎等克服緊急対策研究事業）
（分担）研究報告書（平成23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: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。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。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。

A. 研究目的

われわれはこれまでに HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスを用いて, 第一世代 protease 阻害剤である telaprevir と NS5B 阻害剤 MK7079 を併用することにより, IFN 製剤を使用せずとも HCV の排除が可能であることを示した。本研究では, 同モデルを用いて NS5A 阻害剤と第二世代 protease 阻害剤または NS5A 阻害剤との併用療法の有効性を検討した。

B. 研究方法

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。1 週おきにマウス血中 HCV RNA 量を測定し, 投与前後の NS3, NS5A および NS5B 領域のアミノ酸配列を direct sequence にて解析した。

C. 結果

Genotype 1b 型 HCV 感染マウスに対し, 第二世代 protease 阻害剤, NS5A 阻害剤および非核酸型 NS5B 阻害剤いずれも単独投与によりマウス血中 HCV RNA を低

下させたが、投与中ウイルスの再増加を認めた。投与後の解析にてそれぞれ耐性株 (NS3のD168E変異, NS5AのY93H変異あるいはNS5BのC316N変異) が検出された。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、投与1週後にマウス血中HCV RNAは陰性化した。観察した投与7~8週まで陰性化が持続した。肝臓内HCVもPCRにて検出されず、おそらく完全排除されたものと思われた。

一方、genotype 2a型および2b型感染マウスに対するNS5A阻害剤 + 第二世代protease阻害剤あるいはNS5A阻害剤 + NS5B阻害剤の併用投与はいずれもマウスHCVをほとんど低下させず、無効であった。

D. 考察

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、genotype 1b型HCVに対しては有効であったが、genotype 2型に対しては無効であった。今回した患者血清を含め、genotype 2型には第二世代protease阻害剤、NS5A阻害剤およびNS5B阻害剤耐性変異を有していることが多くこれが無効であった原因の一つと思われる。

E. 結論

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。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

• Hiraga N, Abe H, Imamura M, Tsuge M, Takahashi S, Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Nakamura Y, Kamatani N, Chayama K. Impact of viral amino acid substitutions and host IL28B polymorphism on replication and susceptibility to interferon of hepatitis C virus. *Hepatology* 2011;54:764-771

• Hiraga N, Imamura M, Abe H, Nelson Hayes C, Kono T, Onishi M, Tsuge M, Takahashi S, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Tanaka S, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone in vivo. *Hepatology* 2011;54:781-788

2. 学会発表

• Hiraga N, Imamura M, Abe H, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi T, Ochi H, Iwao E, Kamiya N, Yamada I, Tateno C, Yoshizato K, Matsui H, Kanai A, Inaba T, Chayama K. Rapid emergence of telaprevir resistant hepatitis C virus strain from wild type clone

in vivo. 12th AASLD, San Francisco.

November 4, 2011

• Imamura M, Abe H, Hiraga N, Tsuge M, Takahashi S, C. Hayes CN, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Chayama K. Impact of Viral Amino Acid Substitutions and Host IL28B polymorphism on Replication and

Susceptibility to Interferon of Hepatitis C Virus. The 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco, 2011

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、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型慢性肝疾患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(+)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）と相関していた。これより、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。

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の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型肝炎における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、慢性肝炎・肝がん患者の末梢血Tregの頻度、亜分画、機能解析とともにTregの制御にかかわる骨髄由来抑制細胞（MDSC）について検討した。

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について検討した。また得られたCD14(+)HLA-DR(-/low)MDSC分画の頻度、免疫制御能、病態（肝炎の活動性、線維化、TNMステージ）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、実施機関の「医学部倫理審査委員会」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リンパ球は、非がん患者（健常人、慢性肝炎、肝硬変）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CD45RO陽性細胞の頻度が増加していた。
- 3) 肝がん患者の病態との関連について、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。
- 4) CD14(+)HLA-DR(-/low)MDSC分画は、共培養アッセイ系においてPBMCの増殖を抑制し、免疫制御能を示した。
- 5) MDSC分画の頻度は慢性肝炎患者において10.1%と検出され、健常対照者9.4%と比べて変動を認めなかった。また、慢性肝炎における活動性（A因子）や線維化（F因子）の程度と有意な関連を認めなかった。
- 6) MDSC分画の頻度は、肝がんステージI/II 17.0%、III/IV 22.3%であり、慢性肝炎、健常対照に比較して増加していた。

D. 考察

本研究の結果から肝がん患者においてCD4(+)CD25(high)Foxp3(+)制御性Tリンパ球の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いた。

また、制御性Tリンパ球の誘導や活性に関与すると考えられるCD14(+)/HLA-DR(-/low) 骨髄由来抑制細胞は、肝がん患者において増加しており、病期の進展にも関連していた。これらの結果より、C型慢性肝疾患を背景とする肝がん患者においては、骨髄由来抑制細胞や制御性Tリンパ球が抗腫瘍免疫反応に対して抑制的に作用している可能性が示唆され、がん病期の進展を促進していることが推察された。

これまで、他の悪性腫瘍においても制御性Tリンパ球や骨髄由来抑制細胞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。骨髄由来抑制細胞は単一の細胞ではなく、今回の検討で用いたCD14(+)/HLA-DR(-/low)分画は、単球由来MDSCと呼ばれており、顆粒球由来MDSC分画とは区別されている。いずれも腫瘍局所、全身における免疫制御への関与が注目されている。

本年度の研究では、肝がんの病態における制御性Tリンパ球や骨髄由来抑制細胞の関連は示唆されたものの、抗ウイルス治療の効果や発がんとの関連を含めた詳細な臨床経過、予後への関与は不明のままであった。今後はこれらの臨床的意義に加えてさらなる免疫ネットワークにおける免疫賦活系や免疫抑制系との相互作用について検討を進める必要性が示唆された。

E. 結論

C型慢性肝疾患を背景とする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された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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, Sakai A, Sakai Y, Kagaya T, Yamashita T, Honda M, Kaneko S: Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific T-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011; 53:

1206-1216.

- 3) Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group: Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 141: 128-140.
- 4) Takata Y, Nakamoto Y, Nakada A, Terashima T, Arihara F, Kitahara M, Kakinoki K, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Kaneko S: Frequency of CD45RO+ subset in CD4+CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2011; 307: 165-173.
- 5) Yamashita T, Arai K, Sunagozaka H, Ueda T, Terashima T, Yamashita T, Mizukoshi E, Sakai A, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S: Randomized, Phase II Study Comparing Interferon Combined with Hepatic Arterial Infusion of Fluorouracil plus Cisplatin and Fluorouracil Alone in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncology* 2011; 81: 281-290.

2. 学会発表

- 1) Nakamoto Y, Yamashita T, Kaneko S: Differential Dynamics of the NF-kappaB subunits RELA and RELB in a Mouse Model of Chronic Hepatitis B. 第62回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California): Hepatology 54 (4, Suppl.) 1300A; 一般; poster: Nov. 8, 2011
- 2) Arihara F, Mizukoshi E, Kitahara M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Increase of CD14+HLA-DR-/low myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma and its impact for prognosis of patients. 第62回 American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) Annual Meeting (San Francisco, California): Hepatology 54 (4, Suppl.) 1400A; 一般; poster: Nov. 8, 2011

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 genotype 2a, 2b, 4a 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の解析

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 genotype 1b (HCV-1b) 感染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) 治療応答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) のアミノ酸配列多様性の重要性を報告してきた。本研究では、HCV-1b 以外の genotype、とくに HCV-2a、HCV-2b や HCV-4a について、Peg-IFN/RBV 治療応答性を規定する因子について比較検討した。その結果、HCV-2a において、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 ケ所以上あること (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 ケ所以上あること (ISDR/+C[2a] ≥1) が抽出され、多変量解析により IRRDR[2a]≥4 のみが同定された。一方、HCV-2b においては、SVR と相関するウイルス側因子は認められなかったが、RVR と相関する因子として、IRRDR のアミノ末端領域の一部に変異が 3 ケ所以上あること (IRRDR/N[2b]≥3) が同定された。また、HCV-4a においては、SVR と相関する因子として IRRDR の変異が 4 ケ所以上あること (IRRDR[4a]≥4) が同定された。HCV-1b において重要な役割を担うことが報告されているコア蛋白質 70 位の変異は、HCV-2a や HCV-2b の場合には、治療効果との相関は見られなかった。以上の結果より、HCV-2a、HCV-2b、HCV-4a においても、IRRDR 多様性の解析は Peg-IFN/RBV 治療応答性の予測に有用であることが示唆された。

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) 高ウイルス血症の症例の約半数で、また HCV-2a、-2b では約 80%の症例で、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、残りの症例では SVR が望めない (Non-SVR)。

我々はこれまでに、HCV-1b 慢性肝炎症例の 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)}。また、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)}。さらに、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) も重要である⁵⁻⁷⁾。

本研究では、HCV-1b 以外の genotype、とくに HCV-2a, -2b, -4a の慢性肝炎患者症例について、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 の変異数、コア蛋白質 70 位、90 位の変異）、及び宿主側因子（IL28B SNP 等）の関与の有無を検討した。

B. 研究方法

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た。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～経過観察期間中常にウイルス血症陽性の者 (Null-response) に分類した。また、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、既報の方法に準じて RT-PCR 法により HCV の NS5A（とくに HCV-1b で見出された ISDR 及び IRRDR に相当する領域とその周辺領域）並びに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。IL28B SNP が T/T である症例を IL28B-Major とし、IL28B SNP が T/G または G/G である症例を IL28B-Minor に分類した。(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-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 感受性と関連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 と関連する因子として、単変量解析及び多変量解析により、いずれも γ -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 と関連する因子として、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] \geq 3) 及び年齢が抽出された。多変量解析により IRRDR/N[2b] \geq 3 のみが RVR と関連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 と関連する因子として、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] \geq 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。

D. 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 ISDR³⁾ 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 SNP⁵⁻⁷⁾ 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] \geq 4 と ISDR/+C[2a] \geq 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] \geq 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 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。

E. 結論

HCV-2a と HCV-4a 慢性肝炎患者において、IRRDR の変異数が多い (≥4) 症例では SVR との相関が強かった。また、ISDR/+C≥1 も HCV-2a 慢性肝炎患者において SVR と有意な相関を示した。一方、HCV-2b においては、IRRDR のアミノ末端領域の一部の変異数が多い (≥3) 症例で RVR と有意な相関が見られた。以上の結果より、HCV-2a、HCV-2b、HCV-4a においても、IRRDR 多様性の解析は Peg-IFN/RBV 治療応答性の予測に有用であることが示唆された。

[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*, 55:1-11, 2012.
- 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) 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.
- 6) 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.

- 7) 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.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. El-Shamy A, Shoji I, Kim SR, Ide Y, Imoto S, Deng L, Yoon S, Fujisawa T, Tani S, Yano Y, Seo Y, Azuma T, Hotta H. Sequence heterogeneity in NS5A of hepatitis C virus genotypes 2a and 2b and clinical outcome of pegylated-interferon/ribavirin therapy. PLoS ONE, 7(2): e30513. 2012.
2. 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, 55(1): 1-11, 2012.
3. Sasayama M, Shoji I, Adianti M, Jiang D-P, Deng L, Saito T, Watanabe H, Kawata S, Aoki C, Hotta H. A point mutation at ASN-534 that disrupts a conserved N-glycosylation motif of the E2 glycoprotein of hepatitis c virus markedly enhances the sensitivity to antibody neutralization. J Med Virol, 84(2): 229-234. 2012.
4. Shoji I, Deng L, Hotta H. Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders. Front Microbiol, 2: A278, 1-5. 2012.
5. Kamada K, Shoji I, Deng L, Aoki C, Ratnoglik SL, Wakita T, Hotta H. Generation of a recombinant reporter hepatitis C virus useful for the analyses of virus entry, intra-cellular replication and virion production. Microbes Infect, 14(1): 69-78. 2012.
6. Kim SR, Saito J, Imoto S, Komaki T, Nagata Y, Nakajima T, Ando K, Fukuda K, Otono Y, Kim KI, Ohtani A, Sugimoto K, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, Hotta H, Maekawa Y, Hayashi Y, Kudo M. Correlation between insulin resistance and outcome of pegylated interferon and ribavirin therapy, hepatic steatosis, hepatic fibrosis in chronic hepatitis C-1b and high viral load. Digestion, 84 Suppl 1: 5-9. 2011.
7. Kim SR, Saito J, Imoto S, Komaki T, Nagata Y, Kim KI, Sasase N, Kimura N, Sasatani K, Konishi E, Hasegawa Y, Fujinami A, Ohta M, El-Shamy A, Tanaka Y, Sugano M, Sakashita M, Nakamura A, Tsuchida S, Makino T, Kawada T, Nakajima T, Morikawa T, Muramatsu A, Kasugai H, Hotta H, Kudo M. Double-filtration plasmapheresis plus interferon- β for HCV-1b patients with non-sustained virological response to previous combination therapy. Digestion, 84 Suppl 1: 10-16. 2011
8. Nakashima K, Takeuchi K, Chihara K, Hotta H, Sada K. Inhibition of hepatitis C virus replication through

AMP-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Microbiol Immunol*, 55(11): 774-782, 2011.

9. Deng L, Shoji I, Ogawa W, Kaneda S, Soga T, Jiang DP, Ide YH, Hotta H. Hepatitis C virus infection promotes Hepatic gluconeogenesis through an NS5A-mediated, FoxO1-dependent pathway. *J Virol*, 85(17): 8556-8568, 2011.
10. El-Shamy A, Shoji I, Saito T, Watanabe H, Ide YH, Deng L, Kawata S, Hotta H. Sequence heterogeneity of NS5A and core proteins of hepatitis C virus and virological responses to pegylated-interferon/ribavirin combination therapy. *Microbiol Immunol*, 55(6): 418-426, 2011.
11. 勝二郁夫, El-ShamyAhmed, 堀田博. NS5A-IRRDR変異数. *医学のあゆみ*, 239 (12-13): 1208-1211, 2011.
12. 勝二郁夫, El-ShamyAhmed, 堀田博. C型肝炎ウイルスNS5A領域のISDR・IRRDRとインターフェロン治療効果予測. *肝胆膵*, 63(6): 1063-1069, 2011.

2. 学会発表

1. Ahmed El-Shamy, Ikuo Shoji, Takafumi Saito, Yoshi-Hiro Ide, Lin Deng, Sumio Kawata, Hak Hotta. Polymorphisms of serine protease-domain of NS3 and Core protein of hepatitis C virus genotype 1b associate with hepatocellular carcinoma development. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 14, 2011. Sapporo, Japan.

2. 金守良, 井本勉, 堀田博, 土田忍, 外山博近, 田中基文, 前川陽子, 谷口美幸, 金啓二, 勝二郁夫, 長野基子, 井出良浩. 併用療法無効患者に対する二重濾過血漿交換療法(DFPP)のEVRに関係するウイルスダイナミックス、宿主因子(IL28B)とウイルス因子の検討. 第47回日本肝臓学会総会, 2011. 東京.
3. 進藤道子, El-ShamyAhmed, 勝二郁夫, 奥野忠雄, 堀田博. 肝癌発生前後におけるC型肝炎ウイルス遺伝子(IRRDR、ISDRとコア蛋白)多様性の経時的変化の検討. 第47回日本肝臓学会総会, 2011. 東京.
4. 金守良, EL-ShamyAhmed, 堀田博. ウイルス変異(とくにIRRDR)と宿主因子(とくにIL28B)からみた1b高ウイルス量C型慢性肝炎に対する治療戦略 治療応答との関係を中心に. 第47回日本肝臓学会総会, 2011. 東京.
5. 金守良, 井本勉, 堀田博, 谷口美幸, 金啓二, El ShamyA., 勝二郁夫, 林祥剛, 土田忍, 外山博近, 田中基文, 前川陽子. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN α -2b+Ribavirin(併用療法)におけるインスリン抵抗性と治療効果、肝組織所見、BMIとの関連. 第15回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
6. 瀬尾靖, 三木章, 矢野嘉彦, 斎藤雅也, 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EVR・SVRに関与する因子の検討. 第15回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.
7. 金守良, 堀田博, El ShamyA. C型慢性肝炎に対するPEG-IFN α -2b/Ribavirin併用療法におけるIRRDR変異の臨床的意義. 第15回日本肝臓学会大会, 2011. 福岡.

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される可能性があるものの、耐性ウイルス解析が進んでいない抗HCV化合物について、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。HCV NS2は前駆体タンパク質のプロセッシングだけでなく感染性粒子産生にも重要であることが明らかにされているが、阻害剤開発は必ずしも進んでいない。本研究ではまず、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#42では、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。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス（HCV）のライフサイクルに関する研究が進展し、HCVの遺伝子発現、蛋白プロセッシング、ゲノム複製、粒子形成などの分子メカニズムが明らかになりつつある。それに従い、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HCVタンパク質阻害剤、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るものと期待される。

B. 研究方法

HCV NS2結合性化合物は理化学研究所 松本武久博士より供与された。

HCV JFH-1株のゲノムcDNAプラスミド（pJFH1）から直鎖化RNAを合成し、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SL2を作製した。

SL2細胞へNS2結合性化合物を種々の濃度で添加し、その抗HCV作用を細胞内外のHCV Coreタンパク質測定（ELISA法）により評価した。また、HCV Core-NS2プラスミドとルシフェラーゼ遺伝子含サブゲノムレプリコンプラスミドを共発現させることによるtrans-packagingシステムにて各化合物のHCV粒子形成阻害効果を評価した。

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

理化学研究所 松本博士より供与された HCV NS2 結合性化合物 60 種類を SL2 細胞へ終濃度 10 または 50 μM で添加し、3 日間培養後、培養上清中の HCV Core を測定した。Core レベルを 30%以下まで阻害し、細胞傷害性の低かった 13 化合物について、2~50 μM で抗 HCV 活性の再現性を調べ、活性の強い 5 化合物 (#3, #8, #13, #41, #42) を選抜した。各化合物を段階希釈し SL2 細胞へ添加、抗 HCV 活性の EC50 値を算出したところ、#3; 19.5, #8; 22.0, #13; 18.8, #41; 18.0, #42; 5.1(μM)であった。

これらの化合物の抗 HCV 活性の作用機序を調べるため、trans-packaging システムにて NS2/3 切断に依存しない HCV 粒子形成系への影響を解析したところ、5 化合物とも粒子形成阻害活性を認めた。50 μM 添加時、どの化合物も粒子産生を 70%以下まで阻害した。特に、#41, #42 化合物は 90%以上阻害した。

そこで次に、この NS2 結合性化合物#41 及び #42 に対する耐性 HCV 出現の可能性を検討した。#41 を 25 μM 、#42 を 12.5 μM で SL2 細胞へ添加、4-5 日間隔で細胞を継代し、継代時に化合物を新たに添加した。#41 添加細胞では、培養 43 日目まで約 50%の HCV 産生阻害活性を維持した。それに対して、#42 添加細胞では、培養 8 日後から阻害活性が低下し、培養 20 日目には HCV 産生レベルは未処理感染細胞と同等まで回復した。すなわち、化合物存在下での長期間培養により、耐性ウイルスの出現または細胞側の変化（たとえば薬剤排出系の機能変化）の可能性が考えられた。化合物耐性ウイルスの可能性を検証するため、#42 を 43 日間添加した感染細胞の培養上清を回収し、ナイーブな Huh7.5.1 細胞へ感染させ、#42 化合物の抗 HCV 活性を解析した。その結果、#42 化合物 6.25~50 μM では抗 HCV 活性は認められなかった。#42 の長期間処理によって耐性 HCV が出現した可能性が示唆された。

D. 考察

HCV タンパク質を標的とした特異的抗 HCV 剤の開発が世界的に活発に行なわれている。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ことは言うまでもない。しかしながら、現在のところ、NS2 阻害剤の開発は進んでいない状況にある。理化学研究所 松本研究室では、NS2 の立体構造情報を基にして *in silico* スクリーニングから NS2 結合性の化合物群を選抜、作出した。本研究ではこれらの化合物について、HCV JFH-1 株の感染増殖細胞系で HCV 産生阻害活性を評価し、高阻害活性を有する化合物を得た。さらに、最も抗 HCV 活性の高かった化合物#42 では、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。今後、詳細なウイルス遺伝子解析等から 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いきたい。

E. 結論

HCV 持続感染細胞系を使って、HCV NS2 結合性化合物の HCV 産生阻害活性を調べ、抗 NS2 化合物を見出した。持続感染細胞への長期間添加実験から、NS2 阻害剤耐性 HCV が出現する可能性が示唆された。

F. 研究発表

論文発表

1. Saeed M, Suzuki R, Watanabe N, Masaki T, Tomonaga M, Muhammad A, Kato T, Matsuura Y, Watanabe H, Wakita T, Suzuki T. Role of the ERAD pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of the viral particles. *J Biol Chem* 286: 37264-37273, 2011.
2. Yamamoto M, Aizaki H, Fukasawa M, Teraoka T, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Structural requirements of virion-associated cholesterol for infectivity, buoyant density and apolipoprotein association of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 92:

- 2082-2087, 2011.
3. Akazawa D, Morikawa K, Omi N, Takahashi H, Nakamura N, Mochizuki H, Date T, Ishii K, Suzuki T, Wakita T. Production and characterization of HCV particles from serum-free culture. *Vaccine* 29: 4821-4828, 2011.
 4. Saeed M, Shiina M, Date T, Akazawa D, Watanabe N, Murayama A, Suzuki T, Watanabe H, Hiraga N, Imamura M, Chayama K, Choi Y, Krawczynski K, Liang TJ, Wakita T, Kato T. In Vivo adaptation of hepatitis C virus for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology* 54: 425-433, 2011.
 5. Honda M, Takehana K, Sakai A, Tagata Y, Shirasaki T, Nishitani S, Muramatsu T, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shimakami T, Yi M, Lemon SM, Suzuki T, Wakita T, Kaneko S. Malnutrition Impairs Interferon Signaling Through mTOR and FoxO Pathways in Patients With Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 141: 128-140, 2011.
 6. Miyoshi H, Moriya K, Tsutsumi T, Shinzawa S, Fujie H, Shintani Y, Fujinaga H, Goto K, Todoroki T, Suzuki T, Miyamura T, Matsuura Y, Yotsuyanagi H, Koike K. Pathogenesis of lipid metabolism disorder in hepatitis C: polyunsaturated fatty acids counteract lipid alterations induced by the core protein. *J Hepatol.* 54: 432-438, 2011.
 7. Wen X, Abe T, Kukihara H, Taguwa S, Mori Y, Tani H, Kato N, Suzuki T, Tatsumi M, Moriishi K, Matsuura Y. Elimination of hepatitis C virus from hepatocytes by a selective activation of therapeutic molecules. *PLoS One.* 6: e15967, 2011.
 8. Watanabe N, Aizaki H, Matsuura T, Kojima S, Wakita T, Suzuki T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 407 : 135-140, 2011.
 9. Inoue Y, Aizaki H, Hara H, Matsuda M, Ando T, Shimoji T, Masaki T, Shoji I, Homma S, Matsuura Y, Miyamura T, Wakita T, Suzuki T. Chaperonin TRiC/CCT participates in replication of hepatitis C virus genome via interaction with the viral NS5B protein. *Virology* 410: 38-47, 2011.
- 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。

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治療効果との関係

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 部長

研究要旨; C 型慢性肝炎症例 (genotype 1b、高ウイルス量) に対する NS5A 阻害剤 (BMS790052) と PEG-IFN+RBV 併用療法と NS5A 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤 (BMS650032) 併用療法について検討した。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; NS5A 阻害剤と PEG-IFN+RBV 併用療法では、Naïve 例 9 例、PEG-IFN/RBV の non-responder 8 例に対して治療が行われた。NS5A 阻害剤の投与量は 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。Non-responder 例では、8 例中 2 例が SVR となった。NS5A 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤併用 24 週間投与の前治療 null responder 群 11 例では、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。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。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。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耐性ウイルスの出現を認めた。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。またラミブジンとアデフォビル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併用療法中に認められた。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。naïve 例に対するエンテカビルの耐性ウイルスの検討では 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。C 型慢性肝炎に対する新規薬剤である NS5A 阻害剤と PEG-IFN+RBV の naïve 例に対する 3 者併用療法 24 週間投与の治療効果は高い。また NS5A 阻害剤とプロテアーゼ阻害剤併用 24 週間投与の治療効果も高く、今後多数例での検討が必要である。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、テノフォビルなどの新規治療薬の効果が期待される。

A. 研究目的

従来 C 型慢性肝炎の治療の主体は、Pegylated Interferon (PEG-IFN) と Ribavirin (RBV) の併用療法であったが、本邦で多い genotype 1b

型、高ウイルス量症例に対する 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かった。最近新規治療薬であるプロテアーゼ阻害剤の terapevir と PEG-IFN+RBV 併用療法が保険適応となり、治療

が開始されている。しかし貧血や皮膚症状などの副作用が認められることや、IL28B の遺伝子型、HCV Core のアミノ酸置換の有無などから効果が低い症例も依然認められる。副作用が少なく、より効果が高い新規治療薬の出現が期待されている。新規治療薬である NS5A 阻害剤、プロテアーゼ阻害剤の効果について検討した。

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。35歳以上の症例では IFN 療法の効果が少ないため、核酸アナログ製剤による治療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で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。このうちラミン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への耐性ウイルスが出現する症例がある。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。

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。

(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、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)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) naive 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 , A 181 T , A181S+T184A+M204I の変異であった。

D. 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。

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。さらに naive 例に対するエンテカビル投与例からも少数例ではあるが、ウイルスの再上昇例(エンテカビル耐性ウイルス出現例を含む)を認めた。このような核酸アナログ製剤で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 NS5A 阻害剤と PEG-IFN+RBV の naive 例に対する 3 者併用療法 24 週間投与の治療効果は高い。ま