

Expression of Viral DNA and Antigens. **Hepatology**. 2006;44(4):915-24.

21. **Tanaka Y**, Mukaide M, et al. Specific Mutations in Enhancer II/Core Promoter of Hepatitis B Virus Subgenotypes C1/C2 Increase the Risk of Hepatocellular Carcinoma. **J Hepatol**.2006;45(5):646-53.
22. Ozasa A, **Tanaka Y**, et al. Influence of Genotypes and Precore Mutations on Fulminant or Chronic Outcome of Acute Hepatitis B Virus Infection. **Hepatology**. 2006;44(2):326-34.
23. **Tanaka Y**, Kurbanov F, et al. Molecular Tracing of Global Hepatitis C Virus Epidemic Predicts Regional Patterns of Hepatocellular Carcinoma Mortality. **Gastroenterology**. 2006;130(3):703-714.
24. Fujiwara K, **Tanaka Y**, et al. Novel type of hepatitis B virus mutation - “replacement mutation” involving hepatocyte nuclear factor 1 binding site tandem repeat in chronic hepatitis B genotype E. **J Virol**. 2005;79(22):14404-14410.
25. **Tanaka Y**, Hanada K, et al. Molecular Evolutionary Analyses Implicate Injection Treatment for Schistosomiasis in the Initial Hepatitis C Endemic of Japan. **J Hepatol**. 2005;42(1):47-53.
26. **Tanaka Y**, Hasegawa I, et al. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. **Hepatology**. 2004;40:747-755.
27. Hasegawa I, **Tanaka Y**, et al. A novel hepatitis B virus genotype A subtyping assay that distinguishes subtypes Aa from Ae and its application in epidemiological studies. **J Virol**. 2004;78(14):7575-7578.
28. **Tanaka Y**, Hanada K, et al. A comparison of molecular clock of hepatitis C virus in the United States and Japan predicts that hepatocellular carcinoma incidence in the US will increase over the next two decades. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002;99(24):15584-15589.

#### 特許

1. *C型肝炎の治療効果を予測するためのマーカー群、検査方法及び検査用キット*  
田中靖人、溝上雅史、徳永勝士。  
2011年3月3日。特許公開2011-193786  
財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、公立大学法人名古屋市立大学。
2. *C型肝炎の治療効果を予測するためのマーカー及びC型肝炎の治療効果の予測を行う方法並びにC型肝炎の予防又は治療剤。*  
田中靖人、溝上雅史、徳永勝士。  
2011年3月3日。特許公開2011-41526。  
財団法人ヒューマンサイエンス振興財団、公立大学法人名古屋市立大学。

(課題番号: H22-肝炎-一般-005)

研究課題名:

ウイルス性肝炎に対する応答性を規定する宿主因子も含めた情報のデータベース構築・治療応用に関する研究  
名古屋市立大学 田中靖人

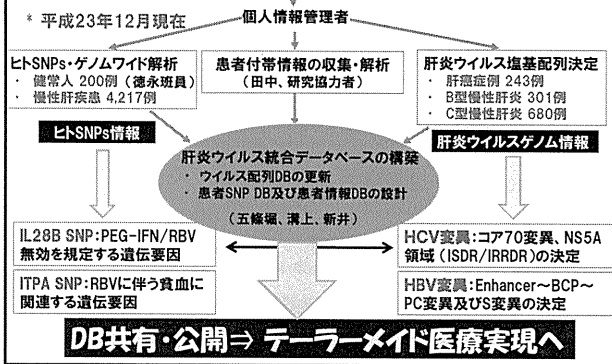
目的: 肝炎ウイルス感染に対する応答性(病態進展)や薬剤応答性の個人差に関わるヒト及びウイルス両方の遺伝子要因を同一個体内で明らかにし、統合型肝炎データベースを構築する

研究の目標

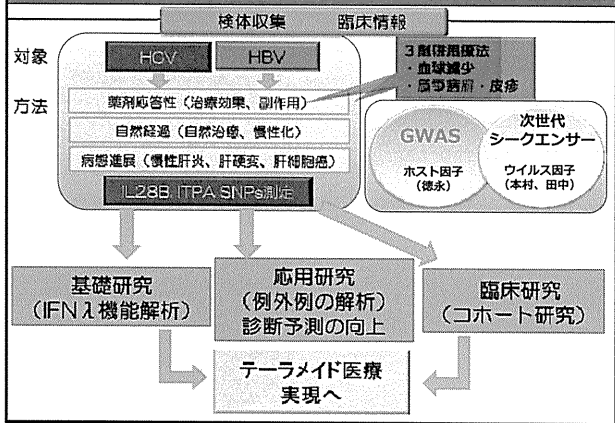
- 1) IL28B & ITPA SNPs診断に基づいたテーラーメイド医療の確立(対費用効果を考慮して治療選択:3剤併用、発癌抑止)
- 2) IFNλ 機能解析から新規治療薬の開発
- 3) ゲノムワイド関連解析から臨床応用へ(高齢者への対策:副作用軽減)
- 4) 統合型データベース構築 & 公開

これまでの研究成果

全国35施設からの検体提供(各施設で匿名化)



統合型肝炎データベース構築 (田中、新井、溝上、五條堀)



SNP Array 6.0によるタイプング結果

GWAS  
宿主因子  
(徳永)

総タイプング数: 1,210検体  
 # QC call rate >95%: 1,114検体  
 平均QC call rate: 97.98%

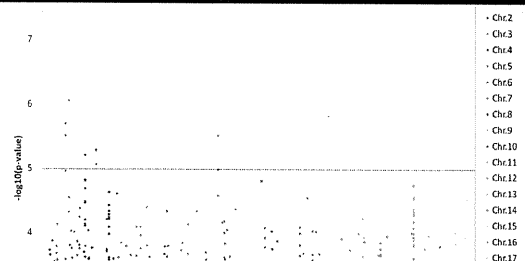
<サブグループ間統計比較の内訳>

1. HBV: HBV患者群 (181) vs. 健康群 (184) vs. HBcAb陽性群 (185)  
⇒ HLA-DPA1, B1 (OR=0.4)
2. HCV自然治癒: 自然治癒群 (106) vs. 慢性肝炎患者群 (197)  
⇒ IL28B (OR=0.09)
3. 好中球減少:  
好中球量750以下 (114) vs. 600以下 (50) vs. 1,000以上 (302)

5. IFN誘発うつ病: うつ症状あり (69) vs. うつ症状なし (181)

過去のIFN治療でうつ病と診断(Case):GWAS実施

うつ病群(後ろ向き研究)69検体と比較対照群181検体



抑うつ症状の経時的変化を、自記式うつ病評価尺度(BDI-II)で前向きに追跡(20施設, n=300) ⇒ 抑うつの有無(カットオフ14点)でGWAS施行中

### 基礎研究 (IFNλ機能解析)

- 1) IFNλの発現制御機構の解明 (田中、瀧上、坂本)
- 2) IFNλを制御する低分子化合物のスクリーニング (坂本)
- 3) オミックス解析 (瀧上): エピジェネティクスなど
- 4) DNAチップやSAGEを用いたトランスクリプトーム解析とデータベース化 (本多)
- 5) IFNλ関連のネットワーク解析 (五條堀)
- 6) 新規薬剤の開発研究 (田中): in vitro, キメラマウス

### 臨床研究 (コホート研究)

### IL28B 遺伝子多型によるIFNλ産生能の違い

#### HCV感染Primary HepatocyteのmRNA

#### Poly I:C.刺激によるPBMC中のmRNA

(our unpublished data)

肝細胞からのλ産生能には差がない

IL28B SNP Major typeでは血中IL28B産生能が高い

### 基礎研究 (IFNλ機能解析)

### 臨床研究 IL28B&ITPA SNP (コホート研究)

- 1) 肝炎コホートをを用いた治療効果や発癌に関連した因子 ⇒ 臨床情報、SNPs情報、HCV変異、薬剤投与量を加えて、多変量解析またはデータマイニング解析 (八橋、黒崎、坂本、菅内)
- 2) 住民コホートをを用いたHCV自然治癒や病態進展に関連した因子 (渡辺)
- 3) 副作用 (血球減少、うつ病) に関連した宿主要因の解明 ⇒ GWASにより、新規SNPsの同定 (徳永)

### HCV Cohort Design (1991-2009) 山形

1991 - 1995

7925 persons

HCV-Ab (+) 1078 (13%)    6847 (-)

HCV RNA (+) 846 (78%)    232 (22%) (-)

1996 - 2009

562    274    10

drop-out    HBsAg (+)

454    106

treated with IFN (18.9%)

1. Incidence of HCC

2. Incidence of spontaneous HCV elimination

### Inosine triphosphatase (ITPA)マイナータイプ:

ITPase活性低下によるITP蓄積→リハビリ誘導性貧血に対して抵抗性

Hb: ITPA major type  
有意に減少=RBV減量

ITPA SNP (rs1127354)

— CC

— CA+AA

— overall

【治療効果】

年齢	治療法	NR (%)	Rel (%)	SVR (%)
60歳未満	CC	63%		
	CA+AA	71%		
60歳以上	CC	43%		
	CA+AA	69%		

P=0.02

### データベース共有・公開

臨床情報  
未発表データ  
既発表データ

ウイルス情報  
HBV/HCV subtype  
変異

SNP情報  
GWAS replication  
有意SNP

SNP Array  
タイピング  
結果

検索    マイニング    治療効果予測    etc...

WWW / IF    利用者認証

一般研究者 ←

臨床情報

- 1,460人
- 1,500レコード (一部重複)

SNP情報

- SNP Array 6.0アッセイ
- IL28B replication study (DigiTag2)
- ITPA replication study (DigiTag2, TaqMan)

班員

### 治療効果予測の例

**parameters**

SNP: rs8099917 (IL28B) (TT)  
 gender: M  
 age: 60  
 liver biopsy F factor: 2  
 FIB adherence: ignore if < 60%  
 RBV adherence: ignore if < 60%

**60歳未満男性  
 SNP(rs8099917)  
 : major homo**

**result**

corrected rate	
SVR, TR	NR, Null
100.00 %	0.00 %

raw data (num. patients)

SVR, TR	NR, Null	no data
37 (100.00 %)	0 (0.00 %)	0

DB\_home [top]

**parameters**

SNP: rs8099917 (IL28B) (TT,GG)  
 gender: M  
 age: 60  
 liver biopsy F factor: 2  
 FIB adherence: ignore if < 60%  
 RBV adherence: ignore if < 60%

**60歳未満男性  
 SNP(rs8099917)  
 : minor allele を含む**

**result**

corrected rate	
SVR, TR	NR, Null
21.55 %	78.45 %

raw data (num. patients)

SVR, TR	NR, Null	no data
4 (50.00 %)	7 (87.50 %)	0

DB\_home [top]

### 行政施策への貢献の可能性

**IL28B & ITPA SNPs簡便・安価な測定法の確立**  
 ⇒ コホート研究(テラプレビル含む3剤併用)にも応用可能  
 ⇒ IL28B & ITPA SNPs 診断を基軸とした  
 テーラーメイド治療の確立

対費用効果

高齢者      副作用

**ゲノムワイド関連解析**  
 による副作用及び自然経過・病態進展に関連する宿主要因の解明

**インターフェロンλ  
 機能解析**  
 ⇒ メカニズムの解明  
 ⇒ 新規薬剤の開発

**データベース公開 ⇒ テーラーメイド医療実現へ**

## 平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業 成果概要

研究課題：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  
課題番号：H22 - 肝炎 - 一般 - 006  
予定期間：H22 年度から H24 年度まで  
研究代表者：榎本 信幸  
所属研究機関：山梨大学  
所属部局：第一内科  
職名：教授  
年次別研究費(交付決定額)：1 年目 80,600,000 円 2 年目 77,376,000 円

### I. 研究の意義

1. 肝炎ウイルス感染の治療抵抗性および病変進展、肝発癌が大きな問題となっている。
2. これら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により難治性ウイルス肝炎の制御が期待される。

### II. 研究の目的、期待される成果

本研究は以下の目的で実施する。

1. 治療抵抗性肝炎ウイルス感染の病態を肝炎ウイルス遺伝子変異から解析し診断・治療法を確立する。
2. ウイルス肝炎の多様な病態(病変進展、発癌)に関連する肝炎ウイルス遺伝子変異を明らかとして、宿主因子との相互作用を解明して診断・予防・治療に展開する。
3. 病態に関連する肝炎ウイルス遺伝子変異の機能を解明することにより新規治療法の開発の基盤とする。
4. 肝炎ウイルス遺伝子情報を一般臨床に応用するために遺伝子検査・解析法の標準化を行う

本研究の結果として、直接的には以下の成果が期待される

1. 現行治療の効果的な適用により安全・確実なウイルス肝炎治療体系が実現する。
2. ウイルス性肝炎の多様な経過・病態に関与するウイルス因子を解明により、宿主因子との統合的な理解から予後予測診断・新たな治療標的の同定が可能となる。
3. 治療抵抗性・病変進展・発癌の病態の解明により肝炎ウイルス感染機構に関する理解が深まるとともに肝炎制御法開発の新たな基盤が形成される。
4. 研究により得られる肝炎ウイルス遺伝子情報を一般臨床へ導入するための基盤が形成される。

### III. 2 年間の研究成果

●研究代表者(榎本信幸):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。

●研究分担者(横須賀収):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。

●研究分担者(朝比奈靖浩): 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。

●研究分担者(鈴木文孝):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の効果を明らかとした。C 型肝炎に対する PEG-IFN/RBV/プロテアーゼ阻害剤の効果に関する HCV 遺伝子変異を解明した。

●研究分担者(加藤直也):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

●研究分担者(中川美奈):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。

●研究分担者(堀田 博):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。

●研究分担者(加藤宣之):Li23 由来の細胞システムで検出されたリバビリンの抗 HCV 活性は、イノシンーリン酸脱水素酵素の阻害により細胞内 GTP 濃度が下がることに起因していることを見出した。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。

●研究分担者(鈴木哲朗):HCV 持続感染細胞を NS4A 阻害剤存在下で長期間培養し NS4A 阻害剤に対する感染細胞の低感受性を観察した。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とした。

●研究分担者(今村道雄):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。

●研究分担者 (中本安成): 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。

●研究分担者 (松本武久): NS2/3 プロテアーゼ阻害剤スクリーニング系開発のための活性化型 NS2/3 プロテアーゼタンパク質の in vitro 大量合成および NS2/3 プロテアーゼ阻害剤アッセイ系の開発に成功した。

●研究分担者 (山下篤哉): 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を同定した。

●研究分担者 (藤井秀樹): 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。

#### IV. 平成 24 年度の課題

1. 発癌、薬剤耐性、肝炎鎮静化などの病態を規定する HBV 遺伝子変異の解析とその臨床応用
2. プロテアーゼ阻害剤など新規 HCV 治療薬の反応性を規定する HCV ゲノム変異および宿主因子の解明
3. 自然免疫分子・IL28B 変異治療抵抗性に関与する機序と HCV-NS5A、コア遺伝子変異との関連の解明
4. 病変進展・肝発癌・肝癌タイプに関与する HCV 遺伝子変異および宿主因子の解析とその機序の解明
5. 培養細胞系およびマウスモデルによる変異ウイルスによる肝炎病態および治療抵抗性の解析
6. 変異肝炎ウイルスに有効な新規化合物の探索法の開発および同定
7. 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、特に次世代シーケンシングの応用

#### V. 行政施策への貢献の可能性

1. 現行治療の効果的な適用により安全、確実なウイルス肝炎治療体系が実現
2. ウイルス性肝炎の多様な経過・病態の解明から予後予測診断の開発・新たな治療標的の同定
3. 治療抵抗性・病変進展・発癌の病態の解明により肝炎制御法開発の新たな基盤が形成
4. 研究により得られる肝炎ウイルス遺伝子情報を一般臨床へ導入

#### VI. 2 年間の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

##### ●主任研究者 (榎本信幸)

- Miura M, Maekawa S, Kadokura M, Sueki R, Komase K, Shindo H, Ohmori T, Kanayama A, Shindo K, Amemiya F, Nakayama Y, Kitamura T, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Enomoto N. Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis. **Hepatology Int.** 2011 August 17. [Epub ahead of print]
- Shindo H, Maekawa S, Komase K, Kadokura M, Sueki R, Miura M, Shindo K, Amemiya F, Kitamura T, Nakayama Y, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Okada S, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Enomoto N. Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. **Hepatology Int.** 2011 August 17. [Epub ahead of print]
- Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. 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(9):e24514.
- Kadokura M, Maekawa S, Sueki R, Miura M, Komase K, Shindo H, Amemiya F, Uetake T, Inoue T, Sakamoto M, Nakagawa M, Sakamoto N, Watanabe M, Enomoto N. Analysis of the complete open reading frame of hepatitis C virus in genotype 2a infection reveals critical sites influencing the response to peginterferon and ribavirin therapy. **Hepatology Int.** Sep;5(3):789-99.
- Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Honda M, Sugiyama M, Matsuura K, Sugauchi F, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Sakai A, Kaneko S, Ito K, Masaki N, Tokunaga K, Izumi N, Mizokami M. Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. **J Hepatol.** 2011 Mar;54(3):439-48.

##### ●研究分担者 (藤井秀樹)

- Formeister EJ, Tsuchiya M, Fujii H, Shpyleva S, Pogribny IP, Rusyn I. Comparative analysis of promoter methylation and gene expression endpoints between tumorous and non-tumorous tissues from HCV-positive patients with hepatocellular carcinoma. **Mutat Res.** 2010 Oct 13;692(1-2):26-33. Epub 2010 Aug 22
- Tsuchiya M, Parker JS, Kono H, Matsuda M, Fujii H, Rusyn I. Gene expression in nontumoral liver tissue and recurrence-free survival in hepatitis C virus-positive hepatocellular carcinoma. **Mol Cancer.** 2010 Apr 9;9:74.

##### ●研究分担者 (横須賀收)

- Miyamura T, Kanda T, Nakamoto S, Wu S, Fujiwara K, Imazeki F, Yokosuka O. Hepatic STAT1-Nuclear Translocation and Interleukin 28B Polymorphisms Predict Treatment Outcomes in Hepatitis C Virus Genotype

- 1-Infected Patients. **PLoS One** (in press).
- Tamura R, Kanda T, Imazeki F, Wu S, Nakamoto S, Tanaka T, Arai M, Fujiwara K, Saito K, Roger T, Wakita T, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C Virus nonstructural 5A protein inhibits lipopolysaccharide-mediated apoptosis of hepatocytes by decreasing expression of Toll-like receptor 4. **J Infect Dis**. 2011 Sep 1;204(5):793-801.
  - **研究分担者 (朝比奈靖浩)**
  - Asahina Y, Tsuchiya K, Muraoka M, Tanaka K, Suzuki Y, Tamaki N, Hoshioka Y, Yasui Y, Katoh T, Hosokawa T, Ueda K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Nitta S, Sakamoto N, Izumi N. Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in IL28B with antiviral response. **Hepatology**. 2011 Aug 24. [Epub ahead of print]
  - Asahina Y, Tsuchiya K, Tamaki N, Hirayama I, Tanaka T, Sato M, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Kurosaki M, Enomoto N, Izumi N. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. **Hepatology**. 2010 Aug;52(2):518-27.
  - **研究分担者 (鈴木文孝)**
  - Suzuki E, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Arase Y, Hirakawa M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Kamatani N, Nakamura Y, Chayama K, Kumada H. Influence of ITPA polymorphisms on decreases of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir. **Hepatology** 2011;53(2): 415-421.
  - Akuta N, Suzuki E, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H. Amino acid substitution in 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.
  - **研究分担者 (中川美奈)**
  - Funaoka Y, Sakamoto N, Suda G, Itsui Y, Nakagawa M, Kakinuma S, Watanabe T, Mishima K, Ueyama M, Onozuka I, Nitta S, Kitazume A, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Watanabe M. Analysis of interferon signaling by infectious hepatitis C virus clones with substitutions of core amino acids 70 and 91. **J Virol**. 2011;85: 5986-94
  - 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
  - **研究分担者 (堀田 博)**
  - 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.
  - 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
  - **研究分担者 (加藤宣之)**
  - 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 in vitro. **Liver Int**. 30: 1324-1331 (2010).
  - Mori K, Ikeda M, Ariumi Y, Dansako H, Wakita T, Kato N. Mechanism of action of ribavirin in a novel hepatitis C virus replication cell system. **Virus Res.**, 151: 61-70 (2011).
  - **研究分担者 (鈴木哲朗)**
  - 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.
  - 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.
  - **研究分担者 (今村道雄)**
  - 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(3):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(3):781-788
  - **研究分担者 (中本安成)**
  - 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.
  - 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; 28: 165-173.
  - **研究分担者 (松本武久)**
  - Takaya D, Yamashita A, Kamijo K, Gomi J, Ito M, Maekawa S, Enomoto N, Sakamoto N, Watanabe Y, Arai R, Umeyama H, Honma T, Matsumoto T, Yokoyama S. A new method for induced fit docking (GENIUS) and its application to virtual screening of novel HCV NS3-4A protease inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 19:6892-6905, 2011

## Ⅶ. Ⅲ(2年間の研究成果)の概要図等

研究の目的:ウイルス肝炎の病態を規定する肝炎ウイルス遺伝子変異の解明と治療応用

背景:肝炎ウイルス遺伝子変異による多彩な病態  
B型肝炎ウイルス(HBV)に対する核酸アナログ治療  
ポリメラーゼ変異  
→長期投与による核酸アナログ耐性ウイルスの出現の予測は困難  
C型肝炎ウイルス(HCV)に対するインターフェロン・リバビリン治療  
コア・NS5A変異→依然として多数の治療抵抗性患者が存在  
難治性患者は肝硬変・肝癌に進展  
病変進展・発癌の多様性の機序は不明  
→ウイルス・宿主遺伝子の多様性  
肝炎ウイルス遺伝子変異の解析による病態解明・診断治療法の開発が急務

### H22-23年度の成果

#### 核酸アナログ耐性HBV感染の解析

ラミブジンおよびアデホビル耐性、多剤耐性に関するHBV遺伝子変異

#### 治療抵抗性HCV感染の解析

治療抵抗性HCVの全ゲノム解析による耐性遺伝子の解明  
NS5A遺伝子変異(ISDRとIRRDRC)がIL28Bとは独立に治療反応性を決定  
薬剤抵抗性の解明  
HCV NS5B蛋白/コア変異によるインターフェロン系抑制機構の解明  
リバビリンの作用機序の解明/IL28Bによるインターフェロン増強作用の解明  
プロテアーゼ耐性NS3変異の臨床的意義:次世代シーケンサでの解析  
ウイルス因子と宿主因子の相互関係  
コア70変異がIL28B多型と関連し、NS5A変異とともにインターフェロン/リバビリン/テラプレビルの治療効果を規定

#### 病変進展・発癌に関するウイルス遺伝子変異と宿主因子

コア70変異は病変進展・発癌と関連:次世代シーケンサでの検証  
背景肝の遺伝子発現パターンが肝癌の遺伝子発現と関連:発癌予測へ応用

#### 新規の診断治療法の開発基盤

肝炎ウイルス変異解析への次世代シーケンサの導入:コア、NS3、NS5遺伝子解析  
肝炎モデルマウス・細胞培養系での新規HCV薬の解析系の開発

期待される成果:肝炎ウイルス遺伝子情報の診断・治療への応用、新規治療法の開発

治療抵抗性・病変進展・発癌に関するウイルス変異の病態解明→  
予後予測による病変進展予防・早期診断・治療アルゴリズムの開発  
宿主因子との相互関係、発癌・病原性機構の解明による新たな治療標的の同定  
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→  
検査法・解析アルゴリズムの標準化と検証、有用性のエビデンスの確立  
治療効果の向上により肝硬変・肝癌死亡の減少



## ○研究代表者の研究歴等

### ・過去に所属した研究機関の履歴

昭和 62 年(1987)–平成 2 年(1990) 金沢医科大学・消化器内科  
平成 3 年(1991)–平成 12 年(2000) 東京医科歯科大学・第2内科  
平成 13 年(2001)–平成 15 年(2003) 東京医科歯科大学・消化器内科  
平成 16 年(2004)以降 山梨大学医学部・第1内科

### ・主な共同研究者(又は指導を受けた研究者)

金沢医科大学・消化器内科 高田 昭 教授  
東京医科歯科大学・第2内科 丸茂文昭 教授  
東京医科歯科大学・保健衛生学科 佐藤千史 教授  
東京医科歯科大学・消化器内科 渡辺 守 教授  
武蔵野赤十字病院 泉 並木 副院長

### ・主な研究課題

1. HCV における治療反応性および病態を決定するウイルスおよび宿主因子の解明
2. HBV 遺伝子変異と病態
3. HCV 培養細胞モデルによる HCV 増殖機構、薬剤の抗ウイルス作用について分子生物学的研究
4. 消化器癌における発癌機序について網羅的遺伝子解析

### ・これまでの研究実績

1. *Characterization of naturally occurring protease inhibitor-resistance mutations in genotype 1b hepatitis C virus patients. Hepatol Int. 2011 Aug 18.*
2. *Analysis of viral amino acids sequences and the IL28B SNP influencing the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. Hepatol Int. 2011 Aug 17.*
3. *Association of geneexpression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response. Hepatology. 2011 Aug 24.*
4. *Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. J Hepatol. 2011 Mar;54(3):439-48.*
5. Effect of aging on risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2010 Aug;52(2):518-27.
6. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol*. 2009;44(10):1009-15.
7. Targeting lipid metabolism in the treatment of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2008 Feb 1;197(3):361-70.
8. Potential relevance of cytoplasmic viral sensors and related regulators involving innate immunity in antiviral response. *Gastroenterology*. 2008 May;134(5):1396-405.
9. The presence of steatosis and elevation of alanine aminotransferase levels are associated with fibrosis progression in chronic hepatitis C with non-response to interferon therapy. *J Hepatol*. 2008 May;48(5):736-42. Epub 2008 Feb 26.
10. Development of plaque assays for hepatitis C virus and isolation of mutants with enhanced cytopathogenicity and replication capacity. *Virology* 2008 Feb 5;371(1):71-85.
11. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Sep;23(9):1437-47.
12. HCV nonstructural proteins responsible for suppression of RIG-I/Cardif-induced interferon response. *J Gen Virol* 2007 Dec;88(Pt 12):3323-33.
13. Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J Viral Hepatitis* 2006 Oct;13(10):690-700.
14. Site-specific mutation of the interferon sensitivity-determining region (ISDR) modulates hepatitis C virus replication. *J Viral Hepatitis* 2006 Sep;13(9):582-90.
15. Viral load change and sequential evolution of entire hepatitis C virus genome in Irish recipients of single source-contaminated anti-E immunoglobulin. *J Viral Hepatitis* 2005 Nov;12(6):594-603.
16. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2005 Oct;43(4):623-9.
17. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005 Oct;42(4):962-73.
18. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin A is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology*. 2005 Sep;129(3):1031-41.
19. Introduction of NS5A mutations enables subgenomic HCV replicon derived from chimpanzee-infectious HC-J4 isolate to replicate efficiently in Huh-7 cells. *J Viral Hepat*.2004 Sep;11(5):394-403.
20. Quantitation of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction--and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. *J Infect Dis*. 2004 Apr 1;189(7):1151-7. Epub 2004 Mar 12.
21. Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. *J Virol*. 2004 Sep;78(18):9713-20.
22. Synergistic inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by combination of ribavirin and interferon- alpha. *J Infect Dis*. 2004 Apr 1;189(7):1129-39. Epub 2004 Mar 16.
23. Inhibition of intracellular hepatitis C virus replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Rep* 2003 Jun;4(6):602-8.
24. 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.

●特許番号 2939171 および 3629372: ジェノタイプ 1b のC型肝炎ウイルスに対する治療の有効性の判定方法及びそのためのプライマー

### 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

主任研究者: 榎本信幸(山梨大学)

**目的:** ウイルス肝炎の病態を規定する肝炎ウイルス遺伝子変異の解明と治療応用

**背景:** 肝炎ウイルス遺伝子変異による多様な病態  
 B型肝炎ウイルス感染に対する治療アナログ治療  
 ポリマーゼ変異一長病状による持続アナログ耐性ウイルスの出現の予測は困難  
 C型肝炎ウイルス感染に対するインターフェロン/リビリン治療  
 コア/NS5A変異一長病状として多数の治療抵抗性患者が存在  
 一部の患者は肝硬変・肝癌に進展  
 コア変異? 一長変異・長病の多様性の機序は不明  
 肝炎ウイルス遺伝子変異の解明による病態説明・診断治療法の開発が急務

**方法:** 臨床的および基礎的な肝炎ウイルス遺伝子変異の統合的解析

<b>治療抵抗性HCV感染の解析</b> 治療抵抗性HCV感染の全ゲノム解析による耐性遺伝子の解明 コア/NS5A遺伝子変異と治療抵抗性 薬剤抵抗性機序の解明 ウイルス変異によるインターフェロン系抑制機構 リビリン抵抗性機序の解明 NS5A変異プロファイル解析 宿主因子(自然免疫系分子, IL28B系 etc.)の解析 ウイルス因子と宿主因子の相互関係	<b>持続アナログ耐性HBV感染の解析</b> HBVゲノム解析による耐性変異ウイルスの出現予測 病変進展・発癌に際するウイルス遺伝子変異 経時的・機率的ウイルス遺伝子および宿主遺伝子解析 新規の病態説明・診断治療法の開発基盤 肝炎分子マウス・細胞培養系での解析 新規技術を応用した肝炎ウイルス化合物スクリーニングシステム
---	---

**効果:** 肝炎ウイルス遺伝子情報の診断・治療への応用、新規治療法の開発

治療抵抗性ウイルス変異の病態説明  
 予測・診断法、発生機構・病態説明および治療法開発  
 インターフェロン系抑制機構および阻害剤のウイルスおよび宿主因子の相互関係の解明  
 耐性ウイルスによる新たな病態の診断・治療法の開発  
 病変進展・発癌に際するウイルス遺伝子変異の解明  
 予後予測による病変進展予防・早期診断・治療アルゴリズムの開発  
 新たな治療法の開発  
 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  
 検査法・解析アルゴリズムの標準化と検証、有用性のエビデンスの確立  
 治療効果の向上により肝硬変・肝癌死亡の減少

### HCV-1bにおいてPeginterferon/Ribavirin 治療効果を規定する HCV遺伝子領域

治療早期の良好な反応性

NS5 2209-2248 (Interferon Sensitivity Determining Region)

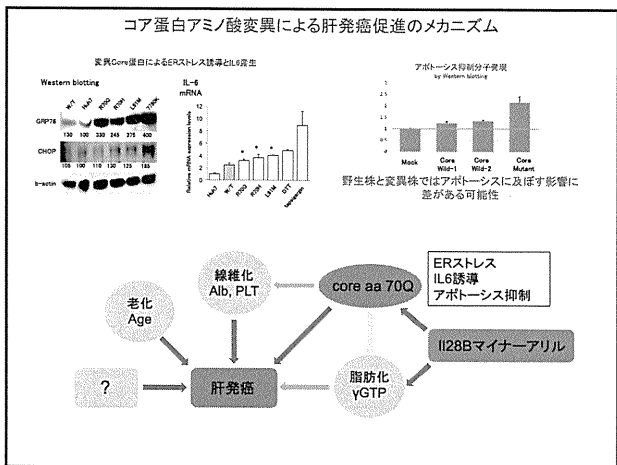
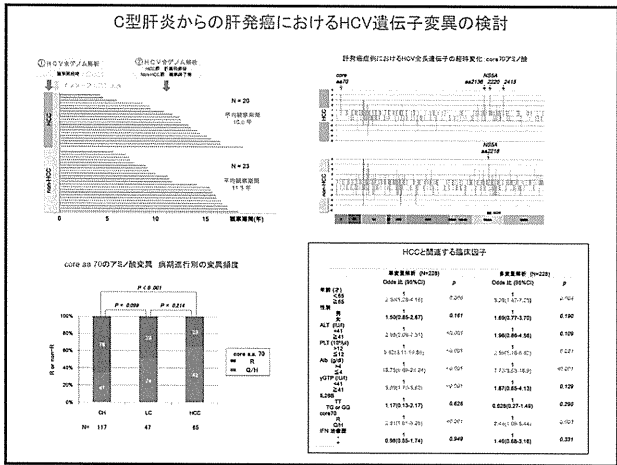
Core R70Q  
治療抵抗性

IL28B SNP

NS5 2334-2379 (IFN/RBV resistance-determining region)

再発・最終治療効果

NS5AのISDRが大きく、IRRDRが細かく IFN感受性を決定



### 次世代シーケンサー Roche Genome Sequencer (GS) Junior による肝炎ウイルス遺伝子解析の導入

キャピラリーシーケンサー

Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer

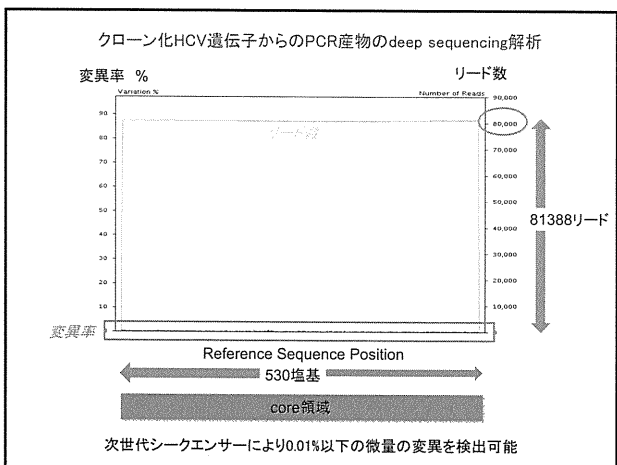
1 run 12時間で 100リード (4本キャピラリー)

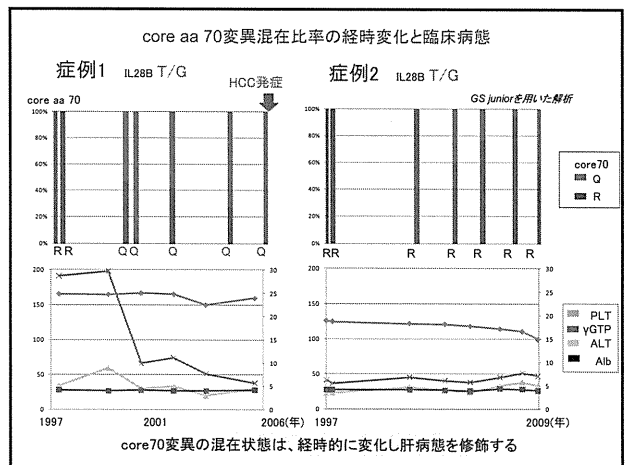
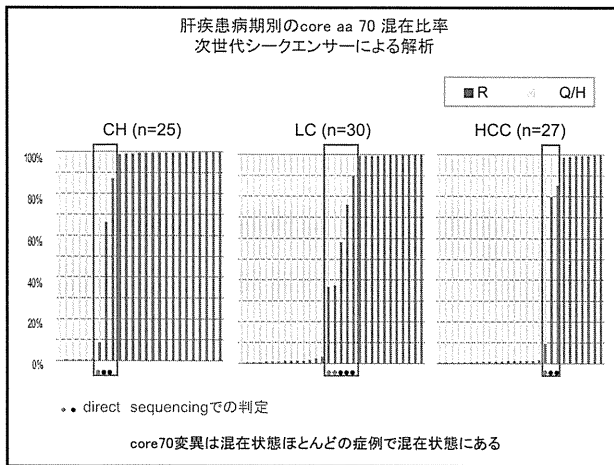
次世代シーケンサー

Roche Genome Sequencer (GS) Junior

1 run 10時間で 100,000リード

これまでのキャピラリーシーケンサーの1,000倍の処理速度

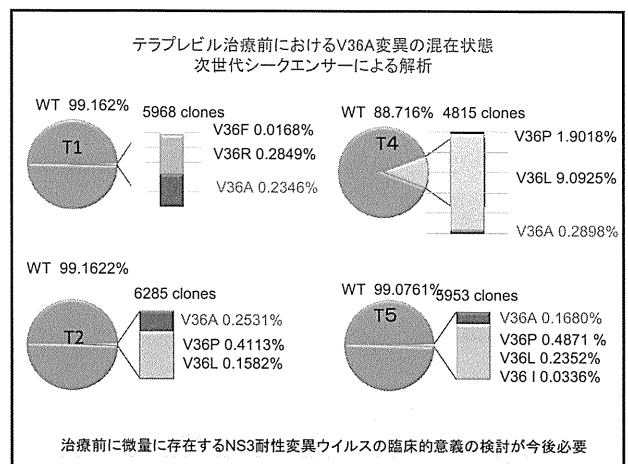
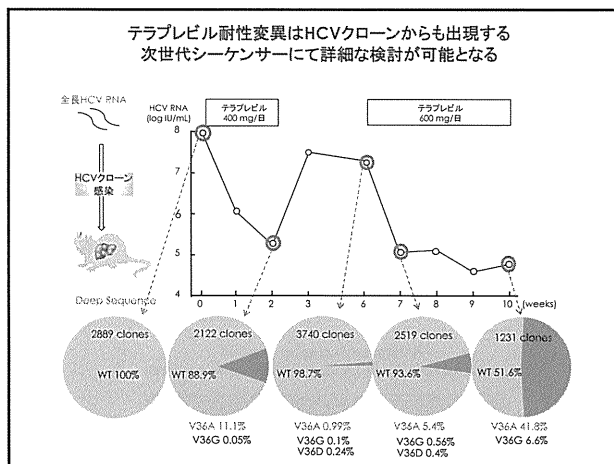
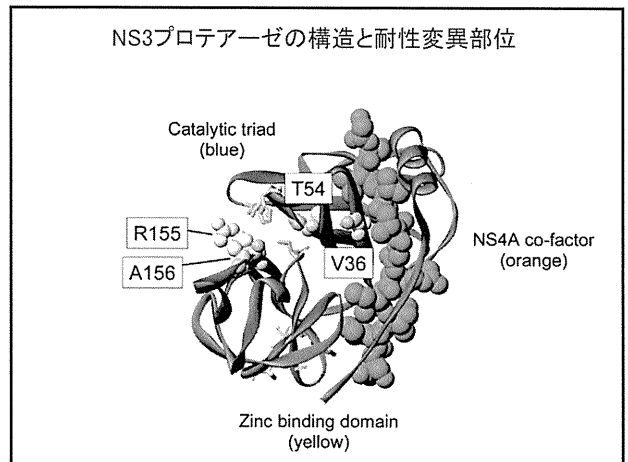




3剤(PEG-IFN+RBV+TPV)併用療法のウイルスおよび宿主遺伝子背景と治療効果

年齢/性	初/再 (前治療)	F/A	IL28B	ISDR 変異数	IRRD/R 変異数	コア 70/91	HCV RNA	2W	4W	8W	12W	24W	+12W	+24W	
T1 43/M	初	1/1	T/G	1	6	W/M	6.8	<1.2 (+)	(-)	(-)	(-)	(-)	中止		SVR
T2 48/M	初	2/2	T/T	1	7	W/W	6.7	<1.2 (+)	(-)	(-)	(-)	(-)			SVR
T3 43/M	初	1/1	T/G	0	12	W/M	6.7	<1.2 (+)	(-)	(-)	(-)	(-)			SVR
T4 56/M	再	2/1	T/T	0	4	W/W	7.4	<1.2 (+)	(-)	(-)	(-)	(-)			SVR
T5 60/M	再	2/2	T/G	1	6	M/W	5.7	<1.2 (+)	(-)	(-)	(-)	(-)			SVR
T6 53/M	再	1/2	T/G	0	6	M/M	6.4	<1.2 (+)	(-)	(-)	(-)	(-)			SVR
C1 49/M	初	2/2	T/T	1		W/M	6.8	3.9	3.0	<1.2 (+)	(-)	(-)			Relapse
C2 50/M	初	2/2		4		W/W	6.7	5.2	1.5	(-)	(-)	(-)			SVR
C3 20/F	初	1/1		0		M/M	6.7	2.1	1.0	(-)	(-)	(-)			SVR

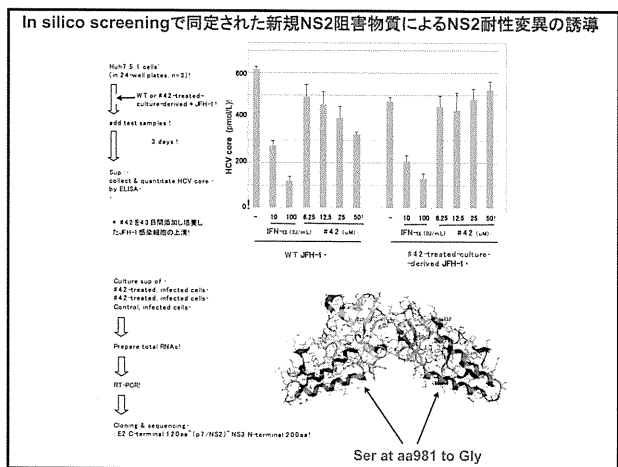
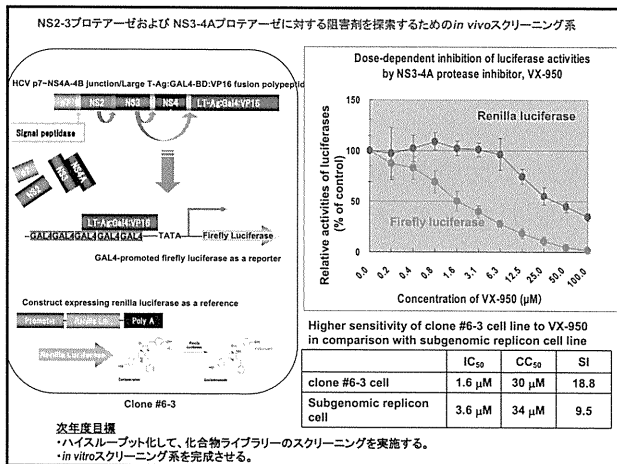
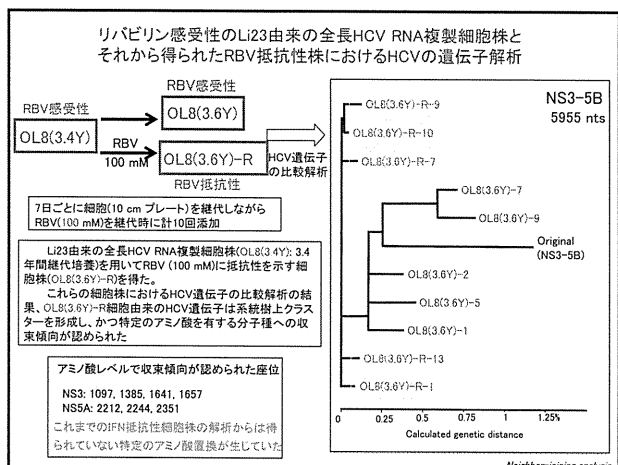
IL28Bminor、core70変異の難治症例においては NS5A-IRRD/R遺伝子変異が治療効果に影響する



Protease阻害剤(BMS-650032)+NS5A阻害剤(BMS-790052)  
24週併用療法 (IFN不適格例)

No.	Age	Sex	IFN不適格理由	Core IL28B (aa70)	W	開始時		Response
						NS3 RNA量	NS5A 耐性	
1	47	M	鬱	TT	W	6.3	(-)	(-) SVR
2	57	F	喘息	TT	W	6.8	(-)	(-) SVR
3	70	F	高齢	TT	M	6.9	(-)	(-) SVR
4	73	M	高齢	TT	W	6.6	(-)	(-) SVR
5	64	F	鬱	TG	W	6.7	(-)	Y93H BT
6	57	M	PN	TT	M	6.8	(-)	L31M, Y93H BT
7	69	F	貧血	TT	W	6.3	(-)	(-) SVR
8	72	F	高齢	TT	W	5.1	(-)	(-) SVR
9	75	F	高齢	TT	W	7.5	(-)	(-) SVR
10	56	F	心気症	TT	W	6.8	(-)	(-) 同意撤回
11	60	F	非定型好転癌	TT	M	7.4	(-)	(-) Relapse
12	73	F	高齢	TT	M	6.8	(-)	Y93H Relapse

NS5A阻害剤による治療においてはNS5A遺伝子変異の deep sequencing解析が重要となる



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  
H22-23年度の成果と今後の課題

H22-23年度の成果

**核酸アナログ耐性HBV感染の解析**  
3'末端およびアデノビル耐性、多剤耐性に関与するα-DNA複製子変異

**治療抵抗性HCV感染の解析**  
治療抵抗性HCVの全ゲノム解析による耐性遺伝子の解明  
NS5A遺伝子変異 NS5RとNS5BのIL28Bとは独立に治療反応性を決定  
薬剤抵抗性の解明  
HCV-NS5B蛋白/コア変異によるインターフェロン抑制機構の解明  
リパリンの作用機序の解明 IL28Bによるインターフェロン増強作用の解明  
プロテアーゼ阻害剤NS3阻害剤の臨床的意義、次世代シーケンサでの解析  
ウイルス因子と宿主因子の相互関係  
コア70変異がIL28B多型と関連し、NS5A変異とともにインターフェロン/リパリン/テラプレビル  
の治療効果を規定、自然免疫分子の役割

**病変進展・発症に関するウイルス遺伝子変異と宿主因子**  
コア70変異は病変進展・発症と関連、次世代シーケンサでの検証、機能解析  
有翼肝の遺伝子発現パターンが肝癌の遺伝子発現と関連、発症予測へ応用

**新規の診断治療法の開発基盤**  
肝炎ウイルス変異解析への次世代シーケンサの導入、NS3、NS5B遺伝子解析  
*in silico*および肝臓モデルマウス・細胞培養系での新規HCV薬の解析系の開発、NS2阻害剤

今後の課題

1. 発症、薬剤耐性、肝炎鎮静化などの病態を規定するHCV遺伝子変異の解析とその臨床応用
2. プロテアーゼ阻害剤など新規HCV治療薬の反応性を規定するHCVゲノム変異および宿主因子の解明
3. 自然免疫分子・IL28B変異治療抵抗性の機序とHCV-NS5A、コア遺伝子変異との関連の解明
4. 病変進展・肝発症・肝癌タイプに関与するHCV遺伝子変異および宿主因子の解析とその機序の解明
5. 培養細胞系およびマウスモデルによる変異ウイルスによる肝炎病態および治療抵抗性の解析
6. 変異肝炎ウイルスに有効な新規化合物の探索法の開発および同定
7. 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、特に次世代シーケンシングの応用

## 平成 23 年度 肝炎等克服緊急対策研究事業『成果概要』

研究課題：肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

課題番号：H22-肝炎-一般-007

予定期間：H22 年度から H24 年度まで

研究代表者：脇田 隆字

所属研究機関：国立感染症研究所

所属部局：ウイルス第二部

職名：部長

年次別研究費(交付決定額)：1年目 62,000,000 円 2年目 60,450,000 円

### I. 研究の意義

HCV 感染に対する治療はインターフェロンとリバビリンの併用により改善してきたが、未だに不十分である。新たな抗ウイルス薬の開発による治療効果の改善が望まれている。HBV 感染では、核酸アナログ剤の長期投与により HBV キャリアの肝癌発生率は低下する。しかし、HBV 排除は容易に達成できないため、生涯の服用も必要と考えられる。さらに薬剤耐性ウイルスの出現およびそのコントロールが問題である。また、近年我が国土着の人獣共通感染症として E 型肝炎ウイルス (HEV) 感染症が問題となってきた。これらの肝炎ウイルスに関する問題点を解決するためには、新たな治療薬の開発が必要である。

### II. 研究の目的、期待される成果

本研究では肝炎ウイルス培養系や増殖系を用いて、ウイルス感染増殖過程の解明による新規治療標的の探索と新規肝炎治療法の開発を目的とする。HCV のウイルス培養系を利用して HCV の感染増殖複製過程を詳細に解析し、関与する宿主因子を同定して、新たな治療標的を同定する。HBV の場合、ウイルスゲノム導入による複製増殖系は確立しているものの、ウイルス感染が可能な培養細胞系が存在しないため、ウイルスライフサイクルの解析は限定的である。そこで、HBV の新たな感染実験系の開発も実施する。HBV、HCV とともに低分子化合物ライブラリーによる抗ウイルス薬のスクリーニングを進める。HEV も最近確立されたウイルス培養系を用いた抗ウイルス薬の開発を進める。また、ヒト iPS 細胞の肝細胞分化誘導技術により、肝炎ウイルス感染増殖が成立する肝細胞分化誘導状態を特定し、関与する宿主因子を網羅的に解析する。

### III. 2 年間の研究成果

#### 1. HCV 感染増殖機構の解析と新規治療法の開発

- ・メバロン酸経路に関わる宿主因子においてゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ II (GGTII) が HCV の複製に必要である。また、GGTII の構成因子である REP-2 が HCV の感染に必須であるが REP-1 は必須でない。

- ・プロスタグランジン I (PGI) 受容体 (IP) アゴニストについて解析したところ、HCV 感染性粒子の産生抑制は特定の IP アゴニストに含まれるトロンボキサン合成酵素 (TXAS) 阻害活性によることが示唆された。また実際に TXAS 阻害剤でも同様の効率良い感染性粒子産生抑制活性が観察された。ヒト肝臓キメラマウスを用いて各薬剤の抗 HCV 活性を検討したところ、感染させたヒト患者血由来 HCV1b の感染伝播を TXAS 阻害剤が抑制した。また TXA と拮抗的な生理活性を持つ IP アゴニストでも同じ効果が観察された。

- ・インターフェロン効果を増強する化合物の大規模スクリーニングを行い、3 種の化合物とその誘導体にインターフェロン応答増強効果、及び抗ウイルス効果の増強を認めた。

- ・PA28 $\gamma$  の 2 量体形成利用したスクリーニング系を改良した。また、ウイルス感染に重要な宿主タンパク質として FKBP6 を同定し、ウイルス感染細胞によって FKBP8 との使い分けがある。

## 2. HCV培養系による抗ウイルス薬スクリーニング

- ・HCV レプリコン細胞を用いた抗ウイルス化合物の大規模スクリーニングによりウイルス増殖を抑制する化合物4種類を同定した。比活性の高かったMCNAについて構造活性相関解析(SAR)を行ったところ、morpholine環構造が抗ウイルス効果に重要な構造であることがわかった。
- ・ビタミンDの代謝産物である25(OH)VDがHCVのウイルス粒子形成を阻害した。
- ・遺伝子型2のHCV株はNS5A阻害剤に対して抵抗性であることを明らかにした
- ・抗HIV活性をもつグリフィスシン(高マンノース型糖鎖特異結合蛋白質)がHCVエントリーを特異的に阻害した。
- ・キナーゼ阻害剤の中から、HCVを含む広範なフラビウイルスに効果のある化合物SFV785を同定するとともに、HCV増殖を抑制する化合物を新たに見出し、その作用機序を解析した。

## 3. HBV感染増殖機構の解析と新規治療法の開発

- ・HBV pseudotype (HBVp)を用いて、ある条件下で培養肝がん細胞株へのHBVpの感染性が向上した。培養肝癌細胞にHBV付着因子が存在することを示唆する結果を得た。
- ・HBVの3次元培養系の確立のために不死化ヒト肝細胞および肝癌細胞株を用い、中空糸ならびにスフェロイドによる培養系を比較検討し、HBV感染を確認した。キメラマウス由来のヒト肝細胞が有用であることを確認した。

## 4. HBV増殖系による抗ウイルス薬スクリーニング

- ・HepG2 2.2.15細胞のリクローニングを行い、HBs抗原産生能が高いクローンを得た。これを用いて薬剤スクリーニングをおこなった。様々な作用点にヒットする化合物を得た

## 5. HEV感染増殖機構の解析と抗ウイルス薬スクリーニング

- ・HEVの感染性cDNAクローンを樹立した。
- ・ケミカルライブラリーによる抗HEV薬スクリーニングの至適化をおこなった。

## 6. HCV感染動物モデル開発

- ・HCV感染に重要なCD81, SR-BI, CLDN1, OCLN発現するマウス(CCS0マウス)を作製した。患者血清に含まれるウイルスをこのマウスに注射したが、マウス血液中にウイルスは検出できなかった。

## 7. ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解析

- ・肝炎ウイルス感染研究のためのヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞の高効率分化誘導法に成功。アルブミンや薬物代謝酵素を高発現する肝細胞の作製に成功した。
- ・iPS細胞は現在報告されている4種のHCV受容体のうち2種(CD81, Occludin)を発現し、肝細胞への分化誘導処理により他の2種(Cacludin-1, SR-BI)を発現することを明らかとした。
- ・iPS細胞は肝細胞への分化誘導処理によりHCVpv感染能、HCVサブレプリコン複製能を獲得することを示した。

## IV. 平成24年度の課題

1. HCV感染増殖機構の解析と新規治療法の開発: HCVの感染にREP-1ではなくREP-2が重要なことを明らかにしたので、REP-2の標的となるRabについて検討する。HCV複製で重要なFKBPファミリータンパク質で機能分子を同定し、詳細な解析を行う。
2. HCV培養系による抗ウイルス薬スクリーニング: 大規模スクリーニングにより同定された化合物の構造をseedとした誘導体化合物の抗ウイルス効果を系統的に解析し作用発現に至適の構造を決定する。
3. HBV感染増殖機構の解析と新規治療法の開発: 培養肝癌細胞に存在すると思われるHBV付着因子を探索。HBV高感染モデルを確立するべく感染持続に最適な条件を検討し、培養系の実用化に向けた改良を重ねる。
4. HBV増殖系による抗ウイルス薬スクリーニング: 既存の核酸アナログ剤と相乗効果を有する薬剤を優先してその作用機序を解析する。同定された阻害物質をリードとして構造最適化を行う。

さらにケミカルバイオロジーの手法により最適化された化合物の作用機序解明を試みる。

5. HEV感染増殖機構の解析と抗ウイルス薬スクリーニング: HEVの抗原測定系により抗ウイルス薬スクリーニングの継続、ウイルス複製増殖に関する宿主因子の制御による治療法の開発。

6. HCV感染動物モデル開発: 4つの蛋白を発現しているCCSOマウスとCd81ノックアウトマウスおよびOclnノックアウトマウスを交配し、CCSOホモ;Cd81<sup>-/-</sup>;Ocln<sup>-/-</sup>マウスを作製し、その初代肝細胞にHCVppが侵入できるかどうかを検討する。

7. ヒトiPS細胞由来肝細胞を用いた肝炎ウイルス感染・複製機構の解析: ヒトiPS細胞由来分化誘導肝細胞が肝炎ウイルス感染研究にどの程度使用できるかを明らかにするとともに、一層高純度な分化誘導肝細胞の作製を行い、肝炎ウイルス感染研究における汎用性を向上させる。

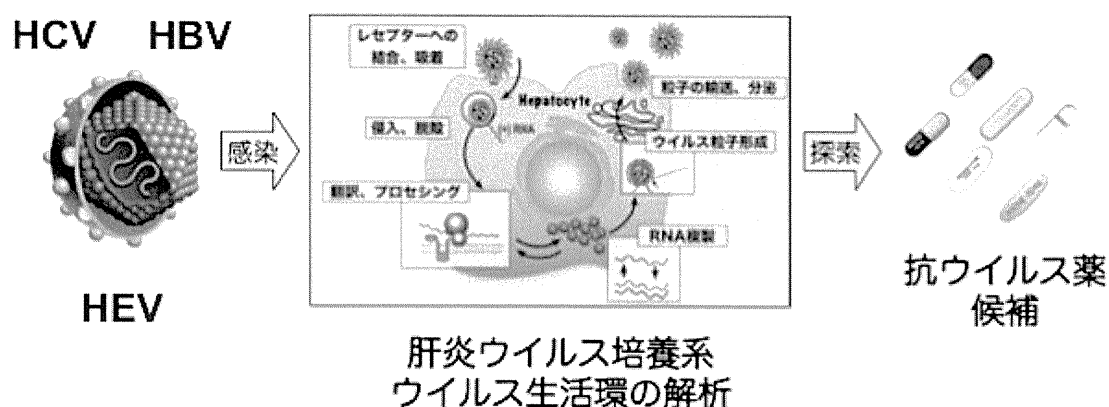
## V. 行政施策への貢献の可能性

肝炎ウイルスに対する新たな治療法の開発は患者の予後を改善するのみならず、肝硬変および肝臓癌という高度な医療が必要な疾患の患者数を減らすことにより、結果的に医療費の低減に寄与し、社会の福祉に寄与することが可能である。さらに最近ウイルス性肝炎患者を広く検診で拾い上げ、治療が必要な患者に対して適切な治療を行うことが社会的な要請であり期待である。この要請に応えるためにはより効果の高い治療法を低コストで実施できるよう開発していく必要がある。

## VI. 本研究の成果(発表論文・ガイドライン・マニュアル等)

- 1: Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog.* 2011 7(10):e1002289.
- 2: 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 endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem.* 2011 286(43):37264-73.
3. H Aly, K Shimotohno, M Hijikata, T Seya: In vitro models for the analysis of HCV life cycle, *Microbiol. and Immunol.* (2011) in press.
4. Hiroyuki Kushima, Takaji Wakita, Makoto Hijikata: A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J. Virol.* (2010) 84(18), 9118-9127
- 5: Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One.* 2011;6(10):e26620.
- 6: Sugauchi F, Tanaka Y, Kusumoto S, Matsuura K, Sugiyama M, Kurbanov F, Ueda R, Mizokami M. Virological and clinical characteristics on reactivation of occult hepatitis B in patients with hematological malignancy. *J Med Virol.* 2011 Mar;83(3):412-8.
7. Taguwa, S., H. Kambara, N. Fujita, T. Noda, T. Yoshimori, K. Koike, K. Moriishi, and Y. Matsuura. 2011. Dysfunction of autophagy participates in vacuole formation and cell death in cells replicating hepatitis C virus. *J. Virol.* 85:13185-13194.
8. Moriishi, K., I. Shoji, Y. Mori, R. Suzuki, T. Suzuki, C. Kataoka, and Y. Matsuura. 2010. Involvement of PA28gamma in the propagation of hepatitis C virus. *Hepatology* 52:411-420.
9. Ueyama M, Nakagawa M, Sakamoto N, Onozuka I, Funaoka Y, Watanabe T, Nitta S, et al. Serum interleukin-6 levels correlate with resistance to treatment of chronic hepatitis C infection with pegylated-interferon-alpha2b plus ribavirin. *Antivir Ther* 2011;16:1081-1091.
10. Watanabe T, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Itsui Y, Nishimura-Sakurai Y, Ueyama M, Funaoka Y, Kitazume A, Nitta S, Kiyohashi K, Murakawa M, Azuma S, Tsuchiya K, Ooka S, Watanabe M. The inhibitory effect on hepatitis C virus infection of a triterpenoid compound, with or without interferon-alpha. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(6):2537-2545.
11. Yamamoto M, Sakamoto N, Nakamura T, Itsui Y, Nakagawa M, Nishimura-Sakurai Y, Kakinuma S, Azuma S, Tsuchiya K, Kato T, Wakita T, Watanabe M. Studies on virus kinetics using infectious fluorescence-tagged hepatitis C virus cell culture. *Hepatol Res* 2011;41:258-269.
12. Raghwan, J., Thomas, X. V., Koekkoek, S. M., Schinkel, J., Molenkamp, R., van de Laar, T., Takebe, Y., Tanaka, Y., Mizokami, M., Rambaut, A. and Pybus, O. G. (2011). The origin and evolution of the unique HCV circulating recombinant form 2k/1b. *J. Virol.* (in press)
13. Ikeda M, Kawai Y, Mori K, Yano M, Abe K, Nishimura G, Dansako H, Ariumi Y, Wakita T, Yamamoto K, Kato N. Anti-ulcer agent teprenone inhibits hepatitis C virus replication: potential treatment for hepatitis C. *Liver Int*, 2011, 31:871-80
14. 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. *Hepatology Res.* , 2010, 40:1248-1253

## VII. III (2年間の研究成果)の概要図等



### 研究の成果

- HCV感染増殖機構の解析と新規治療法の開発:  
新たな宿主因子を同定した。プロスタグランジン受容体アゴニストによる感染性HCV粒子産生阻害
- HCV培養系による抗ウイルス薬スクリーニング  
ビタミンD誘導体によるHCV粒子形成阻害、新たなエントリー阻害剤の同定、キナーゼ阻害剤によるHCV増殖抑制
- HBV感染増殖機構の解析と新規治療法の開発  
偽HBV粒子によるレセプター候補因子の同定、3次元培養によるHBV増殖系の開発
- HBV増殖系による抗ウイルス薬スクリーニング  
複数の標的に対するヒット化合物の同定
- HEV感染増殖機構の解析と抗ウイルス薬スクリーニング  
ウイルス培養系を用いたスクリーニング
- HCV感染動物モデル開発  
レセプターTgマウスの開発と解析
- ヒトiPS細胞由来肝細胞によるHCV感染・複製機構の解析  
iPS由来肝細胞でHCVレプリコン複製が可能となった

本研究の成果に基づいて、ウイルス性肝炎に対する新規治療法の開発が期待でき、肝炎ウイルスキャリアの予後が改善される。肝硬変、肝臓がんへの進展を防止することにより医療費の低減も期待できる。本研究による革新的な技術の開発や成果は我が国だけでなく、世界の医療向上に貢献できる



## ●研究代表者の研究歴等

### ○主任研究者（脇田 隆字）の研究歴等

#### ・過去に所属した研究機関の履歴

昭和63年～平成4年 名古屋大学大学院医学研究科  
 平成4年～7年 ハーバード大学医学部およびマサチューセッツ総合病院癌センター・客員研究員  
 平成7年～10年 東京都臨床医学総合研究所・主任研究員  
 平成10年～18年 東京都神経科学総合研究所・副参事研究員  
 平成18年～現在 国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長

#### ・主な指導を受けた研究者

名古屋大学大学院医学研究科：坂本信夫教授および各務伸一講師（前愛知医大消化器内科教授）

米国ハーバード大学医学部およびマサチューセッツ総合病院癌センター：Jack Wands 准教授

東京都臨床医学総合研究所：小原道法室長

#### ・主な研究課題

C型肝炎ウイルス感染複製機構の解析

肝炎ウイルスの病原性発現機構の解析

肝炎ウイルス感染症の新たな治療法の開発

下痢症ウイルスおよびエンテロウイルスのウイルス学

#### ・これまでの研究実績

- 1: Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, Mizokami M. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One*. 2011;6(10):e26620.
- 2: **Arnaud N, Dabo S, Akazawa D, Fukasawa M, Shinkai-Ouchi F, Hugon J, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. *PLoS Pathog*. 2011 7(10):e1002289.**
- 3: **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 endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway in degradation of hepatitis C virus envelope proteins and production of virus particles. *J Biol Chem*. 2011 286(43):37264-73.**
- 4: 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*. 2011 92(Pt 9):2082-7.
- 5: 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*. 2011 29(29-30):4821-8.
- 6: 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 in chimpanzees for efficient virus production and evasion of apoptosis. *Hepatology*. 2011 54(2):425-33.
- 7: Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T. Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). *PLoS One*. 2011;6(6):e21284.
- 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*. 2011 407(1):135-40
- 9: Nishimura Y, Wakita T, Shimizu H. Tyrosine Sulfation of the Amino Terminus of PSGL-1 Is Critical for Enterovirus 71 Infection. *PLoS Pathog*. 2010 6(11):e1001174.
- 10: Weng L, Hirata Y, Arai M, Kohara M, Wakita T, Watashi K, Shimotohno K, He Y, Zhong J, Toyoda T. Sphingomyelin activates hepatitis C virus RNA polymerase in a genotype-specific manner. *J Virol*. 2010 84(22):11761-70.
- 11: Hishiki T, Shimizu Y, Tobita R, Sugiyama K, Ogawa K, Funami K, Ohsaki Y, Fujimoto T, Takaku H, Wakita T, Baumert TF, Miyanari Y, Shimotohno K. Infectivity of hepatitis C virus is influenced by association with apolipoprotein E isoforms. *J Virol*. 2010 84(22):12048-57.
- 12: Kushima Y, Wakita T, Hijikata M. A disulfide-bonded dimer of the core protein of hepatitis C virus is important for virus-like particle production. *J Virol*. 2010 84(18):9118-27.
- 13: Arnaud N, Dabo S, Maillard P, Budkowska A, Kalliampakou KI, Mavromara P, Garcin D, Hugon J, Gatignol A, Akazawa D, Wakita T, Meurs EF. Hepatitis C virus controls interferon production through PKR activation. *PLoS One*. 2010 5(5):e10575.
- 14: Murayama A, Weng L, Date T, Akazawa D, Tian X, Suzuki T, Kato T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T, Toyoda T. RNA polymerase activity and specific RNA structure are required for efficient HCV replication in cultured cells. *PLoS Pathog*. 2010 6(4):e1000885.
- 15: Takahashi H, Akazawa D, Kato T, Date T, Shirakura M, Nakamura N, Mochizuki H, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Suzuki T, Wakita T. Biological properties of purified recombinant HCV particles with an epitope-tagged envelope. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 395(4):565-71.

### 肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究

研究代表者: 脇田 隆宇

HCV HBV HEV

肝炎ウイルス培養系  
ウイルス生活環の解析

抗ウイルス薬候補

- HCV感染増殖機構の解析と新規治療法の開発:
- HCV培養系による抗ウイルス薬スクリーニング
- HBV感染増殖機構の解析と新規治療法の開発
- HBV増殖系による抗ウイルス薬スクリーニング
- HEV感染増殖機構の解析と抗ウイルス薬スクリーニング
- HCV感染動物モデル開発
- ヒトIPS細胞由来肝細胞によるHCV感染・複製機構の解析

### 遺伝子型3のHCV複製

感染研・脇田

- 日本、米国では遺伝子型1, 2が中心だが、世界的にはその他の遺伝子型のHCV感染が多い
- 実験系、薬剤の開発は遺伝子型1, 2がやはり中心
- 遺伝子型3は南アジア、欧州、オーストラリアなどに多い

遺伝子型3aレプリコンの樹立に成功

WT 10 µg → MT 0.3 µg

- 薬物感受性試験が可能となった。
- インターフェロン感受性は同等
- 既存のNS3PIは遺伝子型2aより感受性高
- NS5bNIIは遺伝子型2aより感受性低

### プロスタノイドによるHCV感染伝播抑制

京都大学ウイルス研究所 土方 誠

立休培養HuS-E/2細胞を用いたHCV生活環の解析

Contribution of PPARα in the replication of HCV genome (Aly et al., BBRC, 379, 330-335, 2009)

- Microarray 解析により立休培養HuS-E/2細胞で特徴的な細胞内シグナルの同定
- 候補シグナルのHCV生活環に対する機能解析(抑制/活性化)
- HCV生活環に関わる細胞内シグナルならびにその機能因の同定

アラキドン酸カスケードがHCVの生活環に関与することを見いだした

IP agonist によるJFH1感染性粒子産生細胞に対する効果

主としてトロンボキサンA2阻害によるHCV阻害活性

C型肝炎ウイルス(HCV)の生活環

ウイルス粒子成熟過程

### HCV培養系を用いた HIV-1/HCV dual inhibitorの探索

感染研・武部

Natural product collection (n=800)

Primary screen (at 5 µM)

2n/3rd screen (at 0.005-5 µM)

Confirmed hits

HIV-1 replication assay (NL432/C8166RS) [RT assay in culture sup]

HCVcc assay (JFH-1/Huh7.5.1) [HCV core output in culture sup]

HIV-1/HCV dual inhibitor activity n=8

	Macromolecule		Small-molecule	
	EC50	SI	EC50	SI
Scytovirin (SVN) (Mw: 9.7 kDa) (95 aa)	157.5 ng/ml (16.9 nM)	1,400	Y	+++ -0.5 nM -10,000
Griffithsin (GRFT) (Domain-swapped dimer; MW: 25 kDa) (Mw: 12.7 kDa (121 aa) as a monomer)	5.36 ng/ml (0.43 nM)	90,800	Y1	+ -0.1 µM -100
			Y2	+++ <10 nM
			Y3	+++ <10 nM
			Y3d	+/- >1 µM

### ヒト肝臓細胞キメラマウスにおけるGRFTのHCV感染防御効果

3-4 log reduction in HCV viral titers

Saline control

HCV (1a) peritoneal inoculation at d0

The anti-viral response last for 30 days and no viral rebound was observed

IFNα+GRFT

IFNα (1,350 IU/g)

GRFT (20 mg/Kg)

Day 3, Day 10, Day 17, Day 24, Day 31

Study Day

### 抗ウイルス薬創製にむけた取り組み

東京医科歯科 坂本・萩原

キナーゼ阻害剤から抗HCVウイルス剤創製 (東京医科歯科大学・細谷孝光先生、伊藤雅也先生との共同研究)

SRP340を出発構造とした類体創製と抗HCV能評価

SRP340より低いドーズで抗HCV能を持つ化合物SFV755を創製

抗DNAウイルス阻害能を持つキナーゼ阻害剤の創製 (東京医科歯科大学・細谷孝光先生との共同研究)

SRP340より低いドーズで抗HSV能を持つ化合物2を創製

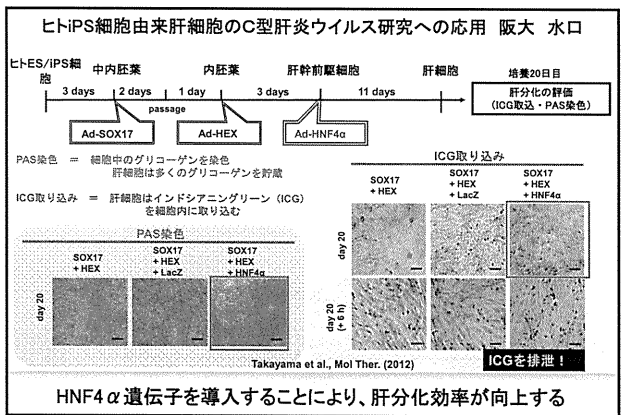
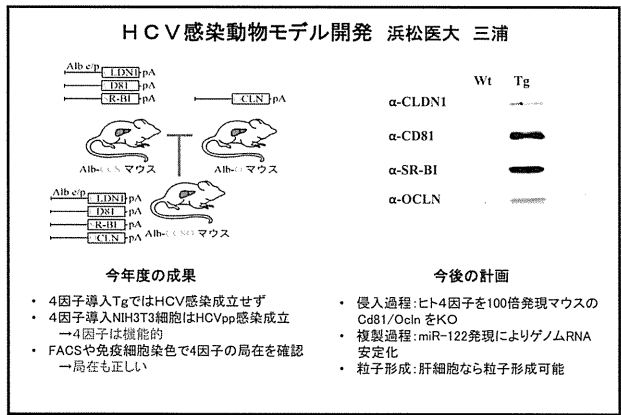
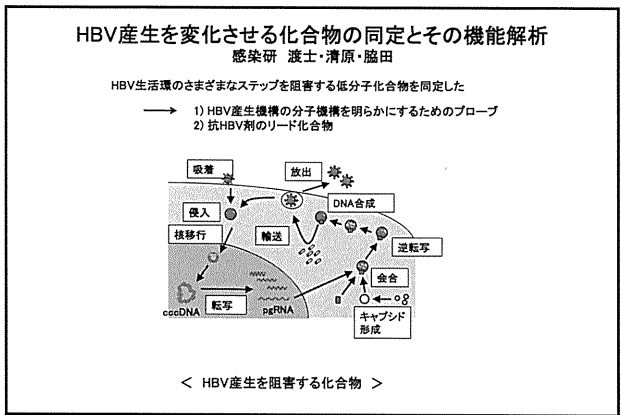
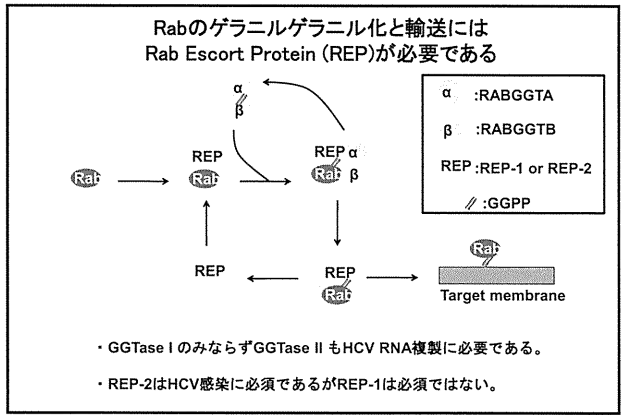
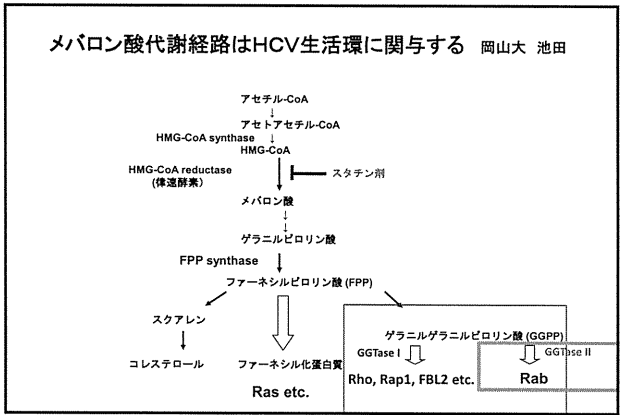
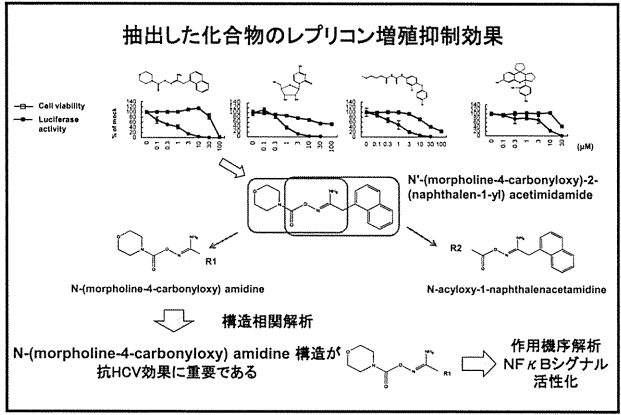
化合物2はGanciclovir抵抗性HSV-2にも効果を示す

新規抗HCV薬スクリーニング (東京医科歯科大学・坂本重臣先生との共同研究)

HCV感染細胞の免疫染色

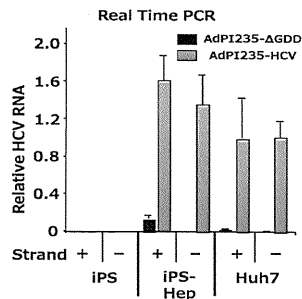
ハイコンテツ細胞イメージ解析装置による多体積分析

感染細胞数のパーセンテージを自動算出



ヒトiPS細胞由来肝細胞における受容体発現とHCV複製 阪大 八木

RT-PCRによる解析		
	CD81 OCLN	SR-BI CLDN
ヒトiPS細胞	+	-
ヒトiPS細胞由来肝細胞	+	+



iPS由来分化誘導肝細胞でHCV感染受容体が発現しており感染が確認され、またHCV複製も検出された

肝炎ウイルス感染複製増殖過程の解明と新規治療法開発に関する研究



- 平成22～23年度の主な研究成果
- ①遺伝子型3aのHCVレプリコン細胞を開発した。②プロスタグランジン受容体アゴニストがHCVの感染性を抑制
  - ③中空糸ならびにスフェロイドによる培養系を比較検討し、HBV感染を確認した。
  - ④インターフェロン効果を増強する化合物スクリーニングにより3種の化合物とその誘導体を同定
  - ⑤抗HBV活性をもつグリフィシシン（高マンノース型糖鎖特異結合タンパク質）がHCVエントリーを特異的に阻害した。
  - ⑥抗HBV活性を有する化合物を同定し、その作用起点を解析した。
  - ⑦HCVレセプターTgマウスを樹立したが、感染は成立せず、その機構を解析した
  - ⑧ヒトiPS細胞から肝細胞の作製に成功し、受容体因子発現、HCVpv感染、レプリコンの複製を確認した。