

質を測定したところ、トランスフェクション後 30–40 日でコア蛋白質濃度が最高値 (10 万~40 万 fmol/L) になった。その後コア蛋白質濃度はやや低下傾向を示すものの、約 10 万 fmol/L 程度のコア蛋白質濃度を維持した。Huh7 細胞に比べると Huh7.5.1 細胞ではコア蛋白質濃度は低い傾向を示した。FCS よりも HS を用いた方がコア蛋白質濃度は高い傾向を示した。ヒト AB 血清とプール血清では差を認めなかった。

D. 考察

今年度は HCV の培養条件の検討をおこなった。これまで HCV ゲノムを挿入した細胞を経代培養することによりウイルス産生を観察していたが、ゲノム導入細胞の培地中の血清を低濃度 (2%) にし、細胞を経代せず培地のみを交換した。この培養条件によりこれまでよりも高濃度のウイルス蛋白質が培地中に放出されることを観察した。また、ウシ胎児血清よりもヒト血清の方が高いコア蛋白質濃度を示したが、ウシ胎児血清の方が細胞増殖には有利になる場合が多いため、HCV 産生に関しては逆にヒト血清の方が有利であった可能性がある。この培養条件下では細胞は増殖を停止して、分化した状態にあると考えられる。本来の肝細胞により近い状態にあることがウイルス産生に有利な条件となっている可能性がある。今後は培地中に産生されたウイルスの感染性や性質を詳細に解析する必要がある。また、細胞中のウイルスの複製のレベルに関しても解析する必要がある。

E. 結論

HCV の培養条件を検討した結果、低濃度のヒト血清を用いることにより、培地中のコア蛋白質濃度が高くなることを見いだした。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K, Kohara M. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. PLoS One. 2012;7(12):e51656.
- 2) Murakami Y, Fukasawa M, Kaneko Y, Suzuki T, Wakita T, Fukazawa H. Selective estrogen receptor modulators inhibit hepatitis C virus infection at multiple steps of the virus life cycle. Microbes Infect. 2013 15(1):45-55.
- 3) Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, Wakita T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. Gastroenterology. 2013 144(1):56-58.e7.
- 4) Date T, Kato T, Kato J, Takahashi H, Morikawa K, Akazawa D, Murayama A, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Novel cell culture-

- adapted genotype 2a hepatitis C virus infectious clone. J Virol. 2012 86(19):10805-20.
- 5) Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. Virology. 2012 432(1):29-38.
- 6) Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. PLoS Pathog. 2012;8(3):e1002561.
- 7) Date T, Morikawa K, Tanaka Y, Tanaka-Kaneko K, Sata T, Mizokami M, Wakita T. Replication and infectivity of a novel genotype 1b hepatitis C virus clone. Microbiol Immunol. 2012 56(5):308-17.
2. 学会発表
なし
- H. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

C型肝炎ウイルス genotype 別のインターフェロン応答に関する研究

研究分担者

茶山 一彰 広島大学大学院 消化器・代謝内科学 教授

研究要旨：アジア地域に蔓延する様々な C型肝炎ウイルス（HCV） genotype 間のインターフェロン（IFN）反応性の違いを検討した。ヒト肝細胞キメラマウスに genotype 1 型，2a 型，2b 型，5 型および 6 型の C型肝炎患者血清を経静脈的に投与し，マウス血中 HCV RNA 量を測定した。HCV 感染の確認後，IFN- α ，PegIFN- α または PegIFN- λ を 2~4 週間，筋肉注射した。Genotype 5 型は他の genotype に比べ，マウスへの感染率が低く，今後は血清採取時期や保存法の検討が必要と思われた。Genotype 2a および 2b 型は 1 型に比べ IFN 投与後の血中ウイルス低下量が多く，IFN 反応性が高いことが示された。Genotype 6 型は 1 型に比べ PegIFN- α および PegIFN- λ 投与後の血中ウイルス低下量が多く，IFN 反応性が高い可能性が示された。

A. 研究目的

C型慢性肝炎患者に対するインターフェロン（IFN）治療の効果はウイルスの genotypeにより異なる。この異なる治療効果の差異のメカニズムは明らかではない。本研究ではアジア地域に蔓延する様々な C型肝炎ウイルス（HCV） genotype間のインターフェロン反応性の違いを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ヒト肝細胞キメラマウスに genotype 1b 型，2a 型，2b 型，5 型および 6 型の C型肝炎患者血清を経静脈的に投与し感染させた。血清投与後，2 週おきにマウス血中 HCV RNA を real-time PCR にて測定した。

血中 HCV RNA が安定する 6-8 週から，1000 IU/g の IFN- α を連日，10 μ g/kg の PegIFN- α または 30 μ g/kg の PegIFN- λ を週 2 回，2~4 週間，筋肉注射した。

（倫理面への配慮）投与する血清は患者の同意が得られてものを使用した。マウス実験は，動物実験に関する倫理指針に沿って行った。

C. 研究結果

HCV患者血清投与後，マウス血中HCV RNAは，genotype 1b型で15/15頭（100%），genotype 2a型で6/9頭（67%），genotype 2b型で6/6頭（100%），genotype 5型で1/18頭（6%），genotype 6型では2/3頭（67%）で陽性化となり，感染率は，genotype間で

異なっていた。今後は血清採取時期，採取後の本保存方法などの条件を加えての検討が必要と思われた。HCVが感染したマウス血中HCV NRAは，genotype 1b型，2a型，2b型，5型および6型でそれぞれ 7.9 ± 1.1 ， 7.4 ± 0.5 ， 6.4 ± 0.6 ， 6.5 ， 7.4 ± 0.1 log copy/mLに上昇した。10 μ g/kgのPegIFN- α の週2回，2週間投与により，マウス血中HCV RNAは，genotype 1b型 (n=3)，2a型 (n=3)，2b型 (n=3) でそれぞれ0.53，1.9，1.4 log copy低下し，genotype 2a型 (P<0.05) および2b型は1型に比べIFN反応性が高かった。1000 IU/gのIFN- α の連日，4週間投与によるマウス血中HCV RNAの低下量は，genotype 1b型感染マウス (n=12) では，1週，2週，3週および4週にてそれぞれ 0.6 ± 0.7 ， 1.0 ± 0.6 ， 1.5 ± 0.6 および 1.6 ± 0.9 log copyであったが，genotype 6型HCV感染マウス (n=1) では，1週，2週および3週にてそれぞれ1.1，1.9，1.9 log copyであり，1型に比べより多く低下した。30 μ g/kgのPegIFN- λ を週2回，2週間投与によるマウス血中HCV RNAの低下量は，genotype 1b型感染マウス (n=3) では1週および2週後にてそれぞれ2.0および2.2 log copy/mLであったが，genotype 6型感染マウス (n=1) では，1週および2週後にてそれぞれ2.4および3.5と1型に比べより多く低下し，3週後には測定感度(3 log copy/mL) 以下に低下した。

D. 考察

ヒト肝細胞キメラマウスを用いた検討によって，genotype 2a および 2b 型 HCV は 1 型 HCV に比べ IFN の反応性が高いことが

示された。また genotype 6 型 HCV は 1 型 HCV に比べ IFN 反応性が高い可能性が示された。

E. 結論

ヒト肝細胞キメラマウスを用いて HCV genotype 間の IFN 反応性の違いの検討が可能であった。今後，genotype 間においてどのような理由にて IFN 感受性が異なっているのか検討が必要である。

F. 健康危険情報

異常なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanimoto Y, Tashiro H, Aikata H, Amano H, Oshita A, Kobayashi T, Kuroda S, Tazawa H, Takahashi S, Itamoto T, Chayama K and Ohdan H. Impact of pegylated interferon therapy on outcomes of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma after curative hepatic resection. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19: 418-425.
- 2) Suzuki Y, Ikeda K, Suzuki F, Toyota J, Karino Y, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Hu W, Eley T, McPhee F, Hughes E and Kumada H. Dual Oral Therapy with Daclatasvir and Asunaprevir for Patients with HCV Genotype 1b Infection and Limited Treatment Options. *J Hepatol*. 2012; In press.
- 3) Sainz B, Jr., Barretto N, Martin DN, Hiraga N, Imamura M, Hussain S, Marsh KA, Yu X, Chayama K, Alrefai WA and Uprichard SL. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1

- cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. *Nat Med.* 2012; 18: 281-285.
- 4) Ohnishi M, Tsuge M, Kohno T, Zhang Y, Abe H, Hyogo H, Kimura Y, Miki D, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ochi H, Hayes CN, Tanaka S, Arihiro K and Chayama K. IL28B polymorphism is associated with fatty change in the liver of chronic hepatitis C patients. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 834-844.
 - 5) Ochi H, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Uchiyama T, Kamatani N, Nakamura Y and Chayama K. Toward the establishment of a prediction system for the personalized treatment of chronic hepatitis C. *J Infect Dis.* 2012; 205: 204-210.
 - 6) Nagaoki Y, Aikata H, Kobayashi T, Fukuhara T, Masaki K, Tanaka M, Naeshiro N, Nakahara T, Honda Y, Miyaki D, Kawaoka T, Takaki S, Tsuge M, Hiramatsu A, Imamura M, Hyogo H, Kawakami Y, Takahashi S, Ochi H and Chayama K. Risk factors for the exacerbation of esophageal varices or portosystemic encephalopathy after sustained virological response with IFN therapy for HCV-related compensated cirrhosis. *J Gastroenterol.* 2012; In press.
 - 7) Murakami E, Aikata H, Miyaki D, Nagaoki Y, Katamura Y, Kawaoka T, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Takahashi S, Kimura T, Kenjo M, Nagata Y, Ishikawa M, Kakizawa H, Awai K and Chayama K. Hepatic arterial infusion chemotherapy using 5-fluorouracil and systemic interferon-alpha for advanced hepatocellular carcinoma in combination with or without three-dimensional conformal radiotherapy to venous tumor thrombosis in hepatic vein or inferior vena cava. *Hepatol Res.* 2012; 42: 442-453.
 - 8) Miki D, Ohishi W, Ochi H, Hayes CN, Abe H, Tsuge M, Imamura M, Kamatani N, Nakamura Y and Chayama K. Serum PAI-1 is a novel predictor for response to pegylated interferon-alpha-2b plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2012; 19: e126-133.
 - 9) Matsuo J, Mizui M, Okita H, Katayama K, Aimitsu S, Sakata T, Obayashi M, Nakanishi T, Chayama K, Miyakawa Y, Yoshizawa H, Tanaka J and for the Hiroshima Hepatitis Study G. Follow up of the 987 blood donors found with hepatitis C virus infection over 9-18 years. *Hepatol Res.* 2012; 42: 637-647.
 - 10) Kumada H, Toyota J, Okanoue T, Chayama K, Tsubouchi H and Hayashi N. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for treatment-naive patients chronically infected with HCV of genotype 1 in Japan. *J Hepatol.* 2012; 56: 78-84.
 - 11) Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kawamura Y, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Miyakawa Y and Kumada H. Association of two polymorphisms of the IL28B gene with viral factors and treatment response in 1,518 patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 596-605.
 - 12) Kawaoka T, Takahashi S, Takaki S,

- Hiramatsu A, Waki K, Hiraga N, Miki D, Tsuge M, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Onoe T, Tashiro H, Ohdan H and Chayama K. Interleukin-28B single nucleotide polymorphism of donors and recipients can predict viral response to pegylated interferon/ribavirin therapy in patients with recurrent hepatitis C after living donor liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012; 27: 1467-1472.
- 13) Karino Y, Toyota J, Ikeda K, Suzuki F, Chayama K, Kawakami Y, Ishikawa H, Watanabe H, Hernandez D, Yu F, McPhee F and Kumada H. Characterization of virologic escape in hepatitis C virus genotype 1b patients treated with the direct-acting antivirals daclatasvir and asunaprevir. *J Hepatol*. 2012;In press.
- 14) Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K, Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Moriwaki H, Adachi H, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsuhashi H, Oketani M and Kumada H. Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFNalpha-2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multicenter cooperative study. *J Gastroenterol*. 2012;In press.
- 15) Hayes CN, Imamura M, Aikata H and Chayama K. Genetics of IL28B and HCV--response to infection and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; 9: 406-417.
- 16) Hayashi N, Okanoue T, Tsubouchi H, Toyota J, Chayama K and Kumada H. Efficacy and safety of telaprevir, a new protease inhibitor, for difficult-to-treat patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 2012; 19: e134-142.
- 17) Chayama K, Takahashi S, Toyota J, Karino Y, Ikeda K, Ishikawa H, Watanabe H, McPhee F, Hughes E and Kumada H. Dual therapy with the nonstructural protein 5A inhibitor, daclatasvir, and the nonstructural protein 3 protease inhibitor, asunaprevir, in hepatitis C virus genotype 1b-infected null responders. *Hepatology*. 2012; 55: 742-748.
- 18) Chayama K, Hayes CN, Ohishi W and Kawakami Y. Treatment of chronic hepatitis C virus infection in Japan: update on therapy and guidelines. *J Gastroenterol*. 2012;In press.
- 19) Chayama K, Hayes CN and Imamura M. Impact of interleukin-28B genotype on in vitro and in vivo systems of hepatitis C virus replication. *Hepatol Res*. 2012; 42: 841-853.
- 20) Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y and Kumada H. Amino acid substitution in HCV core/NS5A region and genetic variation near IL28B gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy. *Intervirology*. 2012; 55: 231-241.
- 21) Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K and Koike K. Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human

- immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis. *J Infect Chemother.* 2012;In press.
- 22) Okazaki A, Hiraga N, Imamura M, Hayes CN, Tsuge M, Takahashi S, Aikata H, Abe H, Miki D, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Ohdan H and Chayama K. Severe necroinflammatory reaction caused by natural killer cell-mediated Fas/Fas ligand interaction and dendritic cells in human hepatocyte chimeric mouse. *Hepatology.* 2012; 56: 555-566.
- 23) Ohishi W and Chayama K. Treatment of chronic hepatitis B with nucleos(t)ide analogues. *Hepatol Res.* 2012; 42: 219-225.
- 24) Nagaoki Y, Hyogo H, Aikata H, Tanaka M, Naeshiro N, Nakahara T, Honda Y, Miyaki D, Kawaoka T, Takaki S, Hiramatsu A, Waki K, Imamura M, Kawakami Y, Takahashi S and Chayama K. Recent trend of clinical features in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2012; 42: 368-375.
- 25) Miki D, Ochi H, Hayes CN, Aikata H and Chayama K. Hepatocellular carcinoma: towards personalized medicine. *Cancer Sci.* 2012; 103: 846-850.
- 26) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, Tanaka Y, Shinkai N, Hige S, Yatsuhashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y and Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after discontinuation of nucleos(t)ide analogs in patients with chronic hepatitis B. *Hepatol Res.* 2012; 42: 139-149.
- 27) Hayes CN, Akamatsu S, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Abe H, Ochi H, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Ohishi W and Chayama K. Hepatitis B Virus-Specific miRNAs and Argonaute2 Play a Role in the Viral Life Cycle. *PLoS One.* 2012; 7: e47490.
- 28) Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hosono N, Kubo M, Miya F, Arai Y, Takahashi H, Shirakihara T, Nagasaki M, Shibuya T, Nakano K, Watanabe-Makino K, Tanaka H, Nakamura H, Kusuda J, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Ueno M, Shigekawa Y, Kawakami Y, Arihiro K, Ohdan H, Gotoh K, Ishikawa O, Ariizumi S, Yamamoto M, Yamada T, Chayama K, Kosuge T, Yamaue H, Kamatani N, Miyano S, Nakagama H, Nakamura Y, Tsunoda T, Shibata T and Nakagawa H. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat Genet.* 2012; 44: 760-764.
2. 学会発表
- 1) 茶山一彰 C型肝炎抗ウイルス療法の現状と成績 日本肝移植研究会 シンポジウム6 福岡 2012/6/22
- 2) 茶山一彰 C型肝炎に関する研究手法の進歩と臨床応用 第77回 日本インターフェロン・サイトカイン学会 神戸 2012/6/14

学術講演会 広島 2012/1/19

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

B,C,E 型肝炎の疫学，免疫学，アジアとの共同研究に関する研究

研究分担者

アクバル シェイク MF 東芝病院研究部 主任研究員

研究要旨：

肝炎とその合併症の原因及び発症機序の解明、予防法、診断法そして治療法の確立を目的とした基礎研究と臨床研究はこの半世紀の間、全世界で精力的に行われてきた。これらの多大な研究成果により先進国では効果的な予防法と治療法が確立されている。一方、アジアの発展途上国では適切な予防策がいまだに確立されておらず、公衆衛生システムが未発達なため肝炎の有病率すら把握されていない。現在推奨されている肝炎予防策は、先進国における研究結果から発展してきたものであり、予防目的のための健康保険もないアジアの発展途上国では、そういった予防策をそのまま適用することは困難である。従って、本研究プロジェクトでは、発展途上国の実情に即した肝炎の予防と治療のガイドラインの策定を目的に、基礎研究と臨床研究の両面を実施することとした。肝炎の基礎研究は、最先端の研究施設、技術、知識を有する日本で行い、臨床研究は肝炎罹病率の高いバングラデシュの共同研究者によって実施し、その臨床研究と基礎研究の結果を取り纏めることで、発展途上国の社会的実情に即した肝炎と合併症の予防と治療のための新ガイドラインの策定を最終目標とした。

社会・経済・医療制度面において他の発展途上国も、バングラデシュと多くの点で類似した状況にあるため、本研究で策定予定の新ガイドラインは多くの発展途上国においても適用可能であると期待できる。

A. 研究目的

先進国における基礎研究と発展途上国における臨床研究を基にした、発展途上国の実情に即した肝炎感染拡大の予防と治療のための新ガイドライン策定

B. 研究方法

1. バングラデシュ国内の E 型肝炎ウイル

ス (HEV) 分子疫学研究のため、本国を起源とする HEV 全ゲノム配列と遺伝子解析の実施、および近隣諸国の実態とその類似性及び相違性に関する究明

2. 慢性 HBV キャリアの動物モデル (HBV TM) において HBcAg の免疫調整の効果アジュバントの役割。

3. HBV TM 中の免疫反応を抑制する骨髄細

胞の役割と慢性B型肝炎患者の治療作用面からみたミエロイド由来サプレッサー細胞（MDSC）の役割についての分析。

4. バングラデシュ国内の慢性B型肝炎患者に対し HBsAg/HBcAg ワクチンを用いた第三相臨床治験の実施と免疫調節性作用についての解析。

（倫理面の配慮）

研究対象者に対する人権擁護上の配慮、不利益・危険性の排除や説明と同意（インフォームド・コンセント）への対応状況及び実験動物に対する動物愛護上の配慮等を記入すること。バングラデシュにおける全ての臨床研究について、現地共同研究機関の責任者を通じ、当該施設に於ける倫理委員会の承認を受ける。また、被験者からはICを取得する。

C. 研究結果

1. バングラデシュ国民の HEV ジェノタイプがほとんど知られていないため、バングラデシュ国内で発生した急性E型肝炎の突発的流行に関する200例から血清検体の収集を行った。その結果、バングラデシュで採取したHEVは全てジェノタイプIであった。本HEV遺伝子型を明らかにし、ひいてはインド地域のHEV疫学の全体像を評価するために、近隣諸国の型との比較検討を行っている。
2. HBV発症に見られるHBVに関連した様々な抗原の役割は完全に解明されていない。また、治療中のその役割も、

大部分が明らかになっていない。HBcAgの投与によりHBV TM中にHBcAgに特異的な免疫だけではなく、HBsAg特異的な細胞性と液性免疫を誘発する結果となった。このメカニズムを解明したことで、HBcAgの投与によって肝内にHBsAg特異的CTLが誘発されたから、HBcAgによって抗ウイルス性免疫調整作用を持つ可能性があることが判明した。

3. 慢性HBV感染被験者群に免疫治療の効果は満足なものではない。骨髓細胞系列の細胞はこの面で一定の影響があるものと仮定したところ、HBV TMの脾臓と肝臓中、健常なマウスのもものと比較してCD11bとGr1を示すMDSCが過剰であることが明らかになった。また、MDSCの用量が多いので、HBV TM中のHBsAg特異免疫を抑制した。MDSCの排除が免疫療法において治療的効果をあげることが指摘できる。
4. バングラデシュにおけるCHBに関する3年間にわたる免疫学的研究、及び発症と治療についての調査から、バングラデシュの社会的・経済的状況と先進国で採用されてきた抗ウイルス剤（NA）を用いた治療法が相いれないことは明白である。こうしたことから、新たな科学的証拠に基づいた治療法、すなわち免疫療法がバングラデシュで開始された。第一相・第二相臨床治験は安全であり、ワクチンを用いた免疫療法の高い治療効果を確認した。この1年間、第三相臨床治験が二つの治療群のもとに着手されている。一つはHBsAg/HBcAg混合ワクチンを接種した群、もう一つ

は対照群としてペグインターフェロンを投与した群を設定している。投与は終了し、現段階ではワクチン治療の効果が明らかになることを観察している。

D. 考察

急性肝炎および慢性肝炎のほとんどのケースが世界の発展途上国に存在している。一方で、これらのウイルスに関する基礎研究の多くは先進国や富裕国で行われてきた。また、さまざまな抗ウイルス薬剤を用いた多くの無作為比較試験も先進国で実施されてきた。当然のことながら、HBV のための予防対策や推奨される治療法は先進国から確立されてきた。これらのアプローチの科学的利点は先進国でも発展途上国でも高く認識されている。しかしながら発展途上国ではこれらの科学的利点や推奨される治療法の恩恵を受けられてはいない。そのため発展途上国においては、急性肝炎は散発性、流行性の両型で蔓延している。これにともない急性肝炎は一定の死亡率を保ち、かなりの経済的社会的インパクトを発展途上国に与え続けている。また、発展途上国の急性肝炎感染の一部は先進国にも広がりを見せ、慢性肝炎に関しても、見逃せない深刻な事態として拡大している。HBV のための有用な予防ワクチンが運用可能な状態にあるにもかかわらず、毎年約数千万の新たなHBV に感染した患者が出現しており、無差別的な抗ウイルス剤 (NA) の使用や不適切な診断により HBV の新患者数は発展途上国で増加の一途にある。一方、先進国においても、無差別的な抗ウイルス剤 (NA) の使用や不適切な診断により HBV mutant の患者が

増加している。

そこで本研究ではこれら全ての因子を考慮し、先進国、発展途上国の双方の肝炎について相互に信頼しうる、かつ相互に継続可能な調査を考案した。十分な設備の整った研究所が必要となる基礎研究は先進国、日本で行われるべきであると考えた。それに対し非投薬患者を必要とする臨床試験は発展途上国でなされるべきである。このアプローチにより発展途上国の肝炎に関する重要な情報が新たに明らかとなった。それは発展途上国の社会的経済的状況を考慮した推奨されるべき肝炎予防プログラムのための新たな提案が必要であるということだ。HBV 発症に見られるように発展途上国特有の実態が発見されるようになったのである。

これらの状況に対処するため、新規治療法によるアプローチがバングラデシュ現地肝炎専門家の手動によって実施されている。第一相・第二相臨床試験は治療休止期間の48週の間フォローアップを行った。現在、第三相試験がバングラデシュで終了した。並行して人体実験の正当性を立証するため、日本国内でHBV TMに対する基礎実験を実施している。

これらの共同研究と臨床試験によるデータに基づき、今後アジア発展途上国に対して肝炎予防プログラムのための科学的に実証された新ガイドラインを提供することができる。と考える。

E. 結論

本研究プロジェクトでは、肝炎ウイルスの予防、新規治療法の開発に発展途上国と先進国が相互支援的な役割を果たすであろ

う。HEV 疫学について正しい理解をもつことは、発展途上国における HEV 感染予防と先進国からの旅行者に見られる HEV 感染者削減への糸口を見出すことにつながる。HBV 感染の発症と疫学的研究は AASLD や EASL によって供給された推奨療法の修正が今後必要となるかもしれないことを示した。

現在進行している免疫療法臨床試験は社会に適合した治療戦略と新治療ガイドラインを発展途上国にもたらし、新規治療法の長所は先進国でも応用されうるであろう。最終的には、先進国と発展途上国間での包括的研究活動が共有されることで、肝炎ウイルスのための科学的根拠に基づく予防と治療のガイドラインが確立されるであろう。

F. 健康被害情報 通報せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Strong and multi-antigen specific immunity by hepatitis B core antigen (HBcAg)-based vaccines in a murine model of chronic hepatitis B: HBcAg is a candidate for a therapeutic vaccine against hepatitis B virus. *Antiviral Res.* 2012; 96(1):59-64.
- 2) Akbar SM, Hiasa Y, Al-Mahtab M, Onji M. Dendritic cell-based immune therapy in liver diseases. *Current Immunology Review* 2012; 8(1): 28-36
- 3) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Abe M, Yoshida O, Iheda Y, Hiasa Y, Onji M. Suppression of inflammatory mucosal milieu by ad-

ministration of regulatory dendritic cells in an animal model of primary biliary cirrhosis. *Euroasian J Hepato-Gastroenterology* 2012 ;2: 30-34

- 4) Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S, Kamal M, Khan MSI. Biochemical, virological, immunological and histopathological features of 702 incidentally detected chronic hepatitis B virus carriers in Bangladesh. *Digestion* 2012; 86 (1): 1-5
- 5) Hoshino H, Hino K, Miyakawa H, Takahashi K, Akbar SM, Mishiro S. Inter-genotypic recombinant hepatitis C virus strains in Japan noticed by discrepancies between immunoassay and sequencing. *J Med Virol* 84: 1018-1024
- 6) Khan MSI, Akbar SM, Hossain ST, Mahtab M, Hossain MM, Idris Z. Possible route of transmission of highly pathogenic avian influenza virus type H5N1 in family poultry at rural Bangladesh. *Pakistan Veterinary Journal* 2012; 31 (1): 112-116
- 7) Miyashita K, Kang J-H, Saga A, Takahashi K, Shimamura T, Yasumoto A, Fukushima H, Sogabe S, Konishi K, Uchida K, Fujinaga A, Matsui T, Sakura Y, Tsuji T, Maguchi H, Taniguchi M, Abe N, Akbar SM, Arai M, Mishiro S. Three Cases of Acute or Fulminant Hepatitis E Caused by Ingestion of Pork Meat and Entrails in Hokkaido, Japan; Zoonotic Food-Borne Transmission of Hepatitis E Virus and Public Health Concerns. *Hepatol Res.* 2012; 42(9):870-878.
- 8) Onji H, Koizumi Y, Hanayama M, Akbar SM, Hirooka M, Tokumoto Y, Abe M, Hiasa

Y, Aoto M, Mitsuda N, Onji M. A Case of de novo Hepatitis B Complicated due to Lack of Comprehensive Interventional Approach. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology* 2012; 2(2):122-125

9) Hossain MF, Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S. Serum aspartate transaminase platelet ratio index (APRI) in patients with non-alcoholic fatty liver disease in Bangladesh. *KMUJ* 2012; 4(2):48-52

2. 学会発表

1) Akbar SM, Chen S, Abe M, Hiasa Y, Onji M. Myeloid-derived suppressor cells; a critical regulator of intrahepatic immunity in chronic HBV infection. 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. Taipei, Taiwan, 16th-19th February 2012

2) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Hiasa Y, Onji M. Mechanism underlying insignificant therapeutic effects of combination of antiviral and vaccine therapy in patients with chronic hepatitis B: need of maintenance of hepatitis B core antigen-specific immune responses. 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Taipei, Taiwan, 16th-19th February 2012

3) Al-Mahtab M, Akbar SM, Rahman S. Response to combination therapy with shorter duration 'half dose pegylated interferon and entecavir' in chronic hepatitis B in Bangladesh. 47th Annual meeting of the European Association for the Study of the Liver, Barcelona, Spain, 18th-22nd April 2012

4) Akbar SM and Al-Mahtab. Bridging clinical outcome with immunological events for pre-

clinical and clinical trial. 6th Annual World Vaccine Congress Asia 2012, Singapore, 11th-14th June 2012

5) Akbar SM, Al-Mahtab M, Aguilar J, Onji M, Mishiro S. Activation of Dendritic Cells and Induction of Antigen-Specific Immunocytes by a Therapeutic Vaccine Containing Both HBsAg and HBcAg Administered Through Nasal Route in Chronic Hepatitis B; A Patient-Friendly and Evidence-Based Therapeutic Approach. 14th International Symposium on Viral Hepatitis and liver Disease (ISVHLD), Shanghai, China, 22nd-25th June 2012

6) Akbar SM, Chen S, Al-Mahtab M, Hiasa Y, Onji M. HBsAg-specific immune responses by HBcAg-pulsed dendritic cells: Role of antigen and adjuvant in therapeutic vaccine against chronic hepatitis B. 14th International Symposium on Viral Hepatitis and liver Disease (ISVHLD), Shanghai, China, 22nd-25th June 2012

7) Akbar SM. Designing and Engineering Immune Therapy Against Chronic HBV infection. 9th Turkish Hepato Gastroenterology Congress, Cyprus, Turkey, 26th - 30th September 2012

8) Akbar SM. Immune pathogenesis of HBV-related liver damages. APASL 3rd Single Topic Conference on HBV. Dhaka, Bangladesh, 6th -7th October 2012

9) Akbar SM. Immune responses and immune therapy in HCC. 6th Annual Meeting of Pakistan Society for the Study of Liver Diseases. Karachi, Pakistan, 14th -16th December 2012

10) Akbar SM. Treatment: What is new in pipeline-Therapeutic vaccine for hepatitis B. 6th Annual Meeting of Pakistan Society for the

Study of Liver Diseases. Karachi, Pakistan,
14th -16th December 2012

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

包括的遺伝子発現評価を用いた B, C 型ウイルス肝炎の研究

研究分担者

金子 周一 金沢大学 教授

研究要旨：アジアにおいて多数の患者数が認められる肝炎ウイルス関連疾患における発現遺伝子解析を行い、その特徴を明らかにした。肝細胞がんは多様な遺伝子発現を示すが、EpCAM、CD90 および AFP と幹細胞性との関連が示された。その発現様式によって血管侵襲あるいは転移、さらには予後が規定されていた。この分子と MRI による肝細胞がんの画像所見との関連が示された。また、肝硬変症においては栄養に係わる遺伝子発現の違いがインターフェロン治療の反応性を規定していることも示された。

A. 研究目的

アジアにおいて多数の患者数が認められる B 型慢性肝炎、C 型慢性肝炎、関連肝細胞がんにおける発現遺伝子を包括的に解析し、慢性肝炎および肝細胞がんの病態と発現遺伝子との関連を明らかにする。インターフェロン治療の効果と関連するインターフェロン誘導遺伝子をはじめとする宿主因子と、治療効果との関連が明らかになっている SNP IL-28B などとの関係を明らかにする。こうした発現遺伝子の変動は肝細胞がんにおいても認められるが、肝細胞がんでは予後と関連して発現遺伝子プロファイルが大きく異なっている。特に、予後の悪い肝細胞がんでは特徴的な遺伝子の発現が認められ、がん幹細胞との関連も示唆されているため、この遺伝子の変動を明らかにする。

B. 研究方法

B および C 型の慢性肝炎、肝硬変および関連する肝細胞がんを対象とする。培養細胞、実験動物系、ヒト臨床材料より核酸を抽出し real time PCR, DNA chip を始めとする解析を行う。臨床情報と合わせ包括的に各種の情報を解析し、遺伝子の変化、ネットワークの変化と、病態との関連を解析する。

肝細胞がんを対象に MRI を実施し、その臨床的背景および遺伝子発現を検討した。（倫理面の配慮）

関連する各種の倫理指針を遵守して実施した。研究は該当する委員会の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

EpCAM、CD90 および AFP は肝がん幹細胞のマーカーであった。これらの遺伝子

発現と臨床所見を比較すると EpCAM と AFP 両者陽性の肝がんは血管侵襲が多く生命予後が有意に悪く、一方、CD90 陽性の肝がんは肺転移を有意におこしやすいことが明らかとなった(Hepatology 2012)。肝がん由来の培養細胞株においても両者は鑑別され、薬剤応答性とも関連を認めた。さらに、肝がんの MRI 所見と EpCAM 陽性幹細胞の関連が示唆された。

C 型肝炎ウイルス陽性の肝硬変症においてインターフェロン治療の効果が悪いことは良く知られていたが、その分子機序が明らかで無かった。そのひとつの機序として低栄養による mTOR、FoxO シグナルの伝達系の障害が示された。

D. 考察

AFP、EpCAM、CD90 の分子マーカーを用いてがんの特徴を明らかにし、肝がんの有効な治療法の選択を行うことが可能になると思われた。また、EOB-MRI における画像所見と EpCAM との関連を明らかにして画像所見の分子機序を示すとともに臨床的意義を明らかにする必要があることが明らかとなった。

肝硬変症を有する症例の治療においては栄養状態を改善して実施することが重要と思われた。

E. 結論

肝細胞がんの遺伝子発現解析による幹細胞性の分類が臨床的に重要と思われた。また、C 型慢性肝炎に対する栄養状態の改善が治療効果に重要であることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T Yamashita, M Honda, Y Nakamoto, M Baba, K Nio, Y Hara, SS Zeng, TH Kondo, H Takatori, T Yamashita, E Mizukoshi, H Ikeda, Y Zen, H Takamura, XW Wang, S Kaneko. Discrete nature of EpCAM(+) and CD90(+) cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. Hepatology (in press)
- 2) E Mizukoshi, T Yamashita, K Arai, H Sunagozaka, T Ueda, F Arihara, T Kagaya, T Yamashita, K Fushimi, S Kaneko. Enhancement of tumor-associated antigen-specific T cell responses by radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. Hepatology (in press)
- 3) A Kitao, O Matsui, N Yoneda, K Kozaka, S Kobayashi, W Koda, T Gabata, T Yamashita, S Kaneko, Y Nakanuma, R Kita, S Arii. Hypervascular Hepatocellular Carcinoma: Correlation between Biologic Features and Signal Intensity on Gadoteric Acid-enhanced MR Images. Radiology 2012;265(3):780-9.
- 4) E Mizukoshi, K Fushimi, K Arai, T Yamashita, M Honda, S Kaneko. Expression of chondroitin-glucuronate C5-epimerase and cellular immune responses in patients with hepatocellular carcinoma. Liver Int 2012;32(10):1516-26.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

特記すべきことなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, <u>Koike K</u> , Hirota K, Fukumoto M, Fujita J.	Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1.	Biochem Biophys Res Commun			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 23376718
Hikita H, Enooku K, Satoh Y, Yoshida H, Nakagawa H, Masuzaki R, Tateishi R, Soroida Y, Sato M, Suzuki A, Gotoh H, Iwai T, Yokota H, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H.	Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor for sustained responses to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1	Hepatol Res			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 23356977
Urabe Y, Ochi H, Kato N, Kumar V, Takahashi A, Muroyama R, Hosono N, Otsuka M, Tateishi R, Lo PH, Tanikawa C, Omata M, <u>Koike K</u> , Miki D, Abe H, Kamatani N, Toyota J, Kumada H, Kubo M, Chayama K, Nakamura Y, Matsuda K	A genome-wide association study of HCV induced liver cirrhosis in the Japanese population identifies novel susceptibility loci at MHC region	J Hepatol			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 23321320

Gotoh H, Enooku K, Soroida Y, Sato M, Hikita H, Suzuki A, Iwai T, Yokota H, Yamazaki T, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H	Perihepatic lymph node enlargement observed at a general health examination: A cross-sectional study	Hepatol Res			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 23279215
Ikeda K, Izumi N, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, <u>Koike K</u> , Hayashi N, Kumada H	Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis	Hepatol Res			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 23131000
Ohki T, Isogawa A, Iwamoto M, Ohsugi M, Yoshida H, Toda N, Tagawa K, Omata M, <u>Koike K</u>	The effectiveness of liraglutide in nonalcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus compared to sitagliptin and pioglitazone	ScientificWorldJournal			[Epub ahead of print] PubMed PMID:22927782
Kurano M, Hara M, Tsuneyama K, Okamoto K, Iso-O N, Matsushima T, <u>Koike K</u> , Tsukamoto K	Modulation of lipid metabolism with the over-expression of NPC1L1 in mice liver	J Lipid Res			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 22891292
Takata A, Otsuka M, Yoshikawa T, Kishikawa T, Hikiba Y, Obi S, Goto T, Kang YJ, Maeda S, Yoshida H, Omata M, Asahara H, <u>Koike K</u>	MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF-κB activity via directly targeting Dnmt1 expression	Hepatology	57	162-170	2013
Hikita H, Nakagawa H, Tateishi R, Masuzaki R, Enooku K, Yoshida H, Omata M, Soroida Y, Sato M, Gotoh H, Suzuki A,	Perihepatic lymph node enlargement is a negative predictor of liver cancer development in chronic hepatitis C patients	J Gastroenterol			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790352

Iwai T, Yokota H, <u>Koike K</u> , Yatomi Y, Ikeda H					
Minami T, Kishikawa T, Sato M, Tateishi R, Yoshida H, <u>Koike K</u>	Meta-analysis: mortality and serious adverse events of peginterferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C	J Gastroenterol			[Epub ahead of print] PubMed PMID: 22790350
Okushin K, Asaoka Y, Fukuda I, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Mikami S, Uchino K, Enooku K, Kondo Y, Tateishi R, Goto T, Shiina S, Yoshida H, <u>Koike K</u>	IGF-II producing hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: metabolic complications and a foresight to molecular targeting therapy to the IGF signal	Case Rep Gastroenterol	6(3)	784-789	2012
Yanagimoto S, Yotsuyanagi H, Kikuchi Y, Tsukada K, Kato M, Takamatsu J, Hige S, Chayama K, Moriya K, <u>Koike K</u>	Chronic hepatitis B in patients coinfecting with human immunodeficiency virus in Japan: a retrospective multicenter analysis	J Infect Chemother	18(6)	883-890	2012
Ikeda H, Enooku K, Ohkawa R, <u>Koike K</u> , Yatomi Y	Plasma lysophosphatidic acid levels and hepatocellular carcinoma	Hepatology	57	417-418	2013
Shiina S, Tateishi R, Imamura M, Teratani T, Koike Y, Sato S, Obi S, Kanai F, Kato N, Yoshida H, Omata M, <u>Koike K</u>	Percutaneous ethanol injection for hepatocellular carcinoma: 20-year outcome and prognostic factors	Liver Int	32(9)	1434-1442	2012
Uchino K, Obi S, Tateishi R, Sato S, Kanda M, Sato T, Arano T, Enooku K, Goto E, Masuzaki R, Nakagawa H, Asaoka Y,	Systemic combination therapy of intravenous continuous 5-fluorouracil and subcutaneous pegylated interferon	J Gastroenterol	47(10)	1152-1159	2012